

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)**

**ANA LAURA BOECHAT BORGES**

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

São Paulo

28/08/2008

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

ANA LAURA BOECHAT BORGES

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

*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

Ana Laura Boechat Borges

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

*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: \_\_\_\_\_

À minha mãe, Ana Carolina, que me ensinou a acreditar em mim e nas pessoas ao meu redor. Que me ensinou a superar com alegria todos os momentos difíceis e a agradecer por tudo que tenho conseguido.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

À Dr<sup>a</sup> Regina Baldini, pela acolhida e orientação, sempre com paciência e total dedicação. Também agradeço por servir como exemplo de amor ao que faz.

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.

À Dr<sup>a</sup> Aline Maria da Silva, por ter cedido a linhagem de *Dictyostelium discoideum* e o espaço, que possibilitaram a realização dos ensaios de virulência.

Aos docentes que participaram da minha banca de qualificação, Dr. Bayardo Baptista Torres, Dr. Etelvino Bechara e Dr. Sandro Roberto Marana, pelas sugestões.

A todos os professores que, com aulas ou discussões informais, contribuíram para minha formação acadêmica, em especial, Dr. Bayardo Baptista Torres, Dr. Frederico Gueiros Filho e Dr<sup>a</sup> Marilis do Valle Marques.

Aos amigos do laboratório de Regulação da Expressão Gênica em Microrganismos, Ana Paula, André, César, Diogo, Eliezer, Gianluca, Karina, Patrícia e Rogério pela ajuda sempre com boa vontade, sugestões e ótimos momentos de descontração, que fazem do laboratório um ambiente agradável para o trabalho e dão a certeza de apoio nas mais variadas situações fora de lá.

À técnica Sandra Mara pela dedicação ao trabalho que é base para que os projetos aconteçam, além da paciência e da amizade.

A Marivon pelo trabalho de base e por sua alegria contagiante.

À amiga Luci Deise Navarro pela competência em tudo o que faz; pela eficiência e pela prontidão em ajudar; pelo serviço de sequenciamento e, principalmente, pelas conversas deliciosas em momentos de descontração.

Às pessoas do laboratório da Dr<sup>a</sup> Aline Maria da Silva: Daniela Kristeller-Gonzalez, Layla Farage, Patrícia Pessoa, Renato e ao técnico Alexandre Sanchez pelo auxílio com a

manutenção das linhagens de *Dictyostelium discoideum* e pela disposição em ajudar sempre com boa vontade.

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.

A Nathália pelo companheirismo e apoio nas horas mais diversas, pelas boas conversas e risadas ao fim de um dia cansativo.

À minha mãe, Ana Carolina, sempre ao meu lado, com sua força, calma, alegria, incentivo e amor.

Ao meu padrasto, Affonso, e à sua família: D. Aldina, Cristina, Cristiano e Aparecida por acreditarem em mim e pelo interesse constante em meus estudos.

Aos meus padrinhos Isaac, Carolina e Maria Amélia, tios – Atalíbia, Marciano, Edith, Gagaça, Cyrillo e Dionéia – e primos que souberam me dar apoio e bons momentos de descontração mesmo com toda a distância física.

A todas as pessoas da minha família, agradeço simplesmente por existirem!

Às velhas amizades que resistiram ao tempo e à distância, pela certeza da presença constante; Aos amigos mais queridos da época da faculdade e às meninas do “Clube da Lulu”, pela tradução mais fiel da amizade. Aos novos amigos, que vão surgindo nesse novo ciclo da minha vida.

Ao querido Everton, pela companhia, compreensão e amor.

Por fim, a Deus e a todas as outras energias divinas que me deram força e ajustaram meu caminho para que eu o encontrasse.

## RESUMO

Boechat Borges, A.L. Genes envolvidos com a patogenicidade de *Pseudomonas aeruginosa* PA14: caracterização das regiões promotoras e ensaios de virulência no hospedeiro-modelo *Dictyostelium discoideum*. Ano: 2008. 59 páginas. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

*Pseudomonas aeruginosa* é uma gamaproteobactéria ubíqua capaz de infectar indivíduos imunocomprometidos e causar infecções hospitalares. Entre duas repetições diretas situadas na ilha de patogenicidade PAPI-1 da linhagem PA14, encontram-se dois grupos de genes transcritos em direções opostas. O primeiro, composto de *pvrS*, *pvrR*, *rscC* e *rscB*, codifica proteínas de sistemas de dois componentes e está relacionado com virulência, enquanto o segundo compreende cinco genes (*cupD1-D5*) e codifica uma fímbria do tipo *chaperone-usher*, com alta similaridade com o grupo *cupA*, envolvido na formação de biofilme em outras linhagens de *P. aeruginosa*. Fímbrias da mesma família são importantes na patogenicidade de outras bactérias. Com o objetivo de estudar a relação entre esses dois grupos de genes, procurou-se caracterizar sua organização por ensaios de RT-PCR, que possibilitaram observar a disposição dos genes dos sistemas de dois componentes em dois operons distintos (*pvrRS* e *rscCB*) e, pelo menos, *cupD1-cupD2* como uma unidade transcricional, com indícios apontando para a organização de *cupD1-D5* em um único operon. Os inícios de transcrição e as regiões promotoras de cada operon foram caracterizados por experimentos de RACE 5' e extensão de oligonucleotídeo marcado em busca de seqüências relevantes para a ativação da expressão desses genes. Visando investigar a regulação da expressão da fímbria CupD pelos sistemas de dois componentes codificados pelos genes adjacentes, foram realizados ensaios de qRT-PCR, os quais mostraram uma menor expressão de *cupD* na linhagem mutante para *rscB*. RcsB apresenta um domínio de ligação a DNA e, apesar da falta de sucesso em ensaios de ligação dessa proteína à região promotora de *cupD*, os dados obtidos por qRT-PCR

indicam fortemente que essa proteína funciona como um ativador de transcrição dos genes da fímbria. Corroborando esses achados, somente quando se utilizou RNA extraído de *P. aeruginosa* PA14 superexpressando RcsB foi possível visualizar no gel a banda referente ao início de transcrição de *cupD1-D2* no ensaio de extensão de oligonucleotídeo. Ao contrário do efeito positivo de RcsB observado na transcrição de *cupD1*, *cupD2* e *cupD5*, a histidina quinase RcsC atua negativamente na expressão dos genes da fímbria, sugerindo que, nesse caso, sua atividade predominante sobre RcsB seja a de fosfatase. PvrS e PvrR parecem atuar de forma indireta e positiva sobre *cupD*. Como um segundo objetivo do trabalho, ensaios de virulência de *P. aeruginosa* no hospedeiro-modelo *Dictyostelium discoideum* foram otimizados, com o estabelecimento de uma técnica para se testar alguns genes estudados no laboratório que podem ser relevantes para a virulência dessa bactéria. Resultados desses ensaios confirmaram a atenuação de mutantes para uma suposta metiltransferase, já observada em modelos de planta, camundongo e drosófila. Em conjunto, os resultados desse trabalho tornam-se informações valiosas para serem usadas na pesquisa de controle de infecções por *P. aeruginosa*, que depende de fímbrias para colonizar com sucesso superfícies abióticas que servem de veículo de disseminação desse agente infeccioso e para que as bactérias possam persistir no organismo do hospedeiro.

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

## ABSTRACT

Boechat Borges, A.L. Genes involved with *Pseudomonas aeruginosa* PA14 pathogenicity: characterization of the promoter regions and virulence assays in the *Dictyostelium discoideum* host model Ano: 2008. 59 páginas. Master Thesis. Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

*Pseudomonas aeruginosa* is a ubiquitous gammaproteobacteria able to infect immunocompromised individuals and to cause nosocomial infections. Between two direct repeats in the PAPI-1 pathogenicity island present in strain PA14, there are two gene clusters transcribed in opposite directions. The first, composed of *pvrS*, *pvrR*, *rscC* and *rscB*, encodes two-component systems proteins and is implicated in virulence, whereas the second comprises five genes (*cupD1-D5*) encoding a chaperone-usher fimbria with high similarity to *cupA*, a gene cluster involved in biofilm formation in other strains of *P. aeruginosa*. Fimbriae belonging to the same family of Cup are related to pathogenicity of other bacteria. In order to study the relationship between these two clusters, the organization of the genes in operons was characterized using RT-PCR, which results lead to the conclusion that the two-component systems genes are arranged into two different operons (*pvrSR* and *rscCB*) and that *cupD1-D2* share the same promoter, with some evidences that the operons extends from *cupD1* to *cupD5*. The transcription start sites and the promoter regions of each operon were characterized with RACE 5' and primer extension assays to look for sequences that could be relevant to the activation of expression of these genes. Quantitative RT-PCR assays were carried out to investigate whether the expression of CupD fimbriae is regulated by the two-component systems encoded by the adjacent genes and the results showed a lower expression of *cupD* in the *rscB* mutant strain than in the wild-type. RcsB bears a DNA-binding domain and, although our assays of DNA-protein interactions have failed, data obtained by qRT-PCR

strongly indicate that this protein functions as a transcription activator of fimbrial genes. These findings were corroborated by the primer extension assay, in which the band corresponding to the transcriptional start of *cupD1-D2* was visible only when the reaction was performed with the RNA extracted of *P. aeruginosa* overexpressing RcsB. Unlike the effect observed for RcsB in *cupD1*, *cupD2* and *cupD5* transcription, the histidine kinase RcsC acts negatively in the fimbrial genes expression, suggesting that it might function predominantly as a RcsB phosphatase. PvrS and PvrR seem to regulate *cupD* positively and indirectly. As a second aim of this work, virulence assays of *P. aeruginosa* in the model host *Dictyostelium discoideum* were optimized, and a technique for testing genes studied in the laboratory that could be important for *Pseudomonas* virulence was established. These assays confirmed the attenuation-in-virulence of strains mutant in a putative methyltransferase gene, as observed before in plant, mouse and drosophila models. The results obtained in this work may contribute to *P. aeruginosa* infection control research, since this bacterium depends on fimbriae to successfully colonize abiotic surfaces that act as a dissemination vehicle, and to allow the bacteria to persist into the host organism.

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

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Região compreendida entre duas seqüências repetidas diretas em PAPI-1.....	5
Figura 2. Organização modular das histidina-quinases.....	6
Figura 3. Organização modular dos reguladores de resposta.....	7
Figura 4. Similaridade de arquitetura dos domínios das proteínas do sistema Roc com PvrR, RcsC e RcsB.....	12
Figura 5. Representação esquemática do ensaio de virulência de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> contra o hospedeiro-modelo <i>Dictyostelium discoideum</i> .....	29
Figura 6. Determinação da estrutura dos operons <i>pvrSR</i> , <i>rscCB</i> e <i>cupD1-2</i> .....	31
Figura 7. Validação do método $-2^{\Delta\Delta Ct}$ .....	32
Figura 8. Efeito dos sistemas de dois componentes na transcrição de <i>cupD</i> .....	33
Figura 9. Resultado dos ensaios de RACE 5'.....	35
Figura 10. Determinação do início de transcrição de <i>pvrS</i> .....	36
Figura 11. Região promotora e início de transcrição de <i>cupD</i> .....	39
Figura 12. Indução de RcsB-His em <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	41
Figura 13. Extração de RcsB-His dos corpos de inclusão.....	41
Figura 14. Formação de halo por células de <i>D. discoideum</i> .....	44
Figura 15. Esquema da regulação de <i>cupD</i> pelos sistemas de dois componentes PvrSR e RcsCB.....	49
Tabela 1. Linhagens e plasmídeos.....	17
Tabela 2. Composição dos meios de cultura.....	18
Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.....	18
Tabela 4. Tampões usados na extração e purificação da proteína RcsB recombinante.....	24
Tabela 5. Tampões de ligação usados nos ensaios de <i>gel shift</i> .....	26
Tabela 6. Dados dos experimentos de RACE 5'.....	34
Tabela 7. Níveis de virulência de acordo com a quantidade mínima de células de <i>D. discoideum</i> capaz de formar halos no tapete de bactérias.....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

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

Cup: *chaperone-usher pathway*

DO: densidade óptica

DOC: deoxicolato

DR2: repetição direta 2

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

HEPES: 4-(2-hidroxietil)-1-ácido piperazinaetanosulfônico

IPTG: isopropil  $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo

MES: 2-(N-morfolino) ácido etanosulfônico

NBT: *nitrobluetetrazolium*

ORF: *open reading frame*

PAPI-1: Ilha de Patogenicidade 1 de *Pseudomonas Aeruginosa*

PBS: tampão fosfato salino

PCR: *polimerase chain reaction*

PDE: fosfodiesterase

PIPES: *piperazine-N,N'-bis(ethanosulfonic acid)*

PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonil

qRT-PCR: RT-PCR quantitativo

RACE 5': *Rapid Amplification of cDNA Ends*

RGP: *region of genomic plasticity*

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

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

SMART: *Simple Modular Architecture Research Tool*

TBE: tris-borato EDTA

TBS: *tris-buffered saline*

Tris: tris (hydroxymetil) aminometano

# SUMÁRIO

<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	1
1.2. A ilha de patogenicidade PAPI-1.....	2
1.2.1. O grupo de genes entre as repetições diretas 2 (DR2).....	4
1.2.1.1. Os sistemas de dois componentes <i>pvrSR</i> e <i>rscCB</i> .....	5
1.2.1.2. Genes de fímbria <i>cupD1-5</i> .....	10
1.3. Utilização da ameba <i>Dictyostelium discoideum</i> como modelo de hospedeiro.....	12
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>15</b>
2.1. Objetivos gerais.....	15
2.2. Objetivos específicos.....	15
<b>3. Materiais e métodos.....</b>	<b>16</b>
3.1. Condições de cultura, linhagens, plasmídeos e oligonucleotídeos.....	16
3.2. Técnicas básicas de Biologia Molecular.....	16
3.3. Determinação da arquitetura dos operons por RT-PCR.....	19
3.4. Determinação dos inícios de transcrição dos operons por RACE 5'.....	19
3.5. Confirmação do início de transcrição de <i>cupD</i> por ensaios de extensão de oligonucleotídeo.....	20
3.6. Análise da expressão de <i>cupD1</i> , <i>cupD2</i> e <i>cupD5</i> nos mutantes para <i>pvrS</i> , <i>pvrR</i> , <i>rscC</i> e <i>rscB</i> por RT-PCR quantitativo.....	21
3.7. Expressão e purificação da proteína recombinante RcsB-His.....	22
3.8. Produção de anticorpo policlonal contra RcsB.....	24
3.9. Análise da indução da proteína RcsB-His recombinante por <i>wstern blot</i> .....	25
3.10. Ensaio de retardamento de migração em gel de poliacrilamida ( <i>gel shift</i> ).....	25
3.11. Otimização dos ensaios de patogenicidade em <i>Dictyostelium discoideum</i> .....	27
<b>4. Resultados.....</b>	<b>30</b>
4.1. Investigação da disposição em operons dos genes localizados entre DR2.....	30
4.2. Validação do método $-2^{\Delta\Delta Ct}$ para cálculo dos resultados de RT-PCR quantitativo...	31
4.3. Atuação dos sistemas de dois componentes na expressão de <i>cupD</i> .....	32
4.4. Análise dos inícios de transcrição de <i>pvrS</i> , <i>rscC</i> e <i>cupD1</i> por RACE 5'.....	33
4.5. Expressão e purificação da proteína recombinante RcsB-His.....	40
4.6. Produção de anticorpo policlonal contra RcsB.....	42

4.7. Verificação da interação de RcsB com o promotor de <i>cupD</i> via ensaios de retardamento em gel de poliacrilamida.....	42
4.8. Ensaios de patogenicidade em <i>Dictyostelium discoideum</i> .....	43
<b>5. Discussão.....</b>	<b>45</b>
5.1. Regulação de <i>cupD</i> pelos sistemas de dois componentes <i>pvrSR</i> e <i>rscCB</i> .....	45
5.2. Uso de <i>Dictyostelium discoideum</i> como hospedeiro-modelo.....	50
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>52</b>
<b>7. Referências.....</b>	<b>53</b>
<b>Lista de Anexos.....</b>	<b>60</b>

## 1. Introdução

### 1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* é uma proteobactéria do grupo gama encontrada em diversos ambientes, como solo e água e que atua como um patógeno oportunista sob diversas circunstâncias. Sua presença em diferentes tipos de ambiente ocorre devido a inúmeros fatores, como uma grande diversidade genética e capacidade de metabolizar várias fontes de carbono e nitrogênio e de crescer tanto aeróbica, quanto anaerobicamente, utilizando aceptores finais de elétrons distintos. Em humanos, essa bactéria é freqüentemente associada a infecções oportunistas em pacientes sob quimioterapia, com queimaduras graves, AIDS e fibrose cística e está implicada em infecções respiratórias, gastrointestinais e do trato urinário, além de ceratite, otite média e bacteremia (Lyczak *et al.*, 2000; Wagner e Iglewski, 2008). Essas infecções são geralmente difíceis de serem tratadas utilizando-se terapias convencionais com antibióticos, uma vez que *P. aeruginosa* é intrinsecamente resistente a muitos desses fármacos, em parte devido a vários sistemas de efluxo. Essa bactéria também produz numerosos fatores de virulência, incluindo fatores secretados, como elastase, proteases, fosfolipase C, cianeto de hidrogênio, exotoxina A e exoenzima S, assim como fatores associados à superfície celular, como lipopolissacarídeo, flagelo e fímbrias. Nesse microrganismo, a expressão de muitos desses fatores de virulência é controlada de uma maneira dependente de densidade celular, num processo denominado *quorum sensing* (revisado por Girard e Bloemberg, 2008). A capacidade de crescer sob a forma de biofilmes facilita a adesão e colonização de diversos materiais, como catéteres, ventiladores, próteses e lentes de contato, sendo uma bactéria associada a 10 a 20% de todas as infecções hospitalares (Ikeno *et al.*, 2007). Os fatores acima citados tornam a infecção por *P. aeruginosa* uma das maiores causas de mortalidade de pacientes com fibrose cística e de complicações em

pacientes imunocomprometidos (Wagner e Iglewski, 2008).

Assim, torna-se cada vez mais relevante a busca por estratégias alternativas de tratamento contra esse patógeno, por isso o interesse crescente de variados grupos de pesquisa na compreensão de seus mecanismos de adaptação e de patogenicidade.

A linhagem UBCPP-PA14 (PA14) é um isolado de queimadura capaz de causar morbidade ou mortalidade em vários hospedeiros filogeneticamente distintos. Genes homólogos aos envolvidos na patogenicidade de PA14 também estão presentes em outros patógenos de animais e plantas, tendo seu envolvimento com esses mecanismos sido comprovado em alguns casos (Cao *et al.*, 2001; Tan, 2002). O genoma de PA14 foi completamente seqüenciado (Lee *et al.*, 2006) e foram detectadas regiões variáveis em comparação à linhagem PAO1, que representa o primeiro genoma seqüenciado de *Pseudomonas* (Stover *et al.*, 2000), notadamente duas ilhas de patogenicidade (He *et al.*, 2004), a maior delas com aproximadamente 108 kb (PAPI-1, descrita abaixo).

Mais recentemente, em uma análise comparativa de genomas de seis linhagens de *P. aeruginosa* provenientes de isolados clínicos, incluindo PAO1, foi relatado que PA14 possui o maior número de segmentos de ORFs únicos dessa linhagem. Esses segmentos cepa-específicos são denominados regiões de plasticidade genômica (RGP, de *region of genomic plasticity*) e incluem qualquer região de, no mínimo, quatro ORFs contíguas ausente em pelo menos um dos genomas analisados (Mathee *et al.*, 2008).

## **1.2. A ilha de patogenicidade PAPI-1**

Muitos genomas bacterianos são organizados em blocos de seqüências estáveis e em regiões variáveis compostas de bacteriófagos, plasmídeos, transposons e grandes regiões instáveis, denominadas ilhas genômicas (Welch *et al.*, 2002; Hacker *et al.*, 2003). Genes distintos presentes em uma única ilha genômica frequentemente apresentam origens diversas e

os blocos são construídos por de eventos de inserção e deleção. Ilhas genômicas são adquiridas por transferência horizontal e podem ser encontradas em espécies variadas, o que dificulta a atribuição das suas origens (Hacker e Kaper, 2000). Ilhas de patogenicidade são ilhas genômicas especializadas, as quais codificam fatores de virulência.

A ilha PAPI-1 (*Pseudomonas aeruginosa pathogenicity island I*) consiste em uma região de aproximadamente 108 kb com características evidentes de uma ilha genômica: está presente próximo a um dos genes de tRNA-Lisina, cuja extremidade 3' encontra-se duplicada na outra extremidade dos 108 kb; o conteúdo G+C é menor (59,7%) que o do restante do cromossomo (66,6%); apresenta elementos de inserção (IS) e várias ORFs que codificam proteínas envolvidas em mobilização de DNA e recombinação, como tranposases, integrases e proteínas relacionadas a funções plasmidiais. Das 115 ORFs anotadas em PA14, a maioria não apresenta similaridade com genes de função conhecida, porém muitas estão presentes nos genomas de outras bactérias encontradas em associação a plantas e animais (He *et al.*, 2004). A presença de PAPI-1 no genoma de PA14, carregando tantos genes potencialmente ligados a mecanismos conservados de patogenicidade, muito provavelmente contribui para o amplo espectro de hospedeiro desta linhagem.

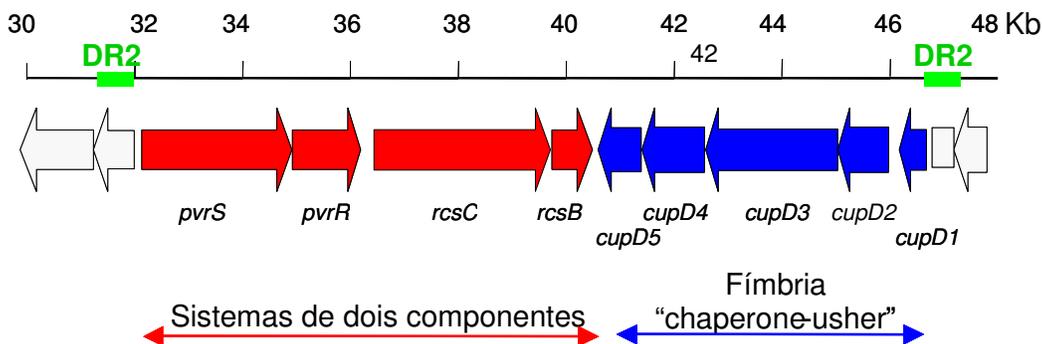
PAPI-1 contém todas as 33 ORFs definidas como *core* de uma família de ilhas genômicas presentes em beta e gamaproteobactérias (Mohd-Zain *et al.*, 2004), sendo os produtos da maioria destas ORFs classificados como proteínas hipotéticas ou envolvidas em replicação, mobilização ou recombinação. Essa ilha é classificada como uma região de plasticidade genômica (RGP) na comparação de PA14 com outras cinco linhagens de *P. aeruginosa*, sendo denominada RGP41 no trabalho de (Mathee *et al.*, 2008), o qual mostra a presença dessa região em quatro das linhagens analisadas, além da PA14, porém apresentando variação no conteúdo das ORFs.

Recentemente, PAPI-1 foi detectada como um elemento episossomal circularizado, com taxa de excisão espontânea estimada em 0,3% (Klockgether *et al.*, 2007). Foi demonstrado também que PAPI-1 pode ser transmitida entre cepas de *P. aeruginosa* a uma frequência variando de  $3,1 \times 10^{-7}$  a  $5,4 \times 10^{-4}$ , sendo essas ilhas detectadas nas células receptoras tanto na forma circular, quanto integrada. Entretanto, os mecanismos moleculares responsáveis por essa transferência ainda não são conhecidos (Qiu *et al.*, 2006).

### 1.2.1. O grupo de genes entre as repetições diretas 2 (DR2)

PAPI-1 possui pelo menos cinco pares de seqüências repetidas diretas, sendo que a primeira delas representa o sítio original de integração da ilha dentro do gene de tRNA<sup>Lys</sup> e as outras compreendem genes que provavelmente foram inseridos juntos em eventos subsequentes de recombinação homóloga. A presença de dois pares de repetições diretas sem qualquer ORF entre essas seqüências refletem possivelmente um evento de deleção do conjunto de ORFs anteriormente inserido. Deste modo, pode-se inferir que os trechos contínuos entre duas seqüências repetidas diretas foram inseridos em um mesmo evento de recombinação, e que, portanto, as ORFs presentes neste trecho provavelmente têm uma origem comum e seus produtos podem participar de uma mesma via funcional.

Entre as duas cópias de uma das seqüências repetidas diretas em PAPI-1 (denominadas DR2), encontra-se uma região de 15 Kb (Figura 1), que inclui um grupo de quatro genes que codificam sistemas de dois componentes (*pvrS*, *pvrR*, *rscC* e *rscB*) e um grupo de cinco (*cupD1-5*), que codifica proteínas de alta similaridade com as codificadas por *cupA* de *P. aeruginosa* PAO1 (Vallet *et al.*, 2001). Linhagens com deleções em *pvrS*, *pvrR*, *rscC* e *rscB* apresentaram redução significativa na virulência de PA14 nos modelos de queimadura em camundongo e de crescimento em folhas de *Arabidopsis thaliana* e uma inserção por transposon em *cupD2* afetou a virulência em um dos modelos (He *et al.*, 2004).



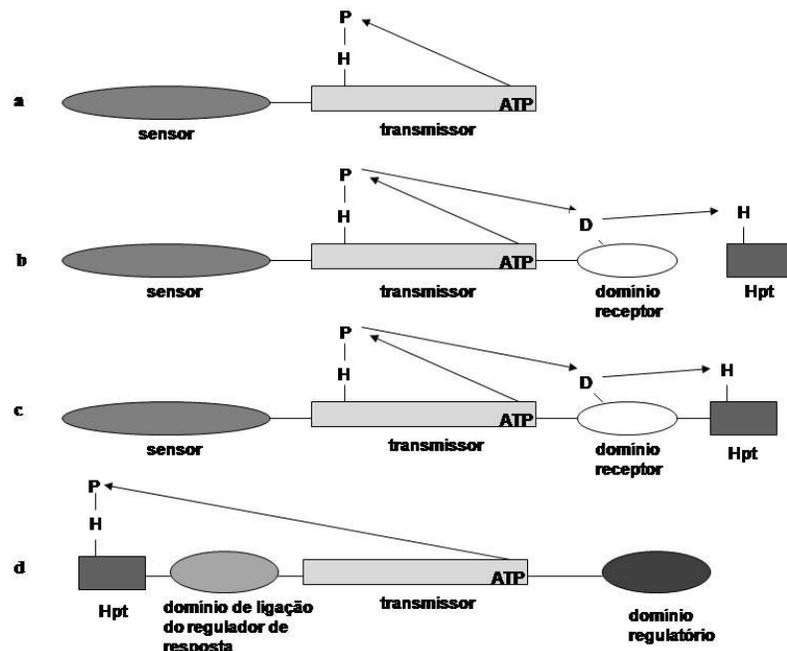
**Figura 1. Região compreendida entre duas seqüências repetidas diretas em PAPI-1.** Setas vermelhas: genes similares a sistemas de dois componentes; setas azuis: genes com similaridade a genes codificadores de fímbrias montadas pelo sistema “*chaperone-usher*” (*cup*, de *chaperone-usher pathway*); setas brancas: ORFs fora da região em questão (RL034-35 ou PA14\_59830 e PA14\_59820, respectivamente; RL046 ou PA14\_59700); caixa branca: pseudogene RL045 (transposase); retângulos verdes: seqüências repetidas diretas DR2. Os números na parte superior são relativos ao início da ilha PAPI-1 (kb) (adaptado de (He *et al.*, 2004).

### 1.2.1.1. Os sistemas de dois componentes *pvrSR* e *rcsCB*

Sistemas de dois componentes são cascatas de sinalização prevalentes em bactérias, porém também se fazem presentes em plantas e em microrganismos dos domínios Archaea e Eucarya, constituindo uma forma de transdução de sinal eficiente para a percepção e a resposta adequada a alterações no meio ambiente (Bourret, 2006).

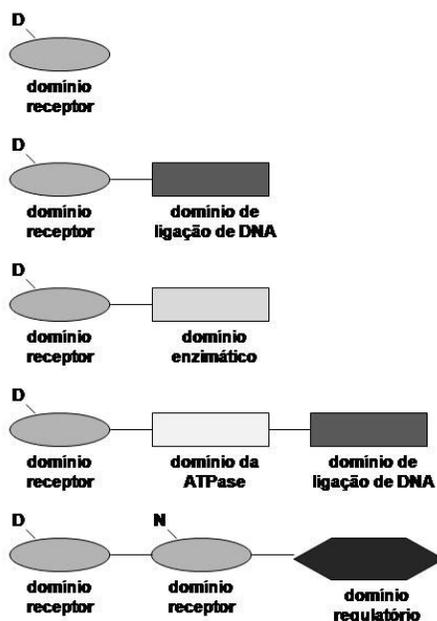
O protótipo de sistemas de dois componentes encontrados em bactérias é caracterizado pela presença de uma proteína sensora, capaz de se autofosforilar em um resíduo de histidina conservado, em resposta a um estímulo. Essa proteína fosforilada, então, transfere o grupo fosfato para um resíduo de aspartato conservado do regulador de resposta. A fosforilação e a desfosforilação do regulador de resposta, por sua vez, muda a conformação desta proteína, freqüentemente modulando sua atividade (Foussard *et al.*, 2001). Alguns reguladores de resposta ligam-se ao DNA atuando como ativadores ou inibidores da transcrição (Majdalani e Gottesman, 2005).

As proteínas sensoras histidina-quinases de classe I (figura 2a, b e c) funcionam como homodímeros e apresentam módulos funcionais conservados, tipicamente compostos por um domínio sensor N-terminal de entrada do sinal, que geralmente compreende regiões transmembrana, e um domínio transmissor que contém a histidina fosfo-aceptora e um sítio de ligação a ATP. Cerca de 95% dos domínios de entrada do sinal em sistemas de dois componentes são aqueles ligadores de pequenas moléculas, como PAS e GAF (Ulrich *et al.*, 2005). Além desses módulos, elas ainda podem conter um domínio acceptor com um resíduo de aspartato fosforilável e/ou um domínio HPT (unidade de fosfotransferência) com outro resíduo fosforilável, normalmente histidina. As histidina-quinases de classe II (figura 2d) são especializadas em quimiotaxia e, ao contrário das quinases de classe I, não possuem um domínio sensor, ligando-se a um receptor de membrana (Foussard *et al.*, 2001).



**Figura 2. Organização modular das histidina-quinases.** Nas enzimas de classe I (a, b, c) domínios sensores (ovais maiores) apresentam-se de comprimento variável e detectam uma diversidade de sinais. O domínio central do transmissor é conservado na super-família das histidina-quinases. Quinases híbridas (b, c) contêm um módulo receptor fosforilável e, em alguns casos, uma unidade de fosfo-transferência. Histidina quinases de classe II (d) estão envolvidas em quimiotaxia e acopladas a receptores de membrana (adaptado de (Foussard *et al.*, 2001).

Os reguladores de resposta (figura 3) consistem de um domínio N-terminal fosfoceptor REC, cuja conformação é alterada com a fosforilação. Essa mudança na conformação, que aumenta a propensão do domínio REC para formar dímeros, é usada por bactérias e Archaea para transmitir e propagar uma ampla gama de sinais ambientais e intracelulares. O domínio C-terminal, que responde à nova conformação do domínio REC, representa o domínio de saída do sinal e 87% dos conhecidos são de ligação a DNA (HTH, de *helix-turn-helix*, com algumas variações). Os 13% restantes são enzimáticos, que regulam os níveis de nucleotídeos cíclicos e a fosforilação de proteínas (Ulrich *et al.*, 2005).



**Figura 3. Organização modular dos reguladores de resposta.** Essas proteínas compartilham um domínio receptor fosforilável comum. Reguladores de resposta geralmente carregam módulos funcionais adicionais, cuja atividade pode ser regulada pelo domínio receptor (adaptado de (Foussard *et al.*, 2001).

Várias cascatas de sinalização envolvendo sistemas de dois componentes estão implicadas em patogenicidade. Como exemplo, pode-se citar os sistemas GacS/GacA de bactérias fitopatogênicas, entre elas, *Pseudomonas syringae*, e seus homólogos em patógenos de animais (Heeb e Haas, 2001; Marutani *et al.*, 2008), sendo inclusive envolvido com a virulência de PA14 (Rahme *et al.*, 1995), PhoP/PhoQ de *Salmonella* e *Yersinia*

*pseudotuberculosis* (Garcia Vescovi *et al.*, 1994; Flamez *et al.*, 2008), HrpY/HrpS de *Erwinia herbicola* (Nizan-Koren *et al.*, 2003), Ihk/Irr de *Streptococcus* grupo A, ArcA/ArcB de *Haemophilus influenza* (De Souza-Hart *et al.*, 2003), VicK/VicR de *Streptococcus pneumonia* (Wagner *et al.*, 2002), BvrR/BvrS de *Brucella abortus* (Guzman-Verri *et al.*, 2002), VirR/VirS de *Clostridium perfringens* (Shimizu *et al.*, 2002), entre outros. Sistemas de dois componentes com domínios que regulam os níveis de nucleotídeos cíclicos intracelulares também estão envolvidos com virulência, tendo sido caracterizado o sistema VieA/VieS em *Vibrio cholerae*, cuja atividade do domínio fosfodiesterase presente em VieA reduz os níveis de c-diGMP na bactéria, promovendo sua passagem do fenótipo formador de biofilmes usado na vida livre de *V. cholerae*, para a forma móvel e infectante, produtora da toxina da cólera (revisado por (Tamayo *et al.*, 2007). Vale lembrar que em muitas outras bactérias, inclusive *P. aeruginosa*, o fenótipo sésil está relacionado com uma maior virulência do patógeno, por facilitar sua persistência no organismo hospedeiro.

A seguir estão descritos os domínios conservados encontrados nos sistemas de dois componentes presentes em PAPI-1. A previsão destes domínios foi feita com o auxílio do programa SMART (Schultz *et al.*, 1998).

PvrR (*phenotype variant regulator*) foi primeiramente identificada como uma proteína reguladora que controla a conversão entre formas resistentes a antibióticos para a forma selvagem da bactéria (Drenkard e Ausubel, 2002). Pela proximidade dos genes, acredita-se que o produto de PA14\_59800 ou RL036, aqui chamado de *pvrS*, codifique o sensor cognato a PvrR (He *et al.*, 2004).

PvrR contém um domínio EAL, com função de fosfodiesterase (PDE) de bis (3',5') monofosfato de diguanosina cíclico (c-diGMP), presente em várias proteínas de sistemas de dois componentes, geralmente reguladores de resposta, sendo um exemplo de uma proteína com domínio enzimático de saída do sinal. O alvo da atividade regulatória de diGMP cíclico

em uma variedade de espécies são estruturas de adesão localizadas na superfície, incluindo exopolissacarídeos e fímbrias (Galperin, 2005).

Altos níveis de c-di-GMP em bactérias têm sido relacionados com células no seu estado sésil. Em contraste, baixos níveis de c-diGMP aparecem inibindo a formação de biofilme e organelas adesivas de superfície, por fim estimulando a motilidade. A correlação de altos níveis de c-diGMP com biofilme e baixos níveis de c-diGMP com motilidade foi demonstrada com a superexpressão de domínios GGDEF e EAL em diversas bactérias (Simm *et al.*, 2004; Kovacikova *et al.*, 2005).

PvrS apresenta-se como um sensor híbrido: além de regiões transmembrana e do domínio de histidina quinase, também apresenta um domínio regulador de resposta (figura 2B). Esses domínios são comuns a RcsB, a outra quinase sensora do conjunto de genes estudados, porém, ao contrário dessa proteína, não é conhecido em PvrS um domínio de entrada de sinal comum como PAS. 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 esse gene e seu produto.

*rscC* e *rscB* são anotados dessa forma por ter identidade de seqüência com os respectivos genes em *E. coli*, *Salmonella* e *Yersinia*. Essa similaridade, entretanto, não compreende toda a extensão da seqüência de aminoácidos deduzida para o sensor híbrido RcsC, que apresenta uma extensão N-terminal em PA14, o que leva a inferir que os estímulos detectados nas diferentes bactérias sejam distintos. Outras diferenças incluem um domínio HPT C-terminal em PA14, ausente em RcsC de enterobactérias, onde proteínas acessórias como RcsA e RcsD também fazem parte do sistema. O sistema de fosforilação Rcs foi primeiramente identificado por seu papel de regular a transcrição do gene de síntese do polissacarídeo capsular (*cps*) em *E. coli*. Existem dois modos de ação conhecidos para RcsB nos promotores regulados por essa proteína já caracterizados: RcsB liga-se ou como um

heterodímero com RcsA em uma seqüência consenso a cerca de 100 pb a montante do início de transcrição, ou como um homodímero em uma região conservada imediatamente a montante do -35 (revisado por (Majdalani e Gottesman, 2005)). Como exemplos do primeiro caso, pode-se citar o promotor *wza* do operon codificando os genes para o polissacarídeo capsular (Stout, 1996) e o próprio promotor *rcaA*, ambos em *E. coli* (Ebel e Trempy, 1999). O promotor p1 de *osmC* de *E. coli* (Davalos-Garcia *et al.*, 2001) e o promotor do RNA pequeno *rprA* (ativador da transcrição de *rpoS*) também em *E. coli* (Majdalani *et al.*, 2002) são dependentes da ligação do homodímero de RcsB.

RcsB de *P. aeruginosa* PA14 possui um domínio regulador de resposta (REC) e um motivo HTH (hélice-volta-hélice) de ligação a DNA. Considerando a ausência de RcsA em *Pseudomonas*, é esperado que RcsB se ligue à região regulatória do DNA-alvo em homodímeros.

#### **1.2.1.2. Genes de fímbria *cupD1-5***

Os termos fímbria ou *pili* são usados para designar estruturas filamentosas e não flagelares de superfície celular utilizadas na adesão dessas células a um substrato. Desde sua primeira observação em *E. coli* em 1950 (Houwink e Van, 1950), fímbrias já foram identificadas em um grande número de bactérias. Essas estruturas são classificadas, dentre outras maneiras, de acordo com seu mecanismo de montagem. Segundo essa visão, as classes predominantes em bactérias Gram-negativas são fímbrias conjugativas de fertilidade (*pili F*); fímbrias tipo IV, que medeiam a motilidade por *twitching*; fímbrias montadas pela via de nucleação/precipitação extracelular (*curli* de *E. coli*); e, finalmente fímbrias montadas pela via dependente de *chaperone-usher* (revisado por (Nuccio e Baumberg, 2007)).

As chaperonas desses sistemas são proteínas periplasmáticas que auxiliam o reconhecimento e a montagem de subunidades da fímbria, impedindo que elas se agreguem

no periplasma, sendo rapidamente degradadas por proteases. As proteínas denominadas *usher* formam um canal através da membrana externa por onde a subunidade passa e a fímbria é seqüencialmente montada. Esta via é altamente conservada em bactérias Gram-negativas e está envolvida na montagem de mais de 30 organelas de adesão, entre elas fímbrias tipo I de *E. coli* (Soto e Hultgren, 1999).

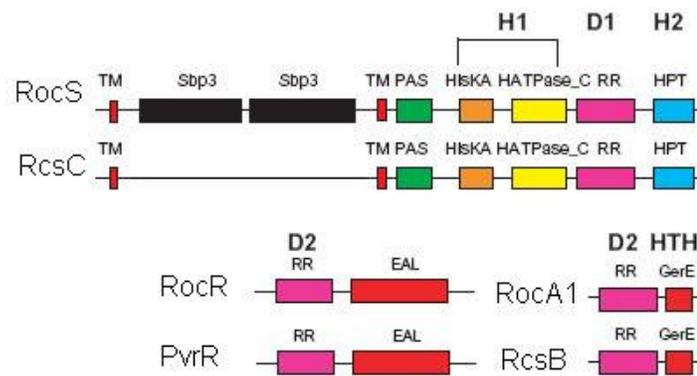
O conjunto de genes *cupD* codifica uma fímbria montada por um sistema do tipo *chaperone/usher* (*cup*, de *chaperone usher pathway*). *cupD1* e *cupD4* codificam subunidades da fímbria, *cupD2* e *cupD5*, chaperonas e *cupD3*, o *usher*.

Foram descritos em *P. aeruginosa* PAO1 três grupos de genes que codificam fímbrias do tipo *chaperone-usher*, denominados *cupA*, *cupB* e *cupC* (Vallet *et al.*, 2001), também presentes em PA14. A identificação desses supostos genes de adesão celular indica uma ampla gama de fatores que podem atuar na formação de biofilme. A expressão desses genes está sob o controle de diferentes sistemas de regulação, como reguladores globais da expressão gênica, fatores de transcrição específicos e condições ambientais (Vallet *et al.*, 2004; Kulasekara *et al.*, 2005; Vallet-Gely *et al.*, 2007).

O grupo de genes *cupA* apresenta a mesma organização que *cupD*, com identidade variando entre 61 e 72% entre as proteínas correspondentes. Em PAO1, a expressão de *cupA* é negativamente controlada por MvaT, uma proteína da família H-NS (Vallet *et al.*, 2004). A expressão de *cupB* e *cupC* também é afetada por MvaT, porém em extensão muito menor que *cupA*. Em adição, *cupB* e *cupC* são regulados pelo sistema Roc, composto de uma proteína sensora RocS e dos reguladores de resposta RocR e RocA1. 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 (figura 4). 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.

Em conjunto, as informações obtidas da literatura sugerem que sistemas de dois componentes encontrados em PAPI-1, assim como seus ortólogos, estejam relacionados à regulação da expressão de estruturas envolvidas com a adesão das bactérias ao substrato (Gottesman e Stout, 1991; Carballes *et al.*, 1999; Takeda *et al.*, 2001; Conter *et al.*, 2002; Tischler *et al.*, 2002). Devido à função do grupo de genes *cupD*, assim como sua proximidade aos genes de sistemas de dois componentes *pvrSR* e *rscCB*, é possível que esses sistemas sejam responsáveis pela regulação da expressão de *cupD*. Portanto, um estudo detalhado da regulação desses grupos de genes é importante para um melhor entendimento da relação entre eles e de sua expressão e seu papel na patogenicidade de PA14.



**Figura 4. Similaridade de arquitetura dos domínios das proteínas do sistema Roc com PvrR, RcsC e RcsB.** H e D representam a histidina conservada no sensor e o aspartato conservado no regulador de resposta, respectivamente. Adaptado de Kulasekara *et al.*, 2005.

### 1.3. Utilização da ameba *Dictyostelium discoideum* como modelo de hospedeiro

As estratégias necessárias para o desenvolvimento de tratamentos alternativos aos antibióticos contra infecções por *P. aeruginosa* baseiam-se na elucidação dos mecanismos de virulência e de resistência desse patógeno (Cosson *et al.*, 2002). Esses estudos devem incluir a caracterização de linhagens mutantes e a análise dos fatores envolvidos em sua virulência.

Um quadro de infecção é o resultado de uma interação complexa entre genótipos e condições fisiológicas do patógeno e do hospedeiro (Steinert *et al.*, 2003). O estudo de bactérias patogênicas em hospedeiros mamíferos, entretanto, revela algumas dificuldades, como o alto custo, o tempo gasto e, ainda, questões éticas. Para tanto, é necessário que se disponha de um hospedeiro-modelo alternativo. Como já foi relatado anteriormente, *P. aeruginosa* é conhecida pela habilidade de infectar uma ampla gama de hospedeiros filogeneticamente distintos, o que facilita a escolha por um modelo alternativo.

A ameba social *Dictyostelium discoideum* é um organismo-modelo útil para estudos biomédicos, devido à facilidade de crescimento, curto tempo de duplicação, ciclo de vida simples e apresentação dos estágios unicelular e multicelular (Steinert e Heuner, 2005). Além disso, *D. discoideum* oferece uma variedade de diferentes manipulações genéticas e, devido à haploidia, mesmo as mutações recessivas não são mascaradas por alelos adicionais e podem ser prontamente identificadas (Solomon *et al.*, 2000). Esse microrganismo eucariótico ainda mimetiza um macrófago de mamífero nos aspectos de sua biologia celular e de sua interação com bactérias (Pukatzki *et al.*, 2006). *D. discoideum* alimenta-se de bactérias, sendo *Klebsiella aerogenes* normalmente utilizada em laboratório. Quando *D. discoideum* é semeado sobre uma camada de *Klebsiella* crescida em meio sólido, são observadas placas claras que indicam que as bactérias foram fagocitadas. Entretanto, se esta camada for composta de *P. aeruginosa*, o crescimento de *D. discoideum* é completamente inibido (Cosson *et al.*, 2002; Pukatzki *et al.*, 2002). Foi também demonstrado que linhagens de *P. aeruginosa* deficientes em características relacionadas à virulência, como “*quorum sensing*” e secreção de toxinas via sistema tipo III, ou ainda linhagens superexpressando a bomba de efluxo de drogas MexEF-OprN permitem a formação de placas por *D. discoideum* (Cosson *et al.*, 2002; Pukatzki *et al.*, 2002; Alibaud *et al.*, 2008), portanto estes mecanismos conservados de virulência são funcionais também neste modelo de hospedeiro.

Devido às vantagens descritas acima, diversos grupos de pesquisa utilizam *D. discoideum* como hospedeiro-modelo para estudos de interação com diferentes patógenos, como o fungo *Cryptococcus neoformans*, que pode causar meningite em pacientes imunocomprometidos (Steenbergen e Casadevall, 2003); espécies de *Mycobacterium* oportunistas (Steinert *et al.*, 1998; Skriwan *et al.*, 2002; Collazos, 2003); *Legionella* (Fajardo *et al.*, 2004); *Vibrio cholerae* (Pukatzki *et al.*, 2006) e *Pseudomonas* (Cosson *et al.*, 2002; Pukatzki *et al.*, 2002).

Estudos de patogenicidade com os sorotipos de *V. cholerae* que não causam cólera, mas sim outras infecções humanas por mecanismos pouco conhecidos, permitiram identificar primeiramente nesse hospedeiro-modelo um mecanismo de virulência que envolve a translocação celular de proteínas que carecem das seqüências líderes hidrofóbicas N-terminais, o sistema de secreção tipo VI, também identificado em outros patógenos, inclusive *Pseudomonas aeruginosa*, como genes muito conservados (Folkesson *et al.*, 2002; Mougous *et al.*, 2006; Pukatzki *et al.*, 2006).

Novos genes relacionados com virulência em *P. aeruginosa* foram recentemente identificados em ensaios com *D. discoideum*, sendo confirmados posteriormente em hospedeiros distantemente relacionados, como *Drosophilla* e camundongo (Alibaud *et al.*, 2008), demonstrando a utilidade e a relevância do hospedeiro-modelo *Dictyostelium discoideum* na identificação e análise de novos genes de virulência nessa bactéria.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivos gerais

Este trabalho teve como objetivo caracterizar as regiões promotoras dos grupos de genes entre as DR2 em PAPI-1 e elucidar a relação de *cupD1-5* com os sistemas de dois componentes adjacentes. Como um objetivo complementar, ensaios de virulência de *P. aeruginosa* utilizando o hospedeiro-modelo *Dictyostelium discoideum* foram otimizados a fim de se estabelecer, nas condições do laboratório, um protocolo prático de medida de virulência dos diferentes mutantes de *P. aeruginosa* PA14 em estudo.

### 2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar se os grupos de genes *pvrSR*, *rscCB* e *cupD* estão organizados em operons.
- Determinar os inícios de transcrição de *pvrSR*, *rscCB* e *cupD* e buscar nas regiões promotoras seqüências importantes para a regulação da transcrição desses genes.
- Expressar e purificar a proteína recombinante RcsB-His para ensaios de ligação a DNA e produção de anticorpos.
- Otimizar um protocolo para ensaios de virulência com *D. discoideum* e detectar a relevância de genes estudados no laboratório para a virulência de *P. aeruginosa*.

### 3. Materiais e métodos

#### 3.1. Condições de cultura, linhagens, plasmídeos e oligonuclotídeos

Culturas de *E. coli* e *P. aeruginosa* foram feitas rotineiramente em meio LB (tabela 2) acrescido dos antibióticos necessários, a 37 ou a 28°C. *K. aerogenes* foi cultivada em meio SM a 22°C. Estoques de *D. discoideum* foram mantidos a 22°C em placas SM (SM com ágar 1,5%), nas quais foram semeadas culturas saturadas de *K. aerogenes*.

As linhagens de microrganismos e os plasmídeos utilizados neste trabalho estão listados na tabela 1. A composição dos meios de cultura utilizados é encontrada na tabela 2.

#### 3.2. Técnicas Básicas de Biologia Molecular

Isolamento de DNA plasmidial, digestão, reações de polimerase em cadeia (PCRs), ligações, transformação e outras técnicas básicas de biologia molecular foram realizadas de acordo com metodologia padrão descrita em manuais de referência (Sambrook *et al.*, 1989; Ausubel *et al.*, 1996). DNA genômico de *P. aeruginosa* foi isolado pela técnica de (Chen e Kuo, 1993). Isolamento de RNA total foi realizado com o reagente Trizol (Invitrogen), segundo as indicações do fabricante.

Tabela 1. Linhagens e plasmídeos.

Linhagens/plasmídeos	Características	Fonte ou referência
<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::TnpA</i> , Km <sup>R</sup>	(He <i>et al.</i> , 2004)
PA14_39641	PA14 <i>cupD1::MrT7</i> , Gm <sup>R</sup>	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_55270	PA14 <i>cupA1::MrT7</i> , Gm <sup>R</sup>	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_35795	PA14 <i>cupB1::MrT7</i> , Gm <sup>R</sup>	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_29593	PA14 <i>cupC1::MrT7</i> , Gm <sup>R</sup>	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14 <i>lasR::Gm</i>	PA14 com o gene <i>lasR</i> interrompido por um cassete de resistência a gentamicina	(Déziel <i>et al.</i> , 2004)
PA14 <i>rhlR::Tc</i>	PA14 com o gene <i>rhlR</i> interrompido por um cassete de resistência a tetraciclina	(Déziel <i>et al.</i> , 2004)
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
DH5α	<i>supE44 lacU169(80 lacZM15) hsdR17 recA1 endA11 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Invitrogen
BL21	F- <i>ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])</i>	(Studier e Moffatt, 1986)
<b><i>Dictyostelium discoideum</i></b>		
AX4	Linhagem axênica, cujo genoma foi seqüenciado	A.M. da Silva
<b><i>Klebsiella aerogenes</i></b>		
	Bactéria utilizada para a manutenção de culturas de <i>D. discoideum</i>	A.M. da Silva
<b>Plasmídeos</b>		
pGEM-T easy	Vetor de clonagem para produtos de PCR, Ap <sup>R</sup>	Promega
pPROEX-HTb	Vetor de expressão em <i>E. coli</i> ; adiciona cauda de poli-histidina ao produto do gene clonado, Ap <sup>R</sup>	Invitrogen
pGEX	Vetor de expressão em <i>E. coli</i> ; adiciona uma Glutathione-S-transferase (GST) ao produto do gene clonado, Ap <sup>R</sup>	GE Healthcare
pGEX39	Região codificadora de RL039 clonada no pGEX	Este trabalho
pRB204	Região codificadora de RL039 clonada no pPROEX-HTb	R. L. Baldini
pJS14	Vetor para expressão constitutiva a partir do promotor <i>lacZ</i> ; Cm <sup>R</sup> ; alto número de cópias	J. Skerker
pJSG	Derivado de pJS14; Gen <sup>R</sup>	(Nicastro <i>et al.</i> , 2008)
pJSG39	pJSG com fragmento pRE39	(Nicastro <i>et al.</i> , 2008)

**Tabela 2.** Composição dos meios de cultura.

Meio de cultura	Composição	Referência
LB	Triptona 10g/L; NaCl 10g/L; extrato de levedura 5g/L; pH 7	(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)
SM	Glicose 10 g/L; bacto peptona 10 g/L; extrato de levedura 1 g/L; MgSO <sub>4</sub> 0,5 g/L; K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,2 g/L; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,8 g/L; sulfato de dihidroestreptomicina 0,05 g/L; pH 6,5	(Chisholm <i>et al.</i> , 2006)
HL/5	Glicose 10 g/L; extrato de levedura 5 g/L; proteose peptona 5 g/L; tiotona peptona 5 g/L; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,67 g/L; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,34 g/L; sulfato de dihidroestreptomicina 0,05 g/L; pH 6,5	(Chisholm <i>et al.</i> , 2006)

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

Oligonucleotídeo	Seqüência	Utilização	Anelamento		
pvrSR_up	CGCTGCTGGTCAAAGTGTTA	RT-PCR para análise da disposição em operons	60°C		
pvrSR_low	TGCTTGAGATACGGCAGTTG				
pR-rC_up	GCATAACGAGCAACTGGTGA				
pR-rC_low	TACGGGTGAAGTGAAGGAG				
rscCB_up	AGGACAACCCAGTCAACCAG				
rscCB_low	GGGCATGCTGTAGTCGGTAA				
cupD1-D2_up	ACTATGCCGTCGGCTACATC				
cupD1-D2_low	GGGCGATAGAACAGCTTCAG				
rscB L	CGCCATTACCGACTACAG				
rscB R	CGACCATGGTGAAGATGA				
rscC L	GGTCACCTGCGAATGGTC	qRT-PCR e confirmação da expressão por RT-PCR	60°C		
rscC R	ACGCAAGCGGATTTCAAG				
cup D1 L	ACTATCGCCGCATTTCTC				
cup D1 R	ACGGTGTCGAGTATCAG				
cup D2 L	AACCAGATGCTGCTGATG				
cup D2 R	CAGGCTGAAGTGCAACTG				
cup D5 L	GCACCCAGATGAAAGTCA				
cup D5 R	GGGAGTAGGGTTCCTCATC				
36 race 1	AGAGGGCCTTTGTCTGGTATC				
36 race 2	TTGACGAGCGCTCTACCC				
PE 036	GGAGTGGAGAAACCCTATCAA	RACE 5'	55°C		
38 race 1	GTGCTTGGTAGCCAGT				
38 race 2	GCAAGGCACCACGTCAT				
PE 038	TGCGAGAGGGTTGTCCATT				
44 race 1	GACCGCCTGGAACATCAC				
44 race 2	CTCCGTGAAGGTGATGG				
PE 044/ p44 Hind	GCGAGAAATGCGGCGATAGTCG			RACE 5' e amplificação da sonda dos ensaios de <i>gel shift</i>	55°C e 60°C
p44 Bam	ATGGCCCGGGCGGATGTTTTTG			Amplificação da sonda dos ensaios de <i>gel shift</i>	60°C
nadB up	CTACCTGGACATCAGCCACA	Normalizador em qRT-PCR	60°C		
nadB down	GGTAATGTCGATGCCGAAGT				
PrE 39 LEFT	GATGAATTC	Amplificação de <i>rscB</i>	60°C		
PrE 39 RIGHT	GACGTCGAC				

### 3.3. Determinação da arquitetura dos operons por RT-PCR

Para verificar se os genes se organizam em operons conforme o sugerido pelo espaçamento dos genes entre as DR2, ensaios de RT-PCR foram realizados utilizando-se oligonucleotídeos (tabela 3) que permitissem a amplificação das regiões intergênicas e parte das regiões codificadoras dos pares de genes em questão. RNA total extraído da linhagem de *P. aeruginosa* selvagem PA14 foi devidamente tratado com DNase I (Promega ou Fermentas) e utilizado como molde na reação de síntese da primeira fita do cDNA com oligonucleotídeos iniciadores randômicos e a transcriptase reversa Improm II (Invitrogen). A enzima Transcriptor Reverse Transcriptase (Roche) foi utilizada alternativamente em alguns experimentos na tentativa de sintetizar cDNA a partir de transcritos maiores, como o possível mRNA contínuo entre *cupD2-D5*. Nesse caso também foram utilizados oligonucleotídeos específicos para o gene *cupD5* na síntese do cDNA, a fim de aumentar a especificidade e o rendimento da reação.

O cDNA foi usado, então, como molde nas PCRs para amplificar as possíveis regiões intergênicas, e assim confirmar a organização dos genes em operons. Várias condições de PCR foram testadas até ser padronizada a temperatura de 60° C como ótima para anelamento de cada um dos pares de oligonucleotídeos utilizados. Como controle de expressão dos genes em questão, foram realizadas paralelamente PCRs sob as mesmas condições, com o mesmo cDNA como molde e oligonucleotídeos amplificando seqüências internas das regiões codificadoras dos genes. Controles adicionais da reação foram feitos com RNA (controle negativo) e DNA genômico de PA14 (controle positivo) para cada um dos pares de *primers*.

### 3.4. Determinação dos inícios de transcrição dos operons por RACE 5'

A fim de se identificar os inícios de transcrição dos diferentes operons, ensaios de RACE 5' (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) foram realizados com o 3'/5' RACE kit, 2<sup>nd</sup> generation, da Roche Applied Science. Esse ensaio consiste em síntese de cDNA com

oligonucleotídeo iniciador específico para cada gene, seguido de síntese de cauda poli-A e duas PCRs com um dos oligonucleotídeos específicos do gene e o outro contendo um poli-T. A segunda PCR é denominada *nested* PCR por ser uma reamplificação, utilizando como molde o produto da primeira amplificação e pelo menos um *primer* mais interno aos utilizados na reação anterior. Todos esses passos foram realizados segundo protocolo do fabricante. Ao final de cada PCR, 10 µL do produto da reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%. O produto da segunda PCR purificado com o kit Amicon Microcon PCR (Millipore) ou o DNA contido na banda extraída do gel com o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) foram ligados no vetor pGem-T Easy (Promega), seqüenciados no Serviço de Seqüenciamento do Instituto de Química da USP e analisados para a localização das regiões promotoras.

### **3.5. Confirmação do início de transcrição de *cupD* por ensaio de extensão de oligonucleotídeo**

O oligonucleotídeo “44 race 2” (tabela 3), complementar aos nucleotídeos + 91 a + 74 de *cupD1* foi marcado na extremidade 5' com [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP em uma reação com a T4 polinucleotídeo quinase (Fermentas) e hibridizado com 35 µg de RNA total isolado das linhagens PA14/pJSG e PA14/pJSG39, crescidas a 28°C, numa DO<sub>600nm</sub>=1,0. O anelamento foi realizado a 50°C por aproximadamente 16 horas em 80% de formamida em PIPES (piperazine-*N,N'*-bis(ethanosulfonic acid)) 40 mM, pH 6,4, contendo 400 mM de NaCl e 1 mM de EDTA. Os ácidos nucléicos foram precipitados em etanol 100% e suspensos em 50 µL da reação de transcrição reversa com a enzima Improm II (Promega), segundo protocolo do fabricante. O oligonucleotídeo anelado foi estendido a 50°C por 2 horas e a enzima, inativada por 15 minutos a 70°C. A seguir, o RNA foi digerido com 30 µg de RNase A por 30 minutos a 37°C. O cDNA remanescente foi tratado com fenol:clorofórmio (1:1 V/V),

precipitado com etanol, suspenso em 4 µL de água e 2 µL de “Stop Solution” do kit de seqüência e analisado por eletroforese em gel de seqüenciamento desnaturante seguida de exposição a uma tela sensível a radiação e detecção no aparelho STORM (GE Healthcare). Como referência no gel, foi usada a reação de seqüência feita com o kit *fmol DNA Cycle Sequencing System* (Promega), utilizando o mesmo oligonucleotídeo “44 race 2” marcado radioativamente e tendo como molde um fragmento de DNA de 366 pb, correspondente à região a montante de *cupD1* e o início de sua região codificadora.

### **3.6. Análise da expressão de *cupD1*, *cupD2* e *cupD5* nos mutantes para *pvrS*, *pvrR*, *rcsC* e *rcsB* por RT-PCR quantitativo**

A expressão dos genes *cupD1*, *cupD2* e *cupD5* foi analisada nas diferentes linhagens (selvagem e mutantes para *pvrS*, *pvrR*, *rcsC* e *rcsB*) por ensaios de RT-PCR quantitativo. Esses genes codificam para supostas fímbrias da via “chaperone-usher” e são provavelmente regulados pelos sistemas de dois componentes na vizinhança (*pvrSR* e *rcsCB*).

O RNA total das células crescidas em meio LB a 37°C ou a 28°C em  $DO_{600}=1$  (fase exponencial) foi extraído, tratado com DNase I (Promega ou Fermentas) e utilizado como molde para a síntese de cDNA com a enzima Improm II (Promega) e oligonucleotídeos randômicos. O cDNA foi então amplificado com oligonucleotídeos específicos para os genes *cupD1*, *cupD2* e *cupD5* com o SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) em triplicatas técnicas no 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems), utilizando o seguinte programa: 60°C por 2 minutos; 95°C por 10 minutos; 40 ciclos de 95°C por 15 segundos; 60 °C 1 minuto . As taxas de expressão foram calculadas de acordo com o método de  $-2^{\Delta\Delta C_t}$  (Livak e Schmittgen, 2001). O gene *nadB* foi utilizado como normalizador.

Para o cálculo  $\Delta\Delta C_T$  ser válido, as eficiências de amplificação dos genes alvo e do normalizador devem ser aproximadamente iguais. Isso foi verificado observando-se como o  $\Delta C_T$  variava conforme a diluição do cDNA molde e construindo um gráfico do  $\Delta C_T$  ( $C_T$  do

gene alvo –  $C_T$  do gene normalizador) contra o logaritmo da diluição do cDNA, cuja inclinação da reta deve ser próxima de 0, segundo (Livak e Schmittgen, 2001).

### 3.7. Expressão e purificação da proteína recombinante RcsB-His

Várias condições foram testadas para se obter RcsB recombinante na forma solúvel. Para cada condição de lise, 50 mL de LB contendo 100µg/mL de ampicilina foram inoculados com 800 µL de cultura de *E. coli* DH5α ou BL21 carregando o plasmídeo pRB204 crescida em LB com ampicilina “overnight”. Essa cultura foi incubada sob agitação de aproximadamente 200 rpm, a 37° até atingir uma  $DO_{600\text{ nm}}$  de 0,5 – 0,8, quando 0,6 – 1,0 mM de isopropil-tiogalactopiranosídeo (IPTG) foi adicionado para induzir a expressão de RcsB. Antes da indução, foi retirada uma alíquota para controle negativo, a qual foi centrifugada e suspensa em tampão de amostra para SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Após esse passo, as condições foram variadas, sendo que algumas culturas foram incubadas a 37°C por 3 horas, outras a 30°C por 16 horas, a 27°C por 16 horas e outras, ainda, a 20°C por 16 horas. Após o tempo de incubação, alíquotas para controle positivo da indução foram retiradas e o restante da cultura foi centrifugado para obtenção do precipitado, o qual foi submetido a 4 pulsos de sonicação de 30 segundos em 2 mL de tampão de lise. Além da extração por sonicação, também foi testada a lise mecânica das células por *French press*. Para teste, foram utilizados três diferentes tampões em culturas distintas, crescidas sob as mesmas condições (tampões A, B e MES/HEPES, na tabela 4). Em todos os tratamentos, foram adicionados aos tampões 150 µg/mL do inibidor de protease PMSF (fluoreto de fenil metil sulfonil) antes da sonicação ou da lise mecânica. Algumas alíquotas submetidas à sonicação com o tampão A foram incubadas com ácido deoxicólico (DOC) 2% durante 10 minutos a temperatura ambiente, enquanto as alíquotas não tratadas com DOC foram mantidas no gelo. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 20 minutos, a 4°C. Após a centrifugação,

precipitados e sobrenadantes foram separados e uma alíquota de cada um foi misturada à mesma quantidade de tampão de amostra para eletroforese 2 vezes concentrado, para os sobrenadantes e 1 vez para os precipitados. As amostras de células inteiras do tempo 0 de indução, induzidas, e os lisados (precipitados e sobrenadantes, separadamente) foram submetidos a SDS-PAGE em gel 12%, a 200V, por aproximadamente 50 min.

Quando a análise do perfil obtido revelou que a maior parte da proteína induzida permanecia na fração insolúvel (nos precipitados), foi realizado um protocolo de purificação de proteínas dos corpos de inclusão, partindo dos precipitados após sonicação. Os precipitados de 50 mL de cultura foram incubados em 400 µL de tampão de lise C (tabela 4) por 10 minutos, após os quais as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. Esse procedimento foi repetido 4 vezes. Após essa lavagem, foram adicionados ao precipitado 500 µL de tampão de lise A contendo sódio N-lauril sarcosil (SKL) 0,3% e essa mistura foi incubada por 1 a 3 horas, antes de ser centrifugada e o sobrenadante guardado para análises por SDS-PAGE. Os géis revelaram uma maior quantidade da proteína induzida de cerca de 28 kDa na fração solúvel. Foi corrido um gel preparativo com todo o material solúvel obtido da purificação. Após a SDS-PAGE, as bandas entre 25 e 28 kDa referentes à RcsB foram cortadas do gel e eluídas em água Milli-Q por 16 horas antes de serem submetidas a diálises (16, 16, 4 e 2 horas) contra tampão PBS contendo SKL 0,3% somente na primeira diálise e à concentração com filtros Centriprep 10 Amicon (Millipore). Foi testado paralelamente um protocolo desnaturante de solubilização da proteína, submetendo o pellet diretamente da cultura (sem sonicar) à incubação em um tampão com uréia 8 M sob agitação e a temperatura ambiente.

As etapas de indução, extração e purificação também foram testadas com células de *E. coli* DH5α e BL21 carregando o plasmídeo pGEX com o inserto referente à região codificadora de RcsB fusionado a uma cauda de GST, com o objetivo de solubilizar a proteína

recombinante mais facilmente. A expressão de RcsB nessas células foi induzida conforme descrito para a proteína com cauda de poli-histidina e a extração também foi testada com sonicação e lise mecânica, porém na etapa de purificação a resina de níquel foi substituída pela resina de afinidade adequada (glutathiona sefarose), com os tampões indicados pelo fabricante (GE Healthcare).

**Tabela 4.** Tampões usados na extração e purificação da proteína RcsB recombinante

<b>Tampão</b>	<b>Composição</b>	<b>Referência</b>
<b>A</b>	Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 0,5 mM, NaCl 50 mM e glicerol 5%	(Susin <i>et al.</i> , 2004)
<b>B</b>	$\beta$ -mercaptoetanol 7mM, sacarose 25% e Tris-HCl 50 mM pH 8	(Guzzo <i>et al.</i> , 2006)
<b>MES/HEPES</b>	MES 20mM, HEPES 20 mM; pH 7,5	(Kelm <i>et al.</i> , 1997)
<b>Tampão desnaturante</b>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 100 mM, Tris HCl 10 mM e uréia 8M – pH ajustado para 8 com NaOH	Manual “ <i>The Qiaexpressionist</i> ” (Qiagen)
<b>PBS</b>	NaCl 8 g/L, KCl 0,2 g/L, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O 0,77 g/L e KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,2 g/L	(Ausubel <i>et al.</i> , 1996)

### 3.8. Produção de anticorpo policlonal contra RcsB

Para a obtenção do soro policlonal, um coelho fêmea de 1,5 kg foi inoculado de forma subcutânea, com um macerado de gel de poliacrilamida em PBS contendo 300 ng de RcsB-His e uma emulsão do adjuvante de Freund completo (1:1 v/v). A dose de reforço, contendo 500 ng da proteína em gel de poliacrilamida e PBS com uma emulsão do adjuvante de Freund incompleto (1:1) foi aplicada duas semanas após a primeira imunização. Dez dias após o reforço, uma alíquota do sangue do coelho foi retirada e processada para obtenção do soro. Esse processamento consistiu em incubação por 30 minutos a 37°C, seguida de 30 minutos no gelo e centrifugação por 30 minutos a 4000 x g. O soro obtido foi armazenado a -20°C para em seguida ser testado quanto sua reatividade contra a proteína de interesse (descrito abaixo).

### 3.9. Análise da indução da proteína RcsB-His recombinante por *western blot*

Para confirmar a indução de RcsB-His, os géis de poliacrilamida submetidos a SDS-PAGE nas condições descritas acima tiveram seu conteúdo transferido para membranas de nitrocelulose a 45mA, 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%) para permitir a marcação da referência de peso molecular e descoradas com água destilada. As membranas foram bloqueadas por 30 minutos em TBS (Tris-HCl 10 mM pH 8 e NaCl 150 mM) contendo 5% de leite desnatado. A solução foi trocada e o anticorpo anti-His tag monoclonal foi adicionado na diluição 1:1000 em TBS-leite. A diluição do anticorpo policlonal anti-RcsB foi testada entre 1:300 e 1:5000 em TBS e TBS-leite. Após o tempo de incubação (de 2 a 16 horas), as membranas foram lavadas por 5 minutos duas vezes em TBS-T (TBS adicionado de 0,05% de Tween 20) e uma vez em TBS, procedendo-se então a incubação com 1:10000 do anticorpo secundário anti IgG de camundongo ou 1:30000 do anti IgG de coelho conjugados com fosfatase alcalina, seguindo-se nova lavagem como descrito acima. As membranas foram reveladas com 150 µL NBT (nitrobluetetrazolium) 10mg/mL e 50 µL BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) 50mg/mL em 5mL 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. Ensaio de retardamento de migração em gel de poliacrilamida (*gel shift*)

Tentativas de otimização desses ensaios foram realizadas visando estudar a ligação de RcsB à região promotora de *cupD*. A sonda utilizada nesses ensaios foi um fragmento de 319 pb amplificado a partir do DNA genômico de PA14 com os oligonucleotídeos iniciadores p44 Hind e p44 Bam (tabela 3) contendo 44 pb do início da região codificadora de *cupDI* e cerca de 275 pb da região a montante do primeiro códon. Esse produto de PCR foi marcado com [ $\gamma$ -

<sup>32</sup>P] ATP e T4 polinucleotídeo quinase (Fermentas), segundo protocolo do fabricante. O fragmento marcado foi incubado com concentrações variadas de proteínas totais (de 30 a 750 µg) presentes no extrato de células tanto de *E. coli* DH5α superexpressando RcsB-His, quanto de *Pseudomonas aeruginosa* PA14/pJSG39 superexpressando RscB. Os controles negativos para cada caso foram extrato de DH5α transformada com o plasmídeo pPROEX sem inserto e extrato de RL039/pJSG, respectivamente. Os ensaios foram realizados com extratos totais, com base em protocolos da literatura (Wade *et al.*, 2005), devido à falta de RcsB nativa e purificada até a realização desses experimentos. Foram testados vários tampões de ligação (tabela 5) num volume final de reação de 30 µL, algumas dessas reações contendo 10 mM de acetil fosfato para promover a ativação de RcsB por autofosforilação, segundo protocolo de (Schroder *et al.*, 1994) e/ou 1 µL da sonda não marcada atuando como inibidor competitivo, de forma que todas as condições fossem experimentadas para cada concentração de proteína em cada tipo de extrato e tampão testados. Após o tempo de incubação de 20 minutos à temperatura ambiente, as reações de ligação foram aplicadas em um gel de poliacrilamida 6% em TBE 1x não desnaturante e a corrida foi procedida a 4°C em TBE 1x a 20mA por cerca de 4 horas. Os géis foram secos a vácuo sobre papel Whatman 3MM a 70°C por duas horas e expostos num sistema sensível a fósforo.

**Tabela 5. Tampões de ligação usados nos ensaios de *gel shift***

<b>Composição</b>	<b>Referência</b>
Tris-HCl 10mM (pH 7,9), MgCl <sub>2</sub> 10mM, DTT 1 mM, KCl 100 mM, glicerol 10%, 1 µg DNA de esperma de salmão, com e sem 10 µg/µL de BSA	Dekimpe e Déziel, comunicação pessoal
Tris-HCl 10mM (pH 7,9), MgCl <sub>2</sub> 10mM, DTT 1 mM, KCl 40 mM, glicerol 10%, 1 µg DNA de esperma de salmão, 10 µg/µL de BSA	Dekimpe e Déziel, comunicação pessoal
Tris-HCl 10mM (pH 7,9), MgCl <sub>2</sub> 10mM, DTT 2 mM, NaCl 100mM, glicerol 10%, 1 µg DNA de esperma de salmão	(Susin <i>et al.</i> , 2004)
Tris-HCl 10mM (pH 7,5), MgCl <sub>2</sub> 10mM, DTT 0,1 mM, KCl 120mM, glicerol 10%, 1 µg DNA de esperma de salmão, 10 µg/µL de BSA	Braz e Marques, comunicação pessoal

### 3.11. Otimização dos ensaios de patogenicidade em *Dictyostelium discoideum*

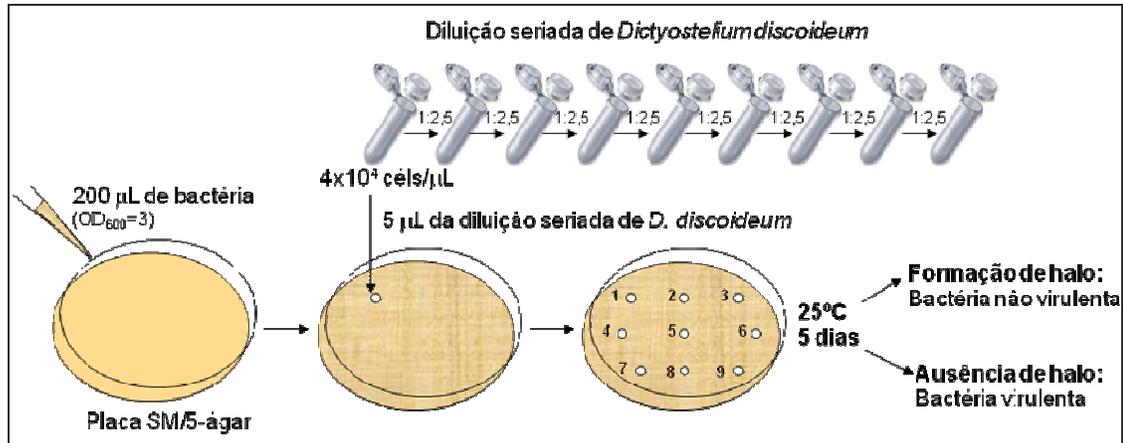
Os ensaios foram realizados segundo protocolo modificado de Cosson e colaboradores (Cosson *et al.*, 2002) e foram sendo otimizados de acordo com a observação dos resultados. Os mutantes de deleção de *P. aeruginosa* para os genes *pvrR*, *pvrS*, *rscC* e *rscB*, que codificam proteínas de sistemas de dois componentes e mutantes por transposon em *cupD2*, *cupA*, *cupB* e *cupC* (codificando fímbrias do sistema “chaperone-usher”) foram testados para sua capacidade de impedir o crescimento de *Dictyostelium discoideum*. A linhagem selvagem de *P. aeruginosa* PA14 foi usada como controle positivo para virulência. Como controle negativo foi utilizada a linhagem PA14 *lasR::Gm*, baseado em dados da literatura que descrevem a importância de genes relacionados a quorum sensing neste sistema (Cosson *et al.*, 2002; Pukatzki *et al.*, 2002). Para a validação do método, foram testados mutantes para uma metiltransferase comprovadamente menos virulentos em outros modelos de hospedeiro (Apidianakis *et al.*, 2005; An *et al.*, 2008). Como um controle negativo adicional, foram utilizadas placas de *K. aerogenes*, uma bactéria conhecidamente inócua para *D. discoideum*, sendo usada rotineiramente para a manutenção de culturas da ameba.

Células de *P. aeruginosa* provenientes de uma colônia isolada em uma placa LB-ágar foram inoculadas em 3 mL de LB e incubadas em um agitador a 200 rpm e a 37°C por aproximadamente 16h. Em seguida, as culturas foram ajustadas para uma  $DO_{600\text{ nm}}$  de 0,1 em meio LB novo e incubadas sob as condições descritas acima até alcançar uma  $DO_{600\text{ nm}}$  final de 3,0 (UFC =  $10^8$ ). 200 µL dessas culturas foram então plaqueados em aproximadamente 25 mL de SM-ágar. Para o controle negativo foram plaqueados 200 µL de uma cultura *overnight* de *K. aerogenes*, crescida sob as mesmas condições que as de *Pseudomonas*.

Células de *D. discoideum* crescidas em meio líquido HL/5 (tabela 3) e incubadas a 22°C sob agitação de 200 rpm (Chisholm *et al.*, 2006) foram coletadas por centrifugação (2000 rpm por 4 min a 12 °C ), ressuspendidas em tampão Sørensen ( $KH_2PO_4$  2g/L;

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,27 g/L (Sussman, 1987)) e submetidas a 8 diluições seriadas de 1:5, iniciando-se com  $10^4$  células/ $\mu\text{L}$ . Foram pipetados 5  $\mu\text{L}$  de cada diluição nas placas com bactéria e todo o sistema foi incubado a  $27^\circ\text{C}$  durante 5 dias, após os quais se observou a formação ou não de halos, correspondentes ao crescimento de *D. discoideum* sobre o tapete de bactérias menos ou mais virulentas, respectivamente.

Sob o cenário descrito acima, a formação de halos por *D. discoideum* não podia ser observada, nem mesmo nas maiores concentrações, devido às condições permitirem um crescimento exacerbado das bactérias, cujo desenvolvimento ocorre muito mais rapidamente que o da ameba. Assim, uma das adaptações foi diminuir a quantidade do inóculo de *Pseudomonas* na placa, diluindo de 10 a 50 vezes a cultura na  $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$  igual a 3,0. Porém, o crescimento rápido das bactérias ainda parecia “sufocar” os halos de *D. discoideum* em formação. Uma tentativa de sucesso foi diminuir a quantidade de nutrientes disponível na placa, de forma a retardar o crescimento da bactéria, sem prejudicar o desenvolvimento da ameba, que não depende dos nutrientes presentes no meio de cultura, mas sim das bactérias, das quais se alimentam. Com base nessas premissas, o meio SM-ágar utilizado nas placas foi substituído por SM/5-ágar. Ensaios da forma antiga foram realizados em paralelo e os resultados mostraram ser o meio diluído mais eficiente, pois agora era possível visualizar halos pelo menos na primeira diluição de *D. discoideum* em todas as linhagens de *Pseudomonas*. Como não eram observadas diferenças entre as linhagens, talvez porque a segunda diluição de *D. discoideum* já contivesse poucas células, os ensaios começaram a ser realizados utilizando a maior concentração de ameba de  $4 \times 10^4$  células/ $\mu\text{L}$  e chegando a 9 diluições de 1:2,5. A metodologia otimizada é representada pelo esquema na figura 5.



**Figura 5.** Representação esquemática do ensaio de virulência de *Pseudomonas aeruginosa* contra o hospedeiro-modelo *Dictyostelium discoideum* (Método adaptado de Cosson *et al.*, 2002).

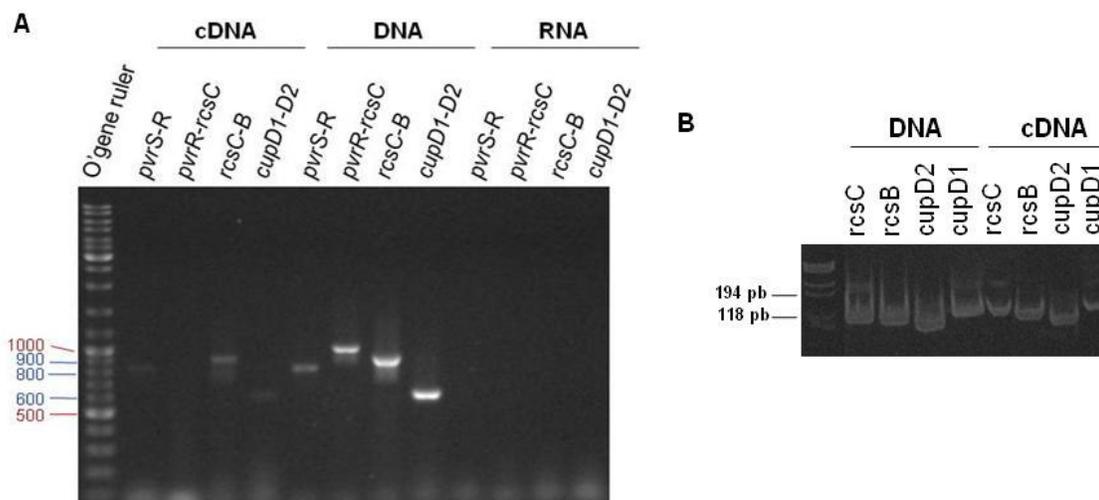
Ao final do experimento, como descrito em Alibaud *et al.*, 2008, foi montada uma tabela onde se atribui um *score* que é o valor da virulência relativa, referente ao número de halos formados. Por exemplo, uma linhagem de *P. aeruginosa* que permite a formação de 5 halos de *D. discoideum*, recebe um *score* igual a 5, logo, a bactéria com maior *score* é a menos virulenta, e vice-versa.

## 4. Resultados

### 4.1. Investigação da disposição em operons dos genes localizados entre as DR2

A procura por regiões amplificáveis do mRNA entre os genes localizados entre as duas seqüências repetidas diretas utilizando RT-PCR, conforme descrito nos materiais e métodos, revelou para os sistemas de dois componentes, a presença de dois amplicons: um entre os genes *pvrS* e *pvrR*, e outro entre *rscC* e *rscB*, mas nenhuma banda foi detectada entre *pvrR* e *rscC*, indicando que essa região é composta por dois operons distintos, *pvrSR* e *rscCB* (figura 6A). Para os genes relacionados à fimbria montada pelo sistema “chaperone-usher”, os resultados mostraram, conforme o esperado, uma banda correspondente ao transcrito contínuo de *cupD1* e *cupD2*, devido à sua disposição em operon (figura 6A). Entretanto, não foi detectado nenhum amplicon para uma região contínua que compreendesse *cupD2* e *cupD5* (dado não mostrado), o que não significa, necessariamente que esses genes não estão organizados em operon, mas pode ser consequência de uma variação na estabilidade de parte do mRNA.

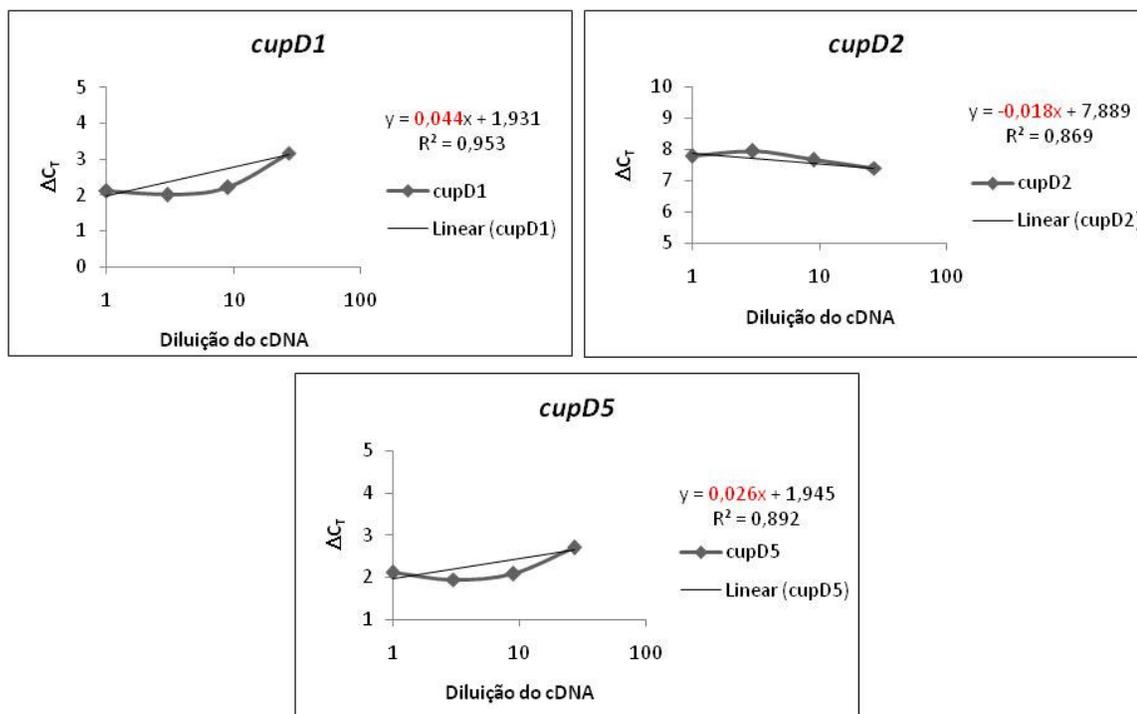
Paralelamente aos ensaios descritos acima, para afastar a hipótese de que fragmentos não seriam amplificados devido ao seu baixo nível de expressão, foram realizados RT-PCRs com iniciadores internos aos genes em estudo. Os géis contendo os produtos dessas reações apresentaram bandas referentes a todos os genes testados (figura 6B), confirmando que o nível de expressão dos mesmos é detectável nas condições do ensaio.



**Figura 6. Determinação da estrutura dos operons *pvrSR*, *rcsCB* e *cupD1-2*.** **A.** As regiões intergênicas de *pvrSR* (822 pb), *rcsCB* (910 pb) e *cupD1-2* (617 pb) foram amplificadas por PCR a partir de cDNA e detectadas em gel de agarose 1%. Controles positivos e negativos foram realizados em paralelo, utilizando como molde DNA genômico e RNA, respectivamente. O marcador de peso molecular utilizado foi O'Gene Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas). **B.** Amplicons correspondendo às regiões codificadoras de cada um dos genes em estudo foram detectados em gel de poliacrilamida 8%, mostrando que todos os genes são expressos sob as condições dos experimentos.  $\phi$ X *Hae*III (Fermentas) foi utilizado como marcador de peso molecular.

#### 4.2. Validação do método $-2^{\Delta\Delta C_t}$ para cálculo dos resultados de RT-PCR quantitativo

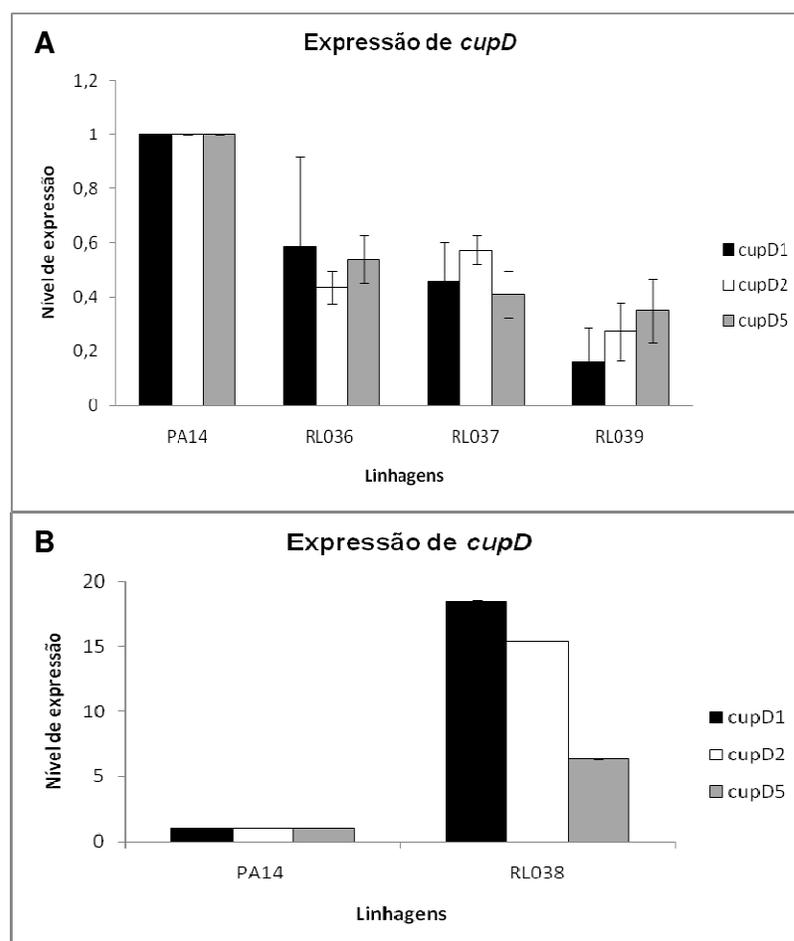
O gráfico do logaritmo da diluição do cDNA *versus*  $C_T$  obtido conforme descrito na sessão 3.6 revelou uma reta com valor absoluto de inclinação próximo a 0 para os três genes-alvo testados contra o gene normalizador, *nadB*, sendo 0,044 para *cupD1*, -0,018 para *cupD2* e 0,026 para *cupD5* (figura 7). Isso significa que as eficiências de amplificação de *cupD1*, *cupD2* e *cupD5* são similares à do gene referência e que o cálculo  $\Delta\Delta C_T$  para a quantificação relativa dos alvos pode ser usada.



**Figura 7. Validação do método  $-2^{\Delta C_t}$ .** A eficiência de amplificação dos genes alvo (*cupD1*, *cupD2* e *cupD5*) e do controle interno (*nadB*) foi verificada por ensaios de RT-PCR quantitativo. As três retas obtidas na plotagem dos gráficos mostraram um valor absoluto de inclinação próximo a 0 (em vermelho nos gráficos). O cDNA utilizado foi sintetizado utilizando o mesmo protocolo para os demais ensaios de RT-PCR, com RNAs extraídos de culturas de *P. aeruginosa* PA14 crescidas a 37°C até a  $DO_{600nm}=1,0$ .

#### 4.3. Atuação dos sistemas de dois componentes na expressão de *cupD*

Os ensaios de RT-PCR quantitativo para verificar o efeito de PvrS, PvrR, RcsC e RcsB na expressão de *cupD* revelaram a atuação dessa última como ativador da transcrição do operon *cupD*, uma vez que os três genes testados mostraram uma queda no nível de seu RNA mensageiro no mutante nulo para RcsB, em comparação com a linhagem selvagem (figura 8A). Entretanto, houve um aumento significativo nos transcritos de *cupD1*, *cupD2* e, em menor proporção, de *cupD5* na ausência de RcsC, indicando a regulação negativa dessa histidina-quinase sobre o operon *cupD* (figura 8B). PvrS e PvrR parecem atuar positivamente na expressão dos genes da fímbria, porém em menor grau que RcsB. Foram realizados mais de três experimentos independentes em triplicatas técnicas.



**Figura 8. Efeito dos sistemas de dois componentes na transcrição de *cupD*.** O ativador transcricional RcsB ativa a expressão de *cupD1*, *cupD2* e *cupD5*, enquanto a histidina quinase RcsC desempenha um papel oposto na transcrição desses genes. O sistema de dois componentes PvrSR parece regular positivamente a expressão de *cupD*. A linhagem RL039, mutante nula para RcsB, mostra níveis de mRNA de *cupD* de 20 a 40% da linhagem selvagem (A), enquanto RL038 ( $\Delta rcsC$ ) revela um aumento de cerca de 18, 15 e 6 vezes para *cupD1*, *cupD2* e *cupD5*, respectivamente (B). Notar a diferença na escala de A e B. Figura representativa de 3 ensaios independentes de qRT-PCR realizados em triplicatas técnicas, a partir de RNA total extraído de culturas em meio líquido a 37°C e em  $DO_{600nm}=1,0$ .

#### 4.4. Análise dos inícios de transcrição de *pvrS*, *rscC* e *cupD1* por RACE 5'

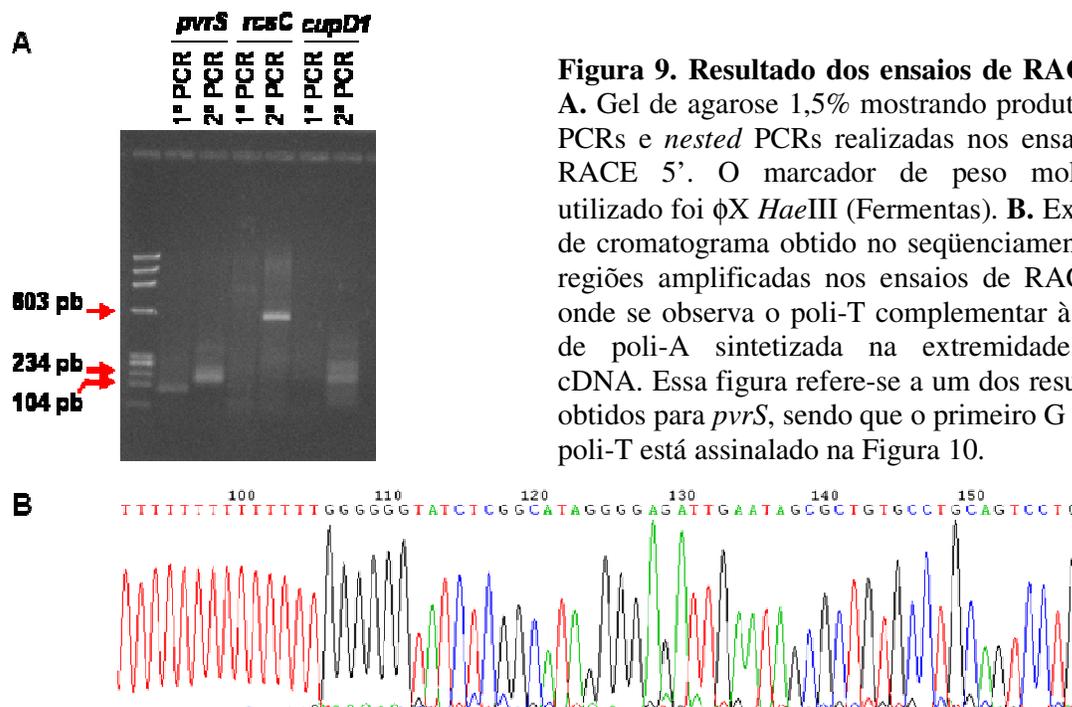
Conhecer os inícios de transcrição dos genes de interesse é importante para a determinação das seqüências promotoras e para caracterização de sua região regulatória, possibilitando assim estudos detalhados do controle da expressão desses genes. Anteriormente

no nosso laboratório, ensaios de extensão de oligonucleotídeos marcados radiotivamente foram realizados para a determinação dos inícios de transcrição de *cupD1*, *cupD2*, *pvrS* e *rcsC*, utilizando como molde RNA obtido da linhagem PA14. Porém, possivelmente devido à baixa expressão desses genes nas condições testadas, apenas bandas pouco intensas foram detectadas e não foi possível confirmar sua especificidade nesses ensaios.

A fim de se aumentar a especificidade e a sensibilidade, foram realizados ensaios de RACE 5', visando determinar com maior precisão os inícios de transcrição dos genes *pvrS*, *rcsC* e *cupD1*. Pelo menos 28 clones obtidos do ensaio de cada um dos genes foram seqüenciados. Porém, nem todos esses clones resultaram em cromatogramas de boa qualidade, como o mostrado no exemplo da figura 9B. A tabela 6 mostra a quantidade de seqüências satisfatórias obtidas a partir de um número total de clones seqüenciados.

**Tabela 6.** Dados dos experimentos de RACE 5'

Gene	Nº de clones seqüenciados	Número de bases obtidas como início	Observações sobre as bases obtidas como início
<i>pvrS</i>	43	26	13 na mesma região com muitos G
<i>rcsC</i>	101	54	dispersas em 450 pb
<i>cupD1</i>	28	5	3 na mesma base
<i>cupD2</i>	32	14	7 repetições na mesma base



### Figura 9. Resultado dos ensaios de RACE 5'.

A. Gel de agarose 1,5% mostrando produtos das PCRs e *nested* PCRs realizadas nos ensaios de RACE 5'. O marcador de peso molecular utilizado foi  $\phi$ X *Hae*III (Fermentas). B. Exemplo de cromatograma obtido no seqüenciamento das regiões amplificadas nos ensaios de RACE 5', onde se observa o poli-T complementar à cauda de poli-A sintetizada na extremidade 3' do cDNA. Essa figura refere-se a um dos resultados obtidos para *pvrS*, sendo que o primeiro G após o poli-T está assinalado na Figura 10.

A análise do produto da PCR com o oligonucleotídeo mais externo específico para *pvrS* no gel de agarose 1% revelou a amplificação de uma banda maior do que a banda majoritária observada na primeira PCR (figura 9A). Provavelmente, a banda visível no gel correspondente ao produto da primeira reação não é uma banda específica. Essa, por sua vez, devia estar presente em quantidade menor, não detectável no gel, embora capaz de servir como molde e gerar uma quantidade de produto específico visível na segunda PCR. Para esse gene, o produto purificado da segunda reação de amplificação foi clonado no pGEM-T easy e as seqüências analisadas revelaram o início de transcrição em uma região rica em G a cerca de 109 pb do início de tradução e a 158 pb do último oligonucleotídeo iniciador usado, o que condiz com a banda maior observada no gel (figura 10). Cerca de 10 e 35 pares de base a montante dessa região rica em G, como assinalado na figura 10, encontram-se seqüências consenso de *P. aeruginosa* para a ligação de sigma 70 (Potvin *et al.*, 2008).

AGATGTTCAAACGTTCCCTATAGGAAACTGTGTTGTGAACTCCATAGAACTCCCCTTTTACAC  
 GATGCAGGTTGTTGCTTGGAGTGTGTATCCACTAGTTCTCGGGGAGGCCGTCAGTGTAGATT  
 TTTTGGGGGGTATCTCGGCATAGGGGGGATTGAATAGCGCTGTGCCTGCAGTCCTGAGACC  
 TCATTAGGAATCATCTGATAGAGGGAATTTTCCATGCCGTCAGTCTTTCGGCAtg

**Figura 10. Determinação do início de transcrição de *pvrS*.** O códon inicial de *pvrS* está representado em letras minúsculas e a possível sequência Shine-Dalgarno, em cinza. A região onde treze dos transcritos seqüenciados se iniciaram está sombreada, sendo a fonte maior correspondente a cinco destes. As seqüências consenso de ligação a  $\sigma^{70}$  posicionadas a -10 e -35 estão sublinhadas.

O produto da *nested* PCR de *rcsC* revelou-se no gel como um fragmento de cerca de 600 pb (figura 9A), indicando que o início de transcrição desse gene estaria dentro da seqüência codificadora de *pvrR*, indo de encontro a informações obtidas por experimentos de *primer extension* realizados anteriormente e por predições de promotores por ferramentas de bioinformática. Entretanto, os clones obtidos após ligação do produto de PCR no pGEM-T easy não revelaram inícios de transcrição tão distantes do ATG, de modo que correspondesse à banda de 600 pb observada no gel. Além disso, os resultados não convergiram para uma base, mas ao contrário, várias bases foram apontadas como início da transcrição, colocando em dúvida a eficiência da reação. Assim, com o objetivo de diminuir a inserção de fragmentos pequenos, possivelmente incompletos, que se ligariam mais facilmente ao vetor, o DNA de 600 pb foi extraído do gel e ligado no vetor de clonagem, gerando mais seqüências que foram analisadas em busca de um início de transcrição mais uniforme e mais distante do ATG. Ainda assim, nenhum inserto tão longo foi encontrado e as bases não foram coincidentes, sendo o resultado composto por 54 bases distribuídas ao longo de cerca de 450 pb (dado não mostrado). É importante ressaltar, entretanto, que a maioria das bases encontradas, mesmo mais próximas do início de tradução, já fazem parte da seqüência codificadora de *pvrR*.

Os produtos dos ensaios com *cupDI* apresentaram-se em duas bandas de tamanhos entre 240 e 100 pb, sugerindo dois inícios de transcrição (figura 9A). Essas PCRs foram repetidas duas vezes e o resultado foi reproduzível. Entretanto, a análise do início de

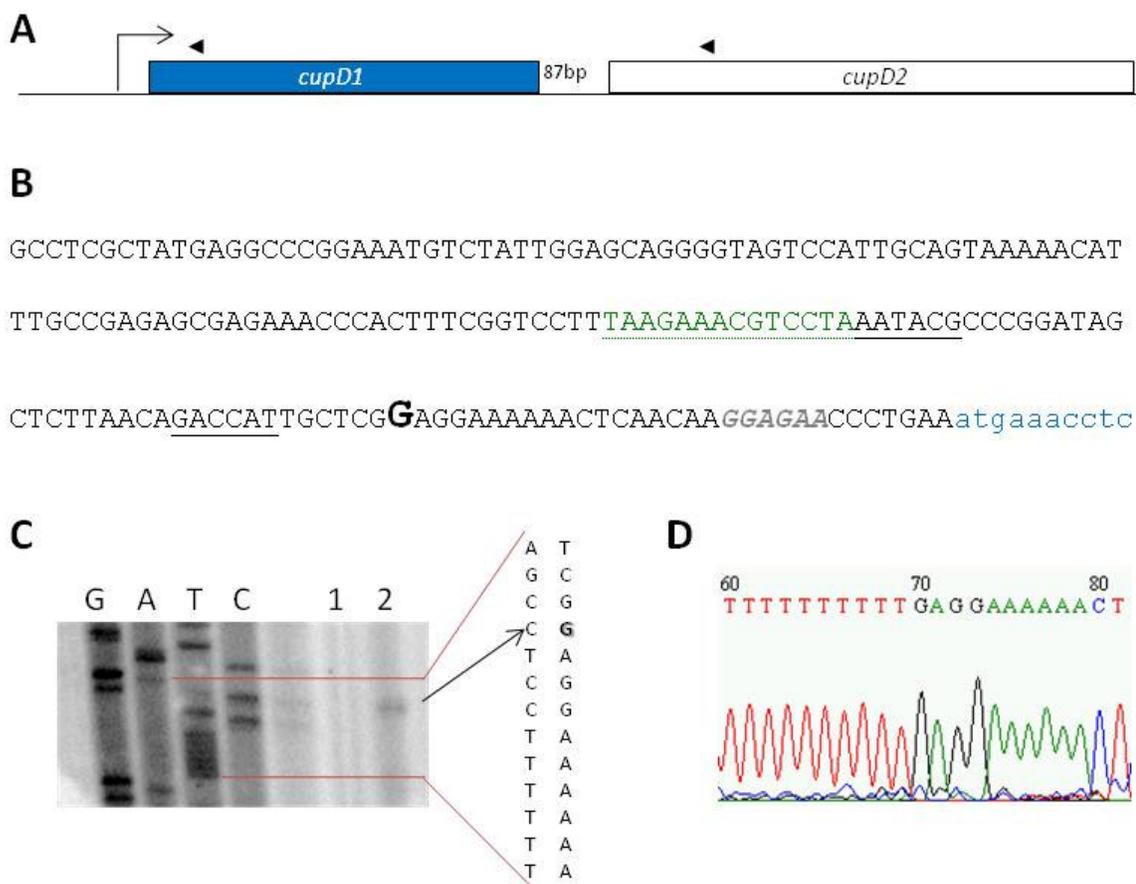
transcrição desse gene com a técnica de RACE foi prejudicada primeiro pela dificuldade em se obter clones com o inserto proveniente tanto do produto purificado da *nested* PCR, quanto extraído do gel (as duas bandas) e depois, pela escassez de seqüências boas, muito provavelmente devido ao alto conteúdo G+C dessa região. Mesmo com esses empecilhos, três clones de cinco que renderam seqüências boas convergiram para a mesma base a 22 pb do ATG, conforme mostrado na figura 11. Porém, esta posição faz parte de uma seqüência de seis adeninas, que podem ter se hidridizado com o oligo-dT utilizado nas amplificações e não corresponderem a um início verdadeiro do transcrito, mas serem parte interna dele, caracterizando um artefato inerente à metodologia empregada.

Procurando contornar a dificuldade encontrada na análise de *cup1* e baseado nos experimentos de RT-PCR, que indicaram a organização em operon de *cupD1* e *cupD2*, foram realizados ensaios de RACE 5' com oligonucleotídeos específicos para esse último gene. Surpreendentemente, os clones obtidos com os iniciadores para *cupD2* apresentaram insertos que compreendiam a região intergênica *cupD1-cupD2*, toda a região codificadora de *cupD1* e cerca de 30 pares de base a montante de *cupD1*, a 9 bp a montante do início potencialmente espúrio de *cupD1* descrito acima, provando assim que estes dois genes são transcritos num mRNA contínuo. O possível início de transcrição, a 31 pares de base a montante do ATG, e as regiões -10 e -35 estão mostrados na figura 11B. Essas regiões não apresentam identidade com consensos para fatores sigma estudados em *P. aeruginosa* até o momento.

Com base nas evidências de regulação positiva de *cupD* por RcsB, geradas pela observação dos resultados de RT-PCR quantitativo e dos domínios encontrados nessa proteína por bioinformática, a linhagem superexpressando RcsB construída por Gianluca Nicastro, PA14/pJSG39, foi usada em ensaios de extensão de oligonucleotídeo marcado para confirmar o início de transcrição de *cupD1* obtido por RACE 5'. Dessa forma, o problema da baixa expressão de *cupD*, responsável pela falta de sucesso dos experimentos desse tipo testados

anteriormente, foi contornado, uma vez que um aumento de 2000 vezes no nível de mRNA de *cupDI* foi detectado por RT-PCR quantitativo na linhagem PA14/pJSG39, em comparação com a linhagem selvagem carregando o plasmídeo vazio (dados de experimentos realizados pelo aluno Gianluca Gonçalves Nicastro).

Quando RNA de PA14/pJSG39 foi usado nesse ensaio para a reação de transcriptase reversa, uma única banda, correspondendo a 31 pares de base a montante do primeiro códon foi claramente visualizada, não só confirmando o resultado do RACE 5', mas também mostrando que os níveis do transcrito iniciado nessa região são regulados por RcsB (figura 11). Apesar de as regiões -10 e -35 relativas a esse início não apresentarem alta similaridade com nenhuma seqüência consenso de ligação de fator sigma, foi encontrado um motivo similar à região de ligação de RcsB no promotor p1 de *osmC* de *E. coli* imediatamente a montante da região -35 (Sturny *et al.*, 2003). Intrigantemente, essa região é mais parecida com a seqüência consenso de ligação do heterodímero RcsA-RcsB de *E. coli*, a qual é geralmente encontrada a cerca de 100 nucleotídeos a montante do início de transcrição. Embora não tenha sido caracterizada nenhuma proteína relacionada com RcsA de *E. coli* em *P. aeruginosa* e todas as evidências apontem para uma regulação dependente de um homodímero de RcsB, é relevante o fato de que dez bases, de catorze da região consenso de ligação de RcsA em *E. coli* sejam idênticas em *P. aeruginosa* PA14 na localização referente à região de ligação do homodímero RcsB.



**Figura 11. Região promotora e início de transcrição de *cupD*.** **A.** Organização de *cupD1-2*. Como cabeças de setas estão indicados os oligonucleotídeos iniciadores usados nos experimentos representados em C e D. Estão indicados também a região intergênica de 87 pb e o início de transcrição (seta quebrada). **B.** Região regulatória de *cupD*. A região codificadora de *cupD1* é mostrada em azul e letras minúsculas; a suposta Shine-Dalgarno aparece em cinza e o G correspondente ao início de transcrição é mostrado em fonte maior. As regiões -10 e -35 estão sublinhadas e o suposto sítio de ligação a RcsB está sublinhado e destacado em verde. **C.** Ensaio de extensão de oligonucleotídeo marcado, usando RNA total extraído de PA14/pJSG (raia 1) ou a linhagem superexpressando RcsB, PA14/pJSG39 (raia 2) e um iniciador marcado na extremidade 5' hibridizando na região codificadora de *cupD1*. A reação de seqüência usada como referência é marcada como GATC e tem um trecho indicado à direita com uma seta apontando o sítio de início de transcrição de *cupD*, que está destacado em negrito na fita complementar e pode ser visualizado também no resultado dos ensaios de RACE, representado em D. **D.** Exemplo de cromatograma de um clone do ensaio de RACE 5'. O cDNA foi originado de uma reação de transcriptase reversa com um iniciador complementar ao mRNA de *cupD2*. A seqüência de Ts à esquerda corresponde ao oligonucleotídeo adaptador e o G na posição 70 do cromatograma é a base onde se inicia a transcrição de *cupD*.

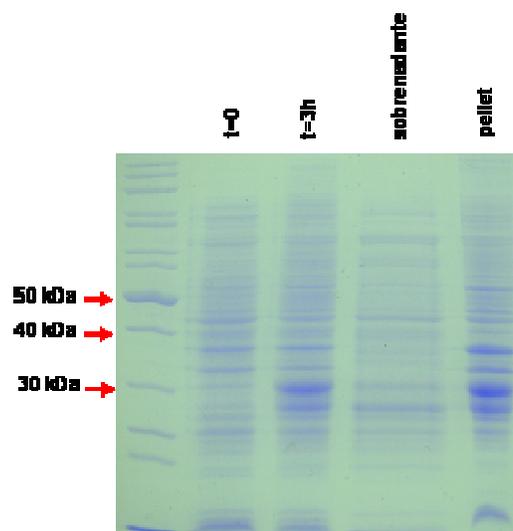
#### 4.5. Expressão e purificação da proteína recombinante RcsB-His

A melhor condição de indução de RcsB foi na linhagem de *E. coli* DH5 $\alpha$  com o plasmídeo pRB204 a 37°C por três horas, uma vez que a temperaturas mais baixas a expressão é, de fato, muito mais lenta, mas não de forma a permitir a maior solubilização da proteína, já que não foi detectada nenhuma banda referente à RcsB na fração solúvel dos lisados preparados sob essas condições, nem mesmo por *western blot*. Entretanto, mesmo na condição de indução apropriada, com o protocolo de sonicação para lise das células nos tampões A e B, apenas uma porção ínfima do total de RcsB produzido na célula foi detectada na fração solúvel, permanecendo a maior parte em corpos de inclusão. Curiosamente, a proteína permaneceu na fração insolúvel mesmo sob condições desnaturantes, com uréia 8M (figura 12). Um gel semelhante ao mostrado na figura 12 foi obtido para a extração por sonicação em cada um dos tampões e condições descritos na metodologia.

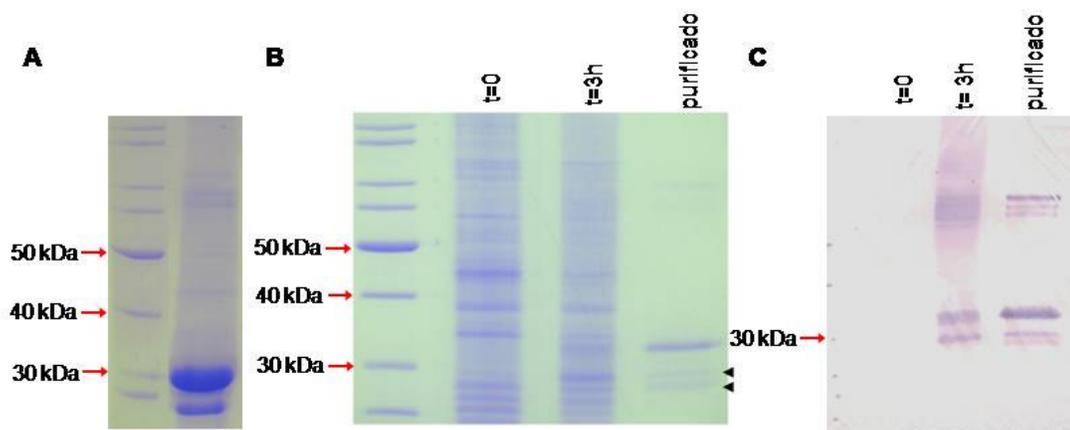
O protocolo de purificação de proteínas dos corpos de inclusão, utilizado para solubilizar e purificar a proteína em questão, mostrou-se eficiente na etapa de solubilização, mas o material obtido ainda não se apresentava puro (figura 13A). Apesar da etapa de extração a partir dos corpos de inclusão ter aparentado um bom rendimento, houve uma enorme perda da proteína nas etapas subsequentes de purificação, incluindo extração do gel preparativo, diálise e concentração. Existe a possibilidade de grande parte da proteína ter permanecido no filtro do sistema de concentração. Essa perda pode ser observada comparando-se o gel com o material imediatamente após a extração do pellet (figura 13A) e aquele com o material submetido às etapas de purificação (fig 13B).

Ainda tratando-se do produto da purificação, foi encontrada uma banda forte de tamanho superior ao esperado. Para confirmar se essa banda tratava-se de RcsB-His que, por algum motivo, durante as etapas de purificação poderia ter mudado a conformação e, assim migrar mais lentamente durante a eletroforese, foi realizado um ensaio de *western blot*, no

qual o anticorpo anti-His tag utilizado reconheceu tal banda, confirmando ser a proteína de interesse. Esse resultado revelou também três outras bandas de origem desconhecida, que permaneceram na parte superior do gel, seguindo o mesmo padrão das bandas de cerca de 30 kDa (figura 13C).



**Figura 12. Indução de RcsB-His em *E. coli* DH5α.** Gel de poliacrilamida 12% revelando as bandas referentes à proteína induzida RcsB-His recombinante (26,8 kDa) em 3 horas de indução. Após tratamento com uréia 8 M a maior parte da proteína induzida ainda foi encontrada na fração insolúvel (no precipitado ou pellet).



**Figura 13. Extração de RcsB-His dos corpos de inclusão.** **A.** Gel de poliacrilamida 12% revelando bandas de aproximadamente 28 kDa referentes à proteína RcsB-His extraída dos corpos de inclusão, antes das etapas subsequentes de purificação. **B.** Gel de poliacrilamida mostrando, na raia correspondente ao extrato dos corpos de inclusão purificado, bandas fracas de tamanho esperado para RcsB-His (destacadas com pontas de setas) e uma banda mais forte de tamanho maior que o esperado. **C.** western blot com anticorpo anti-His tag, confirmando que a banda maior encontrada no gel em B trata-se também de RcsB-His.

Numa tentativa posterior com o tampão MES/HEPES e lise mecânica das células foi obtida uma quantidade levemente maior de RcsB solúvel, detectada ainda somente com ensaios de *western blot* (dado não mostrado). A purificação dessa proteína extraída nesse último tampão mostrou-se eficiente, sendo eluída da resina de níquel com 400 mM de imidazol. Uma cultura de maior volume do que a usada para teste deverá render a quantidade de proteína purificada necessária para os ensaios de ligação a DNA, que serão repetidos nas etapas posteriores a esse trabalho.

#### **4.6. Produção de anticorpo policlonal contra RcsB**

Sob as condições descritas na seção 3.8, foram produzidos anticorpos policlonais capazes de reconhecer RcsB superexpressa tanto em *E.coli*, quanto em *P. aeruginosa* (dado não mostrado) com as condições ótimas para incubação sendo 1:1000 em TBS-leite sob agitação por 2 a 16 horas.

#### **4.7. Verificação da interação de RcsB com o promotor de *cupD* via ensaios de retardamento de migração em gel de poliacrilamida**

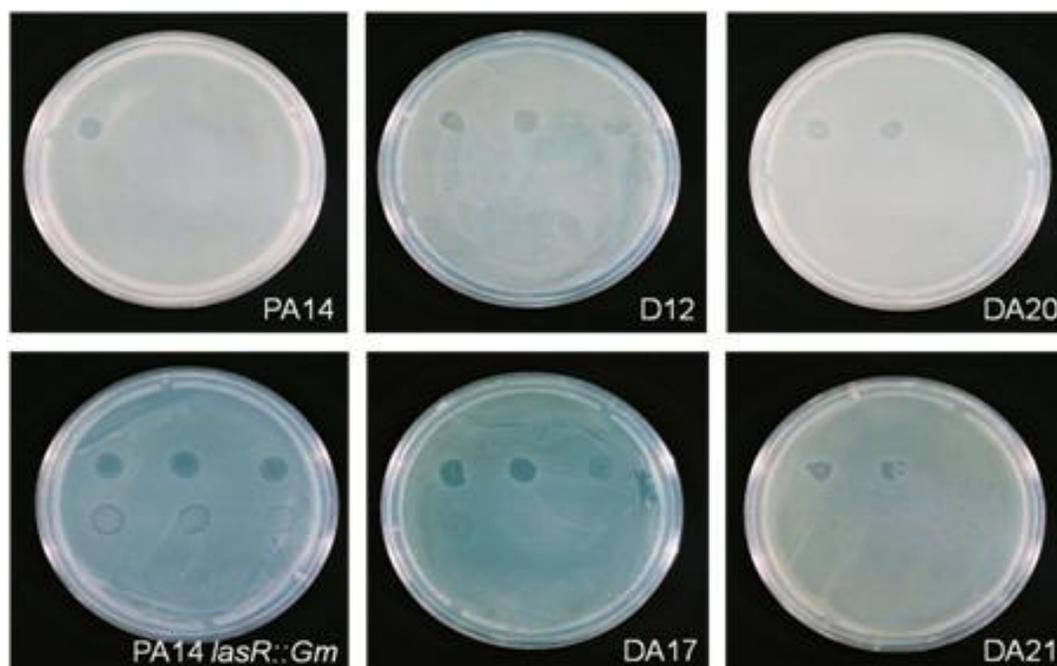
Como já citado na seção 3.10, os ensaios foram realizados com extrato de proteínas totais de células de *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* superexpressando a proteína de interesse. Em todas as condições testadas e tanto na presença como na ausência de acetilfosfato, um doador de fosfato comumente utilizado para a fosforilação *in vitro* de reguladores de resposta, não foi observada diferença na migração no gel da reação de ligação com os extratos ricos em RcsB, quando comparados à sonda pura ou aos extratos controle (dado não mostrado). Esse resultado negativo, entretanto, não significa necessariamente a ausência de

interação desse fator de transcrição com o promotor de *cupD1*, como será discutido em mais detalhes na seção 5.

#### 4.8. Ensaio de patogenicidade em *Dictyostelium discoideum*

Com a diminuição dos nutrientes e o aumento do número de células de *Dictyostelium* na placa, conforme descrito na metodologia, foi possível observar crescimento diferenciado das amebas nas linhagens distintas de *Pseudomonas aeruginosa*. As linhagens PA14 selvagem e mutantes por transposon em *lasR* e *rhlR* foram ensaiadas no modelo e os resultados se mostraram fiéis aos encontrados na literatura, com atenuação dos mutantes para genes de *quorum-sensing*, validando nossas adaptações ao protocolo para ensaio de virulência com *D. discoideum*. PA14 e PA14 *lasR::Gm* foram tomadas, então, como controles positivo e negativo para virulência, respectivamente, e usadas como referência para atribuição do nível de virulência das outras linhagens testadas. Esse nível foi determinado segundo a maior diluição de *Dictyostelium* capaz de formar halo no tapete de bactéria, atribuindo-se um valor de 0 a 9 de acordo com a maior ou menor virulência, respectivamente.

Os ensaios foram realizados com as linhagens mutantes em *pvrS*, *pvrR*, *rscC*, *rscB*, *cupD1* e *cupD2*, além de genes dos grupos *cupA*, *cupB* e *cupC*, sendo que o padrão de formação de halos observado em cada um desses mutantes não se distanciou muito do obtido com a linhagem selvagem, não permitindo afirmar uma redução significativa na virulência desses mutantes nesse hospedeiro-modelo (dado não mostrado). Entretanto, as linhagens D12 e DA17, ambas com deleções em PA14\_41070, se mostraram atenuadas, enquanto as linhagens correspondentes DA20 e DA21, em que o gene foi reinserido no genoma por recombinação homóloga, recuperaram a virulência a níveis próximos da linhagem PA14 (tabela 7 e figura 14).



**Figura 14. Formação de halo por células de *D. discoideum*.** Linhagens mutantes em *PA14\_41070* são atenuadas em virulência. Uma diluição seriada de *D. discoideum* foi aplicada sobre uma camada de células de *P. aeruginosa* e as placas observadas após cinco dias a 25°C. A linhagens PA14 e PA14 *lasR::Gm* foram tomadas como controles positivo e negativo para virulência, respectivamente. O número do último halo formado por *D. discoideum* foi utilizado como “score” de virulência (ver tabela 7).

**Tabela 7.** Níveis de virulência, de acordo com a quantidade mínima de células de *D. discoideum* capaz de formar halos no tapete de bactérias

Linhagem	Nº de células no ponto de maior diluição onde houve formação de halo	Virulência relative (“score”)
PA14	$2,0 \times 10^5$	1
D12	$5,1 \times 10^3$	5
DA20	$8,0 \times 10^4$	2
DA17	$5,1 \times 10^3$	5
DA21	$8,0 \times 10^4$	2
PA14 <i>lasR::Gm</i>	$3,3 \times 10^2$	8
<i>K. aerogenes</i>	$1,3 \times 10^2$	9

## 5. Discussão

### 5.1. Regulação de *cupD* pelos sistemas de dois componentes *pvrSR* e *rcsCB*

A localização dos genes dos sistemas de dois componentes e de *cupD* entre duas repetições diretas, juntamente com dados da literatura que demonstram a importância dos primeiros genes para a virulência (He *et al.*, 2004) e de relatos de regulação de outros grupos de genes de fímbrias por sistemas de dois componentes (Kulasekara *et al.*, 2005) fornecem uma base para a hipótese da regulação desses novos genes de fímbria *cup* por esses sistemas de dois componentes, ambos os grupos encontrados em uma ilha de patogenicidade presente em *Pseudomonas aeruginosa* PA14 e em outras linhagens dessa bactéria, porém ausente no primeiro genoma seqüenciado de *Pseudomonas*, a linhagem PAO1.

Para estudar a regulação de um gene ou de um grupo de genes é importante identificar e caracterizar sua região promotora. Um dos primeiros passos para essa caracterização foi definir de quantas unidades transcricionais tratavam-se os dois grupos de genes focados nesse trabalho. Ensaios de RT-PCR permitiram detectar a organização dos genes dos sistemas de dois componentes em dois operons distintos, cada unidade transcricional sendo capaz de expressar uma proteína quinase híbrida e um regulador de resposta. Com base no fato de que a quase totalidade dos genes de fímbrias *cup* caracterizados estão agrupados em operons (Nuccio e Baumler, 2007) e que a região intergênica de *cupD1-D2* não tem atividade promotora (dados não mostrados), o resultado positivo de RT-PCR para amplificar essa região era esperado. Por outro lado, esses dados e a observação de que os códons de terminação e início dos pares *cupD2-D3*, *cupD3-D4* e *cupD4-D5* estão sobrepostos leva-nos a crer que os resultados negativos obtidos nas tentativas de amplificação de um transcrito contínuo entre *cupD2* e *cupD5* tenham sido conseqüência de problemas experimentais ou do fato de que os

transcritos posicionados mais a 3' na sequência estejam preferencialmente expostos à atividade das exoribonucleases bacterianas dispersas no citossol. Essas enzimas encontram dentre suas funções, a de controlar a estabilidade de mRNA para que as respostas às necessidades celulares sejam rápida e estritamente atendidas (revisado por Deutscher, 2006). Um fato que merece ser considerado é de que *cupD5* codifica uma chaperona, proteína que se liga à subunidade da fímbria no periplasma impedindo a formação de agregados e assegurando sua montagem da forma correta e no local adequado. Vale lembrar que as chaperonas são recicladas, ou seja, depois que uma proteína desse tipo cumpre seu papel e libera a subunidade de fímbria no *usher*, ela está pronta para se associar a uma nova subunidade. Logo, as chaperonas podem estar presentes numa quantidade muito menor que as subunidades da fímbria, o que pode ser definido pela menor estabilidade de seu RNA mensageiro, fato que ainda precisa ser estudado nesse caso específico. Também é possível que exista um promotor interno ao operon, possibilidade esta que não foi analisada no presente trabalho.

A atuação do sistema de dois componentes RcsCB na expressão dos genes da fímbria foi observada por RT-PCR quantitativo, mostrando efeitos contrários da histidina-quinase RcsC e do regulador de resposta RcsB na expressão dos genes *cupD* testados. A regulação negativa de RcsC, enquanto RcsB atua como ativador da transcrição desses genes permite-nos sugerir um modelo comum na regulação por sistemas de dois componentes em enterobactérias, em que, na ausência do sinal que desencadeia a fosforilação da histidina-quinase, essa proteína desfosforilada funcione predominantemente como fosfatase, ou seja, promove a retirada do grupo fosfato do regulador de resposta, inativando-o (Majdalani e Gottesman, 2005). Esse resultado é consistente com a estrutura de RcsB, cujo domínio de saída do sinal corresponde a um HTH de interação com DNA, indicando participação direta na ativação da transcrição de *cupD*. Embora não tenha sido possível mostrar essa interação

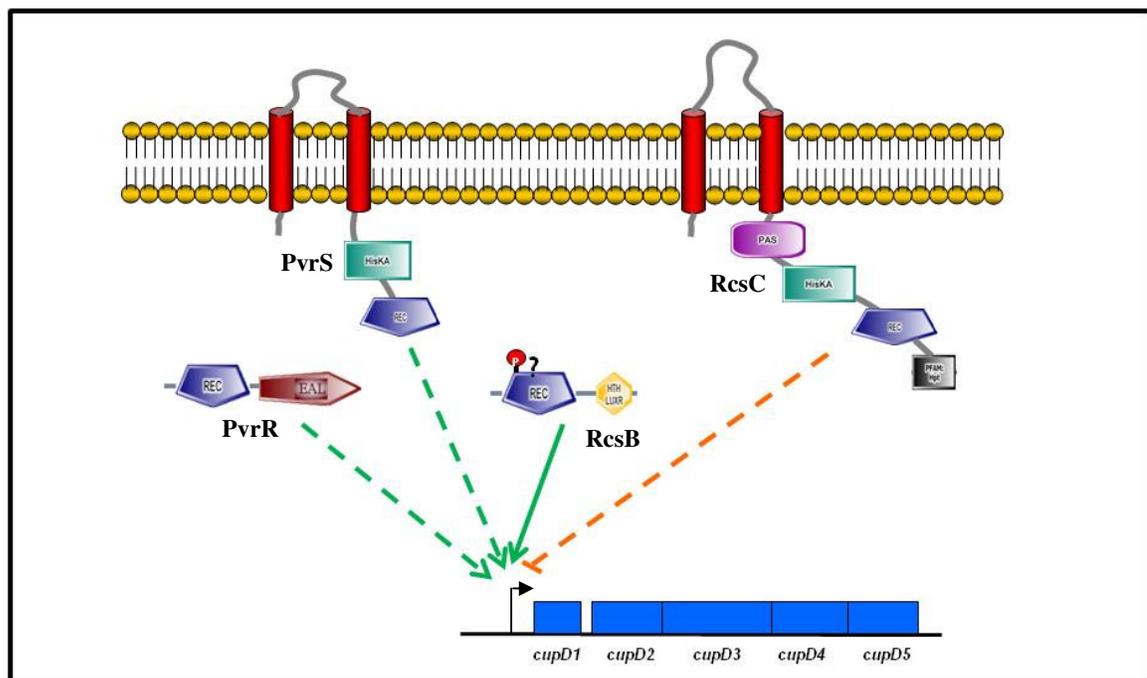
proteína-DNA por ensaios de retardamento de migração em gel de poliacrilamida, os resultados negativos referentes a esses experimentos não significam a ausência de interação, uma vez que podem ter sido devido às condições não otimizadas dos ensaios, muito provavelmente causadas pela impossibilidade de se obter RcsB pura e nativa em quantidade suficiente. Além disso, foi relatado que em estudos em *E.coli* do promotor RcsB-dependente, *osmCp1*, uma forma ativada de RcsB foi capaz de se ligar ao seu sítio específico no DNA em ensaios de proteção contra DNase I (*footprinting*) (Sturny *et al.*, 2003), porém essa ligação não era estável o suficiente para permitir a visualização dessa interação em ensaios de retardamento da migração em gel (*gel shift*) (Davalos-Garcia *et al.*, 2001). Para mostrar a atuação direta do fator de transcrição RcsB na região promotora de *cupD*, portanto, será necessário repetir os ensaios de *gel shift* em condições mais apropriadas, considerando-se também a possibilidade de se realizar experimentos de proteção contra DNase I.

Apesar da interação RcsB-DNA não ter sido mostrada fisicamente, um forte indício de que a ativação da transcrição de *cupD* ocorre via RcsB é o resultado do ensaio de extensão de oligonucleotídeo. Nesse ensaio, somente o produto da reação de transcrição reversa com o RNA da linhagem superexpressando RcsB foi visualizado no gel, como pode ser observado comparando na figura 11 a raia 1, referente ao produto da reação com RNA extraído da linhagem selvagem PA14/pJSG, com a raia 2, onde correu o produto da reação de transcrição reversa com RNA de PA14/pJSG39. Ou seja, o aumento de 2000 vezes na expressão de *cupD* observado nos ensaios de qRT-PCR com cDNA sintetizado a partir de RNA extraído de PA14/pJSG39 é confirmado aqui, de uma forma qualitativa, com a expressão de *cupD* passando de um nível não detectável no ensaio de extensão de oligonucleotídeo marcado, para um nível que permitiu a clara visualização no gel do produto da síntese de cDNA usando esse transcrito como molde, quando seu ativador é superexpresso.

A procura na região promotora de *cupD* pela seqüência consenso de ligação ao homodímero RcsB mostrou particularidades intrigantes dessa região regulatória em PA14, a começar pela presença de uma seqüência similar à região conservada de ligação do heterodímero RcsB-RcsA em *E. coli* (Majdalani e Gottesman, 2005) adjacente ao -35, local esperado para a região de ligação do homodímero. Deve ser lembrado que não há indícios da presença de uma proteína auxiliar a RcsB, como RcsA, em *Pseudomonas aeruginosa*. O conhecimento disponível até hoje nessa área sugere que a ligação do homodímero RcsB adjacente ao -35 provavelmente requer a interação com a RNA polimerase para estabilizar a ligação e permitir a ativação do promotor-alvo, enquanto na seqüência de ligação do ativador mais distante da região promotora do gene-alvo, RcsA atue na estabilização da ligação de RcsB no DNA (Wehland *et al.*, 1999; Wehland e Bernhard, 2000). Aqui, portanto, a presença de uma seqüência de ligação a RcsB na região imediatamente a montante do -35 é coerente com a ausência de RcsA, mesmo que essa seqüência exiba maior similaridade com o consenso de ligação com o heterodímero. Essa característica de RcsB se ligar imediatamente a montante do -35 é remanescente a da proteína de ligação a DNA, LuxR. Assim como em RcsB, uma alteração na extremidade N-terminal de LuxR (causada, nesse caso, pela ligação à molécula auto-indutora) e outras proteínas relacionadas, libera a extremidade C-terminal, que contém o sítio de ligação a DNA, para ativar a transcrição (Fuqua e Greenberg, 2002). Há relatos na literatura que essa ativação parece envolver interações da proteína ativadora com  $\sigma^{70}$  e com o domínio C-terminal da subunidade  $\alpha$  da RNA-polimerase (Stevens *et al.*, 1994; Finney *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2003). Entretanto, voltando à análise da região promotora de *cupD1* em PA14, não foi encontrado nas regiões -10 e -35 consenso forte para  $\sigma^{70}$  de *P. aeruginosa*: apenas 3 bases conservadas no -10 e 2 no -35. Essas seqüências também não revelaram similaridade com regiões consenso de ligação de outros fatores sigma.

O estudo dos inícios de transcrição dos genes de interesse, permitiram, além da análise de seqüências regulatórias, a confirmação de resultados obtidos por outros experimentos neste mesmo trabalho, como a disposição em operon de *cupD1* e *cupD2*, visualizada como produto de RT-PCR e confirmada nesses últimos ensaios quando o início de transcrição de *cupD2* foi coincidente com o início de *cupD1* revelado por extensão de oligonucleotídeo em condição de superexpressão de RcsB.

O outro sistema de dois componentes localizado entre as DR2 parece regular positivamente a expressão de *cupD*. Entretanto, essa regulação ocorre por mecanismos indiretos e ainda não conhecidos, já que o regulador de resposta PvrR não apresenta um domínio de interação com DNA. Esse resultado de qRT-PCR, junto com os resultados acima discutidos sobre a atuação de RcsCB na transcrição de *cupD* permite a montagem de um esquema de regulação da expressão da fímbria CupD pelos sistemas de dois componentes adjacentes aos genes dessa fímbria, como pode ser visto na figura 15.



**Figura 15.** Esquema da regulação de *cupD* pelos sistemas de dois componentes PvrSR e RcsCB.

## 5.2. Uso de *Dictyostelium discoideum* como hospedeiro-modelo

A otimização dos ensaios com esse tipo de hospedeiro se mostrou satisfatória, comparando-se os resultados das linhagens controle com dados da literatura, que documentam a atenuação da virulência em linhagens de *P. aeruginosa* mutantes para genes relacionados a *quorum sensing* (Cosson *et al.*, 2002). A necessidade de adaptações do método descrito na literatura provavelmente se deve às diferenças entre as linhagens utilizadas: a linhagem AX4 foi utilizada nos ensaios descritos aqui, enquanto Cosson e colaboradores (Cosson *et al.*, 2002) utilizaram a linhagem DH1-10. Esses autores também utilizaram uma linhagem diferente e menos virulenta de *P. aeruginosa*, a PAO1.

Os genes entre as DR2 e alguns genes dos operons *cupA*, *cupB* e *cupC* não se mostraram relevantes para a virulência nesse hospedeiro, indicando que esses genes de fímbrias *cup* e os de sua regulação talvez estejam relacionados a etapas específicas da infecção. De fato, os genes de virulência de *P. aeruginosa* identificados até o momento no modelo de *D. discoideum* consistem principalmente de genes relacionados a *quorum sensing*, sistema de secreção tipo III e produção de fatores de virulência secretados por esse sistema, tendo todos esses genes em comum o fato de estarem associados à fase aguda da infecção (Cosson *et al.*, 2002; Pukatzki *et al.*, 2002; Alibaud *et al.*, 2008). Os genes para sistemas de dois componentes e os de fímbria *cup* como os testados nesse trabalho estão associados ou diretamente ligados à formação de biofilmes, ou à modulação do nível de c-diGMP na célula, (Drenkard e Ausubel, 2002; Romling e Amikam, 2006; Ruer *et al.*, 2007). O crescimento em forma de biofilmes está relacionado ao estabelecimento de infecções crônicas, o que parece explicar a falta de relevância de genes desse tipo para a virulência em *D. discoideum*, já que nesse modelo a bactéria não chega a estabelecer esse tipo de infecção, que seria posterior à evasão do sistema imune do hospedeiro, mimetizado em parte pela fagocitose por *D. discoideum*.

Em contrapartida, os mutantes para uma provável metiltransferase codificada por *kerV* foram testados sob as mesmas circunstâncias que os mutantes para os sistemas de dois componentes e para as fímbrias *cup*, e se mostraram atenuados no modelo, com a complementação restaurando o fenótipo de virulência próximo ao da linhagem selvagem (An *et al.*, 2008 - manuscrito em preparação anexado neste trabalho). Esses mesmos mutantes já se mostraram atenuados em hospedeiros-modelo distantemente relacionados, como planta, camundongo e drosófila (Apidianakis *et al.*, 2005; An *et al.*, 2008). Outros fenótipos relevantes desses mutantes também remetem à atuação de KerV em estágios agudos de infecção, como ativação do sistema de *quorum sensing* e do sistema de secreção tipo III.

Como *Pseudomonas aeruginosa* é um microrganismo com importância médica, dados gerados em torno da caracterização de genes envolvidos na adaptação dessa bactéria ao organismo do hospedeiro são potencialmente úteis para serem utilizados no controle de infecção por essa bactéria. Por meio de fímbrias, *P. aeruginosa* é capaz de se aderir e colonizar em forma de biofilmes catéteres, sondas e outras superfícies de materiais que são usados em procedimentos invasivos e torná-los fonte do agente da infecção hospitalar. Além disso, fímbrias também propiciam a adesão e colonização de superfícies bióticas específicas, dificultando o tratamento nesses pacientes crônicos. Nesse contexto, a regulação da expressão dessas fímbrias torna-se um dado valioso e faz surgir candidatos inéditos para alvo de novas drogas, que tanto podem contribuir para tratar a infecção crônica, quanto para evitar a persistência de biofilmes nos materiais que entrarão em contato com os pacientes. Essa idéia contribui para o consenso de que diminuir a possibilidade de infecção por um agente é mais eficiente e muitas vezes economicamente mais viável do que tratar uma infecção já estabelecida.

## 6. Conclusões

- Os genes de sistemas de dois componentes entre as DR2 estão organizados em dois operons distintos: *pvrSR* e *rscCB*.
- *cupD1* e *cupD2* estão presentes em um único transcrito, sugerindo que o grupo de genes *cupD1-D5* consiste de um único operon.
- Foram determinados os inícios de transcrição de *pvrS* e *cupD1-cupD2*.
- As regiões -10 e -35 de *cupD1* não apresentaram consensos fortes com as regiões descritas em *P. aeruginosa*, enquanto as de *pvrS* apresentaram consenso para  $\sigma^{70}$ .
- RcsB atua como um ativador da transcrição de *cupD*, sendo o transcrito correspondente iniciado a 31 bases do códon de iniciação de *cupD1*. Um provável sítio de ligação foi proposto para a região -50 a -37, por comparação de regiões de ligação de RcsB de *E. coli* em seus promotores.
- A proteína sensora híbrida RcsC atua negativamente sobre a transcrição de *cupD*, provavelmente por uma modulação indireta, via RcsB.
- A proteína recombinante RcsB-His foi obtida por superexpressão e purificação a partir de *E. coli* e foi obtido um soro policlonal contra essa proteína desnaturada, capaz de reconhecer RcsB em extratos de *P. aeruginosa*.
- A utilização de *Dictyostelium discoideum* como hospedeiro-modelo foi adequado para o uso nas condições do laboratório, reproduzindo resultados da literatura para mutantes em genes relacionados a *quorum sensing*.
- Os genes localizados entre as DR2 e outros genes para fímbrias *cup* testados não são relevantes para a virulência no modelo de *D. discoideum*, enquanto mutantes para a metiltransferase KerV se mostraram atenuados.

## 7. Referências

Alibaud, L., T. Kohler, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes identified in a *Dictyostelium* host model. *Cell Microbiol*, v.10, n.3, Mar, p.729-740. 2008.

An, D., Y. Apidianakis, *et al.* KerV is a well-conserved novel virulence determinant in a range of Proteobacteria. *Em preparação*. 2008.

Apidianakis, Y., M. N. Mindrinos, *et al.* Profiling early infection responses: *Pseudomonas aeruginosa* eludes host defenses by suppressing antimicrobial peptide gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.102, n.7, Feb 15, p.2573-2578. 2005.

Ausubel, F. M., R. Brent, *et al.*, Eds. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley and Sonsed. 1996.

Bourret, R. B. Census of prokaryotic senses. *J Bacteriol*, v.188, n.12, Jun, p.4165-4168. 2006.

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

Carballes, F., C. Bertrand, *et al.* Regulation of *Escherichia coli* cell division genes *ftsA* and *ftsZ* by the two-component system *rscC-rscB*. *Mol Microbiol*, v.34, n.3, Nov, p.442-50. 1999.

Chen, W. P. e T. T. Kuo. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Res*, v.21, n.9, May 11, p.2260. 1993.

Chisholm, R. L., P. Gaudet, *et al.* dictyBase, the model organism database for *Dictyostelium discoideum*. *Nucleic Acids Res*, v.34, n.D423-427. 2006.

Collazos, J. Opportunistic infections of the CNS in patients with AIDS: diagnosis and management. *CNS Drugs*, v.17, n.12, p.869-887. 2003.

Conter, A., R. Sturny, *et al.* The RcsCB His-Asp phosphorelay system is essential to overcome chlorpromazine-induced stress in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, v.184, n.10, May, p.2850-2853. 2002.

Cosson, P., L. Zulianello, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* virulence analyzed in a *Dictyostelium discoideum* host system. *J Bacteriol*, v.184, n.11, Jun, p.3027-3033. 2002.

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

De Souza-Hart, J. A., W. Blackstock, *et al.* Two-component systems in *Haemophilus influenzae*: a regulatory role for ArcA in serum resistance. *Infect Immun*, v.71, n.1, Jan, p.163-72. 2003.

- Deutscher, M. P. Degradation of RNA in bacteria: comparison of mRNA and stable RNA. *Nucleic Acids Res*, v.34, n.2, p.659-666. 2006.
- Déziel, E., F. Lepine, *et al.* Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.101, n.5, Feb 3, p.1339-1344. 2004.
- 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.
- Ebel, W. e J. E. Trempy. *Escherichia coli* RcsA, a positive activator of colanic acid capsular polysaccharide synthesis, functions to activate its own expression. *J Bacteriol*, v.181, n.2, Jan, p.577-584. 1999.
- Fajardo, M., M. Schleicher, *et al.* Calnexin, calreticulin and cytoskeleton-associated proteins modulate uptake and growth of *Legionella pneumophila* in *Dictyostelium discoideum*. *Microbiology*, v.150, n.Pt 9, Sep, p.2825-2835. 2004.
- Finney, A. H., R. J. Blick, *et al.* Role of the C-terminal domain of the alpha subunit of RNA polymerase in LuxR-dependent transcriptional activation of the *lux* operon during quorum sensing. *J Bacteriol*, v.184, n.16, Aug, p.4520-4528. 2002.
- Flamez, C., I. Ricard, *et al.* Phenotypic analysis of *Yersinia pseudotuberculosis* 32777 response regulator mutants: new insights into two-component system regulon plasticity in bacteria. *Int J Med Microbiol*, v.298, n.3-4, Apr, p.193-207. 2008.
- Folkesson, A., S. Lofdahl, *et al.* The *Salmonella enterica* subspecies I specific centisome 7 genomic island encodes novel protein families present in bacteria living in close contact with eukaryotic cells. *Res Microbiol*, v.153, n.8, Oct, p.537-545. 2002.
- 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.
- Fuqua, C. e E. P. Greenberg. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v.3, n.9, Sep, p.685-695. 2002.
- Galperin, M. Y. A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: bacterial IQ, extroverts and introverts. *BMC Microbiol*, v.5, Jun 14, p.35. 2005.
- Garcia Vescovi, E., F. C. Soncini, *et al.* The role of the PhoP/PhoQ regulon in *Salmonella* virulence. *Res Microbiol*, v.145, n.5-6, Jun-Aug, p.473-80. 1994.
- Gottesman, S. e V. Stout. Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K12. *Mol Microbiol*, v.5, n.7, Jul, p.1599-606. 1991.
- Guzman-Verri, C., L. Manterola, *et al.* The two-component system BvrR/BvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the Rhizobiaceae. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.99, n.19, Sep 17, p.12375-80. 2002.

- Guzzo, C. R., L. R. Silva, *et al.* Expression, crystallization and preliminary crystallographic analysis of SufE (XAC2355) from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, v.62, n.Pt 3, Mar 1, p.268-270. 2006.
- Hacker, J., G. Blum-Oehler, *et al.* The molecular basis of infectious diseases: pathogenicity islands and other mobile genetic elements. A review. *Acta Microbiol Immunol Hung*, v.50, n.4, p.321-330. 2003.
- Hacker, J. e J. B. Kaper. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol*, v.54, p.641-679. 2000.
- 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.
- Heeb, S. e D. Haas. Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria. *Mol Plant Microbe Interact*, v.14, n.12, Dec, p.1351-63. 2001.
- Houwink, A. L. e I. W. Van. Electron microscopical observations on bacterial cytology; a study on flagellation. *Biochim Biophys Acta*, v.5, n.1, Mar, p.10-44. 1950.
- Ikeno, T., K. Fukuda, *et al.* Small and rough colony *Pseudomonas aeruginosa* with elevated biofilm formation ability isolated in hospitalized patients. *Microbiol Immunol*, v.51, n.10, p.929-938. 2007.
- Johnson, D. C., A. Ishihama, *et al.* Involvement of region 4 of the sigma70 subunit of RNA polymerase in transcriptional activation of the *lux* operon during quorum sensing. *FEMS Microbiol Lett*, v.228, n.2, Nov 21, p.193-201. 2003.
- Kelm, O., C. Kiecker, *et al.* Interaction of the regulator proteins RcsA and RcsB with the promoter of the operon for amylovoran biosynthesis in *Erwinia amylovora*. *Mol Gen Genet*, v.256, n.1, Sep, p.72-83. 1997.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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.
- Majdalani, N. e S. Gottesman. The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system. *Annu Rev Microbiol*, v.59, Jun 14, p.379-405. 2005.
- Majdalani, N., D. Hernandez, *et al.* Regulation and mode of action of the second small RNA activator of RpoS translation, RprA. *Molecular Microbiology*, v.46, n.3, p.813-826. 2002.
- Marutani, M., F. Taguchi, *et al.* Gac two-component system in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* is required for virulence but not for hypersensitive reaction. *Mol Genet Genomics*, v.279, n.4, Apr, p.313-322. 2008.
- Mathee, K., G. Narasimhan, *et al.* Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.105, n.8, Feb 26, p.3100-3105. 2008.
- 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.
- Mougous, J. D., M. E. Cuff, *et al.* A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science*, v.312, n.5779, Jun 9, p.1526-1530. 2006.
- Nicastro, G. G., A. L. Boechat, *et al.* Expression of the *cupD* gene cluster from *Pseudomonas aeruginosa* PA14 is controlled by the products of neighboring genes in PAPI-1. *em preparação*. 2008.
- Nizan-Koren, R., S. Manulis, *et al.* The regulatory cascade that activates the Hrp regulon in *Erwinia herbicola* pv. *gypsophila*. *Mol Plant Microbe Interact*, v.16, n.3, Mar, p.249-60. 2003.
- 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.
- Potvin, E., F. Sanschagrin, *et al.* Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev*, v.32, n.1, Jan, p.38-55. 2008.
- Pukatzki, S., R. H. Kessin, *et al.* The human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* utilizes conserved virulence pathways to infect the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.99, n.5, Mar 5, p.3159-3164. 2002.

- Pukatzki, S., A. T. Ma, *et al.* Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.103, n.5, Jan 31, p.1528-1533. 2006.
- Qiu, X., A. U. Gurkar, *et al.* Interstrain transfer of the large pathogenicity island (PAPI-1) of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.103, n.52, Dec 26, p.19830-19835. 2006.
- 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.
- Romling, U. e D. Amikam. Cyclic di-GMP as a second messenger. *Curr Opin Microbiol*, v.9, n.2, Apr, p.218-28. 2006.
- 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
- Schroder, I., C. D. Wolin, *et al.* Phosphorylation and dephosphorylation of the NarQ, NarX, and NarL proteins of the nitrate-dependent two-component regulatory system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, v.176, n.16, Aug, p.4985-4992. 1994.
- Schultz, J., F. Milpetz, *et al.* SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.95, n.11, May 26, p.5857-5864. 1998.
- Shimizu, T., K. Shima, *et al.* Proteome and transcriptome analysis of the virulence genes regulated by the VirR/VirS system in *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol*, v.184, n.10, May, p.2587-94. 2002.
- 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.
- Skriwan, C., M. Fajardo, *et al.* Various bacterial pathogens and symbionts infect the amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Int J Med Microbiol*, v.291, n.8, Mar, p.615-624. 2002.
- Solomon, J. M., A. Rupper, *et al.* Intracellular growth of *Legionella pneumophila* in *Dictyostelium discoideum*, a system for genetic analysis of host-pathogen interactions. *Infect Immun*, v.68, n.5, May, p.2939-47. 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.
- Steenbergen, J. N. e A. Casadevall. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbes Infect*, v.5, n.7, Jun, p.667-675. 2003.

- Steinert, M., K. Birkness, *et al.* *Mycobacterium avium* bacilli grow saprozoically in coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and survive within cyst walls. *Appl Environ Microbiol*, v.64, n.6, Jun, p.2256-2261. 1998.
- Steinert, M. e K. Heuner. *Dictyostelium* as host model for pathogenesis. *Cell Microbiol*, v.7, n.3, Mar, p.307-314. 2005.
- Steinert, M., M. Leippe, *et al.* Surrogate hosts: invertebrates as models for studying pathogen-host interactions. *Int J Med Microbiol*, v.293, p.1-12. 2003.
- Stevens, A. M., K. M. Dolan, *et al.* Synergistic binding of the *Vibrio fischeri* LuxR transcriptional activator domain and RNA polymerase to the *lux* promoter region. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.91, n.26, Dec 20, p.12619-12623. 1994.
- Stout, V. Identification of the promoter region for the colanic acid polysaccharide biosynthetic genes in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, v.178, n.14, Jul, p.4273-80. 1996.
- 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.
- Studier, F. W. e B. A. Moffatt. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*, v.189, n.1, May 5, p.113-130. 1986.
- Sturny, R., K. Cam, *et al.* NhaR and RcsB independently regulate the *osmCp1* promoter of *Escherichia coli* at overlapping regulatory sites. *J Bacteriol*, v.185, n.15, Aug, p.4298-4304. 2003.
- Susin, M. F., H. R. Perez, *et al.* Functional and structural analysis of HrcA repressor protein from *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol*, v.186, n.20, Oct, p.6759-6767. 2004.
- Sussman, M. Cultivation and synchronous morphogenesis of *Dictyostelium* under controlled experimental conditions. *Methods Cell Biol*, v.28, p.9-29. 1987.
- Takeda, S., Y. Fujisawa, *et al.* A novel feature of the multistep phosphorelay in *Escherichia coli*: a revised model of the RcsC --> YojN --> RcsB signalling pathway implicated in capsular synthesis and swarming behaviour. *Mol Microbiol*, v.40, n.2, Apr, p.440-50. 2001.
- Tamayo, R., J. T. Pratt, *et al.* Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis. *Annu Rev Microbiol*, v.61, p.131-48. 2007.
- Tan, M. W. Cross-species infections and their analysis. *Annu Rev Microbiol*, v.56, p.539-65. 2002.
- Tischler, A. D., S. H. Lee, *et al.* The *Vibrio cholerae* *vieSAB* locus encodes a pathway contributing to cholera toxin production. *J Bacteriol*, v.184, n.15, Aug, p.4104-13. 2002.
- 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.
- Wade, D. S., M. W. Calfee, *et al.* Regulation of *Pseudomonas* quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, v.187, n.13, Jul, p.4372-4380. 2005.
- Wagner, C., A. Saizieu Ad, *et al.* Genetic analysis and functional characterization of the *Streptococcus pneumoniae* *vic* operon. *Infect Immun*, v.70, n.11, Nov, p.6121-8. 2002.
- Wagner, V. E. e B. H. Iglewski. *P. aeruginosa* Biofilms in CF Infection. *Clin Rev Allergy Immunol*, May 29. 2008.
- Wehland, M. e F. Bernhard. The RcsAB box. Characterization of a new operator essential for the regulation of exopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *J Biol Chem*, v.275, n.10, Mar 10, p.7013-7020. 2000.
- Wehland, M., C. Kiecker, *et al.* Identification of an RcsA/RcsB recognition motif in the promoters of exopolysaccharide biosynthetic operons from *Erwinia amylovora* and *Pantoea stewartii* subspecies *stewartii*. *J Biol Chem*, v.274, n.6, Feb 5, p.3300-3307. 1999.
- Welch, R. A., V. Burland, *et al.* Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.99, n.26, Dec 24, p.17020-17024. 2002.

## LISTA DE ANEXOS

- I. Súmula Curricular
- II. Manuscrito em preparação

## **ANEXO I - SÚMULA CURRICULAR**

### **DADOS PESSOAIS**

**Nome:** Ana Laura Boechat Borges

**Local e data de nascimento:** Belo Horizonte – MG, 22 de setembro de 1984

### **EDUCAÇÃO**

Colégio Professor Clóvis Tavares, Campos dos Goytacazes – RJ, 2001.

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes – RJ, 2006.  
Ciências Biológicas (Bacharelado).

### **OCUPAÇÃO**

Bolsista de mestrado, FAPESP, setembro de 2006 a agosto de 2008.

### **PUBLICAÇÕES**

#### **Manuscritos em preparação**

An, D., Y. Apidianakis, A. L. Boechat, R. L. Baldini, and L. G. Rahme. 2008. KerV is a well conserved novel virulence determinant in a range of Proteobacteria. *Em preparação.*  
(em anexo)

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**

Boechat, A. L.; Baldini, R. L. Relationship among the genes in the pathogenicity island PAPI-1 of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 and determination of their role in virulence against *Dictyostelium discoideum*. *In: XXXVI Annual meeting of the SBBq and 10th IUMB Conference, 2007, Salvador.*

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.*

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.*

Boechat, A. L.; Botelho-Júnior, S.; Jacinto, T. Analysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation and antioxidant enzymes activities in passion fruit leaves (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) in response to mechanical wound. *In: XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular*, 2006, Águas de Lindóia.

Boechat, A. L. ; Jacinto, T. ; Machado, O.L.T. Acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e alterações na atividade de enzimas antioxidantes induzidos por ferimentos mecânicos em plantas de maracujá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*). *In: IV Reunião Técnica de Pesquisas em Maracujazeiro*, 2005, Brasília.

Boechat, A. L. ; Machado, OLT; Jacinto, T. Indução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e da atividade peroxidásica em folhas de maracujá (*Passiflora flavicarpa*) em resposta à injúria mecânica. *In: X Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal e XII Congresso Latino Americano de Fisiologia Vegetal*, 2005, Recife.

Fragoso G.M.; Boechat A.L.; Fraga E.; Meireles D.; Dagnino D., Jacinto T. Investigation of self-inhibition in *Synechococcus* PCC 7942 and *Synechocystis* PCC 6803 cells as a mechanism of toxic bloom control. *In: XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular*, 2005, Águas de Lindóia.

Fragoso, G. M. ; Boechat, A.L. ; Fraga, E.; Meireles, D.A. ; Dagnino, D. Auto-regulação de crescimento em cianobactérias – alternativa para o controle de florações? *In: X Reunião da Sociedade Brasileira de Fisiologia*, 2004, Salvador.

Boechat, A.L.; Siqueira, E.S.; Fragoso, G.M.; Fraga, E.; Porto, M. B.; Schripsema, J.; Jacinto, T.; Dagnino, D. Investigation of the occurrence of toxic strains of cyanobacteria in lagoons in the state of Rio de Janeiro. *In: XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica*, 2003, Caxambu.

# 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](#)