

**REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *clp E*
CARACTERIZAÇÃO DE MUTANTES $\Delta clpB$ e ΔtsR EM
*Enterococcus faecalis***

Naira Elane Moreira de Oliveira

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas (Microbiologia).

Orientadoras: Marcia Giambiagi de Marval e Maria do Carmo de Freire Bastos.

Colaboradores: José Abelardo Lemos e Jacqueline Abranches.

Rio de Janeiro

Março de 2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

NAIRA ELANE MOREIRA DE OLIVEIRA

**REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *clp E*
CARACTERIZAÇÃO DE MUTANTES $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$ EM
*Enterococcus faecalis***



Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia)



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROF. PAULO DE GÓES
RIO DE JANEIRO
MARÇO DE 2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Oliveira, Naira Elane Moreira de Oliveira

Regulação da expressão dos genes *clp* e caracterização de mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$ em *Enterococcus faecalis*/ Naira Elane Moreira de Oliveira –

Rio de Janeiro, 2010

xiv, 90

Tese Doutorado em Ciências (Microbiologia)]

Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, 2010.

Orientadores: Marcia Giambiagi de Marval e Maria do Carmo de Freire Bastos

Referências bibliográficas: f 80 – 90.

1. *Enterococcus faecalis* 2. Chaperonas Moleculares 3. Clp/ATPases 4. Choque térmico 5. Regulação.

I. Giambiagi-deMarval Marcia e Bastos Maria do Carmo de Freire II. UFRJ, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Doutorado em Ciências (Microbiologia). III. Modulação da Regulação da expressão dos genes *clp* e caracterização de mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$ em *Enterococcus faecalis*.

Naira Elane Moreira de Oliveira

Regulação da expressão dos genes *clp* e caracterização de mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$ em
Enterococcus faecalis

Rio de Janeiro, 17 de março de 2010

Marcia Giambiagi de Marval

(Nome do orientador, sua titulação e instituição a que pertence)

Suely Lopes Gomes

(Nome do examinador, sua titulação e instituição a que pertence)

Walter Martin Oleman

(Nome do examinador, sua titulação e instituição a que pertence)

Turan Peter Uermeny

(Nome do examinador, sua titulação e instituição a que pertence)

Marinella Silva Laport

(Nome do revisor, sua titulação e instituição a que pertence)

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia Molecular, Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação da Profa Marcia Giambiagi de Marval e Profa. Maria do Carmo de Freire Bastos e no “Center for Oral Biology - University of Rochester, NY - USA”, com a colaboração do Prof. José Abelardo Lemos e da Profa. Jacqueline Abranches.

RESUMO

NAIRA ELANE MOREIRA DE OLIVEIRA

Regulação da expressão dos genes *clp* e caracterização de mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$ em *Enterococcus faecalis*

Marcia Giambiagi de Marval e Maria do Carmo de Freire Bastos

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Ciências (Microbiologia).

Enterococcus faecalis é um importante patógeno em infecções nosocomiais que se apresenta na forma de coco Gram-positivo, com resistência a múltiplos antimicrobianos e capacidade de crescer sob condições de estresse térmico. Em resposta ao choque térmico, as células sintetizam, entre outras, proteínas pertencentes à família das Clp/ATPases. ClpB, um membro desta família, funciona principalmente como uma chaperona molecular, que atua enovelando proteínas desenoveladas ou desnaturadas. Genes de choque térmico de classe III, dentre os quais estão os genes que codificam as proteínas da família Clp/ATPases e a protease ClpP, são controlados pelo repressor CtsR. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a regulação da expressão dos genes *clpB*, *clpC*, *clpE*, *clpP* e *clpX* na estirpe selvagem e/ou na estirpe mutante $\Delta ctsR$ e caracterizar os mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$ em *E. faecalis* quanto à capacidade de sobreviverem em condições de estresse e a participação destes genes na virulência deste micro-organismo. Análises *in silico* mostraram o provável sítio de ligação ao regulador de estresse CtsR e a região promotora de cada gene *clp*, anotado no genoma de *E. faecalis* V583 (www.tigr.org). Análise da expressão dos genes *clp* por “northern blot” mostrou um mRNA monocistrônico para os genes *clpB* e *clpP*, com tamanhos de 2,6 kb e 0,6 kb, respectivamente. Os transcritos dos genes *clpX* (1,2 kb) e *clpE* (2,2 kb) apresentaram tamanhos maiores do que o esperado. A análise da região gênica e o tamanho dos transcritos destes genes sugeriram uma organização em operon. Análises através de qRT-PCR confirmaram que a expressão de *clpB*, *clpP*, *clpE* e *clpC* foi induzida durante o choque térmico, enquanto a expressão destes mesmos genes foi reprimida, quando na presença de H₂O₂. Para se estudar a função de ClpB e CtsR em *E. faecalis*, foram construídas duas estirpes mutantes através da inativação de *clpB* ($\Delta clpB$) e *ctsR* ($\Delta ctsR$). Análises da estirpe $\Delta clpB$ indicaram que ClpB está diretamente envolvida na aquisição de termotolerância, mas é aparentemente dispensável na resposta a outros estresses. Nenhuma diferença significativa ($p \leq 0,05$) foi observada na formação de biofilme pelos mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$ quando comparados à estirpe selvagem. Estudos *in vivo*, utilizando o modelo de virulência da larva de *Galleria mellonella*, sugeriram que ClpB e CtsR podem estar envolvidas na patogênese de *E. faecalis*. Análises de comparação entre a estirpe selvagem e o mutante $\Delta ctsR$ de *E. faecalis* mostraram que, sob choque térmico, os genes *clpB*, *clpC*, *clpE* e *clpP* foram induzidos na ausência do repressor CtsR, indicando que estes genes são regulados pelo repressor CtsR, o que classifica as Clp por eles codificadas como proteínas de choque térmico de classe III.

Palavras-chave: *Enterococcus faecalis*, Chaperonas Moleculares, Clp/ATPases, ClpB, CtsR, Choque térmico, Regulação.

ABSTRACT

NAIRA ELANE MOREIRA DE OLIVEIRA

Regulação da expressão dos genes *clp* e caracterização de mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$ em *Enterococcus faecalis*

Marcia Giambiagi de Marval e Maria do Carmo de Freire Bastos

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Ciências (Microbiologia).

Enterococcus faecalis is an important pathogen in nosocomial infections. It is a Gram-positive cocci presenting resistance to multiple antibiotics and ability to grow under conditions of heat stress. In response to heat-shock, cells synthesize several proteins including those which belong to the Clp/ATPases family. ClpB, which is a member of this family, functions as a molecular chaperone, playing crucial roles in promoting folding or assemblage denatured protein. Heat-shock genes of class III, which includes genes encoding proteins of the Clp/ATPases family and the ClpP protease, are regulated by the CtsR repressor. The aim of this work was to evaluate the regulation of the expression of the *clpB*, *clpC*, *clpE*, *clpP* and *clpX* genes in *E. faecalis* wild type and/or a mutant strain $\Delta ctsR$. Other goals this study were to characterize the capacity of the $\Delta clpB$ and $\Delta ctsR$ mutant strains to survive under stress conditions and to evaluate the capacity of the mutated genes in participating of the virulence of this bacterium. Analyses "in silico" showed the putative binding site for the CtsR repressor and the promoter region of each *clp* gene, annotated in the *E. faecalis* V583 strain genome (www.tigr.org). Northern blot analysis showed monocistronic mRNA for the genes *clpB* and *clpP*, with sizes of 2.6 kb and 0.6 kb, respectively. The transcripts of *clpX* and *clpE* genes showed larger sizes than expected suggesting operon organizations. Analyses by qRT-PCR confirmed the induction of *clpB*, *clpC*, *clpE* and *clpP* genes during heat shock. However, the expression of these genes was repressed in the presence of H₂O₂. To study the functions of ClpB and CtsR in *E. faecalis*, two mutant strains were constructed by inactivation of *clpB* ($\Delta clpB$) and *ctsR* genes ($\Delta ctsR$) genes. Analysis of the $\Delta clpB$ strain indicated that ClpB is involved in the acquisition of thermotolerance but is apparently dispensable in response to other stresses. No significant difference ($p \leq 0,05$) was observed in biofilm formation by $\Delta clpB$ and $\Delta ctsR$ mutants when compared to wild type. *In vivo* studies using as model virulence the larvae of *Galleria mellonella* suggested that the ClpB and CtsR may be involved in the pathogenesis of *E. faecalis*. Comparison between wild type and mutant $\Delta ctsR$ of *E. faecalis* showed that, under heat shock, no repression of the genes *clpB*, *clpC*, *clpE* and *clpP* was observed in the absence of repressor CtsR, indicating that these genes are regulated by the CtsR repressor which classifies their products as class III heat-shock proteins.

Key words: *Enterococcus faecalis*, Molecular Chaperone, Clp/ATPases, ClpB, CtsR, Heat shock, Regulation.

AGRADECIMENTOS

Toda a minha gratidão a Deus por ter me concedido a vida e por continuar colocando em minha caminhada, tantas pessoas, que contribuem para meu amadurecimento. A cada vitória o reconhecimento devido ao meu Deus, pois só Ele é digno de toda honra, glória e louvor. Senhor, obrigada pelo fim de mais essa etapa.

À minha orientadora Dra. Márcia Giambiagi de Marval, pela orientação e amizade. Agradeço principalmente, por abrir tantas portas na minha história, concedendo a mim a oportunidade de aprendizagem e aperfeiçoamento em minha formação científica, durante estes anos de trabalho. Agradeço por acreditar no meu potencial e não desistir (mesmo mediante aos vários protestos) da minha ida para o exterior.

À Dra. Maria do Carmo de Freire Bastos, por toda dedicação e co-orientação neste trabalho. Em especial pelas palavras de credibilidade e amizade, oferecidos a mim. Obrigado por me receber em seu lar, mesmo durante o carnaval e dedicar a mim, algumas de suas manhãs. Obrigado pelo seu olhar arguto e judicioso, que me ajudou no fim desta tese.

À Dra. Jaqueline Abranches (carinhosamente chamada por mim de Dra. Who) e sua família que foi minha família, amigos e orientadora durante os seis meses que estive na cidade de Rochester-NY. Com ela aprendi mais do que poderia imaginar. Obrigado por tornar todo o processo mais fácil, por me divertir tanto e por acompanhar toda a obtenção dos mutantes, comemorando comigo a cada novo passo. Você foi uma profissional que me inspirou a continuar.

Ao Dr. José Abelardo Lemos, pela oportunidade e pela credibilidade. Obrigado por me ensinar tanto em um curto período de tempo e por ter me oferecido todas as condições e facilidades no seu laboratório no “Center for Oral Biology – University of Rochester – NY-USA”, fazendo assim diferença na minha vida científica. Obrigado por sua orientação e acolhida. Sem sua confiança em mim nada disso seria possível.

À Dra. Marinella Silva Laport e família, pelo apoio e amizade no laboratório ou fora dele. Agradeço por ler e executar a revisão de cada página desta tese e por me ouvir e auxiliar sempre que necessário. Obrigado por estes anos de agradável convívio.

A minha família, meus pais Joás e Stela, as minhas irmãs Danielle e Joyce e ao cunhado preferido, Joéver que não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida. Agradeço a eles por serem responsáveis pelo meu crescimento espiritual e pessoal e por todo apoio caloroso e inabalável. Obrigada por ser a verdadeira base da minha vida, por todo amor, dedicação e orações.

Aos meus tios, primos e avó que bem de perto me incentivaram e apoiaram. Em especial a família Moreira que me ofereceram um lar, almoços aos domingos e sempre estiveram na torcida durante o tempo de estudo, em especial nos últimos dias.

Aos amigos que passaram ou ainda permanecem no laboratório de Microbiologia Molecular ou ainda aqueles que são agregados a nós. Agradeço aos colegas Cleyton, Elaine, Juliana, Olinda, Nathália, Palloma, Paula, Viviane, Lívia, Wesley, Marcinha e Ana Paula. Vocês foram muito importantes na minha vida, afinal com vocês passei boa parte dos meus dias nos últimos anos. Obrigado pelos momentos de diversão. Agradeço também aos amigos Ricardo e Eliezer, do laboratório de infecção hospitalar, por toda a ajuda, amizade e diversão.

Aos amigos do laboratório do Dr. Lemos; Alaina, Isamar, Jessika, Akaisha e Tony que se tornaram grandes amigos, alguns até irmãos em tão pouco tempo e que me ensinaram um pouco mais do significado das palavras amizade e hospitalidade. Obrigado por cada lágrima derramada e por cada sorriso expressado diante de uma nova conquista no laboratório. Mais que um ambiente de trabalho eles me proporcionaram um segundo lar.

Aos queridos amigos Amanda, Daniel, Lilian, Luciana, Roberta, Thais e Vitor que estiveram nos bastidores desta história mas que foram fundamentais neste tempo. À Lili e Lu agradeço os divertidos encontros do tripé. Em especial, agradeço a Lu por ter compartilhado uma semana comigo nos USA, melhor pessoa não haveria de encontrar para conhecer e explorar a cidade de Nova Iorque.

Aos amigos de perto e de longe, agradeço por acreditarem no meu potencial, nas minhas ideias, nos meus devaneios, principalmente quando nem eu mais acreditava. Obrigado pois em alguns momentos vocês foram meu auxílio emocional e espiritual. Por todos e-mails e telefonemas. Amo vocês!!

Aos professores e técnicos do IMPPG, em especial ao Orlando, pelo auxílio prestado durante o desenvolvimento deste trabalho e pelos bons e agradáveis momentos de descontração.

À atual coordenadora, Dra. Ana Paula Colombo e ao corpo docente dos cursos de pós-graduação do IMPPG.

À CAPES, pela bolsa de doutorado a mim concedida.

Ao CNPq pela bolsa sanduiche de doutorado a mim concedida.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
1. Gênero <i>Enterococcus</i>	1
2. Chaperonas Moleculares e Família Clp/ATPases	4
3. Regulação dos Genes <i>clp</i>	7
4. ClpB	10
5. Papel de outras proteínas da família Clp/HSP100	12
JUSTIFICATIVA	16
OBJETIVOS	17
MATERIAIS E MÉTODOS	18
1. Estirpes bacterianas e condições de cultivo	18
2. Análise de cinética de crescimento	20
3. Cinética de sobrevivência	20
4. Análise da indução das proteínas ClpB e CtsR na termotolerância	20
5. Teste de difusão a partir de disco	20
6. Determinação da CMI (concentração mínima inibitória)	21
7. Capacidade da formação de biofilme por mutantes <i>clp</i> de <i>E. faecalis</i>	21
8. Preparo de células competentes de <i>E. coli</i>	22
9. Preparação de células eletrocompetentes de <i>E. faecalis</i> CK111	22
10. Extração de DNA plasmidial de <i>E. coli</i> DH10B e EC1000	23
11. Dosagem de ácidos nucleicos e digestão de DNA com enzimas de restrição	23
12. Eletroforese de DNA em gel de agarose	23
13. Extração de RNA para análise por PCR em tempo Real	23
14. Síntese de cDNA	25
15. PCR em Tempo Real (qRT-PCR)	25
16. Extração de RNA para análise por “northern blot”	26
17. Preparo da amostra do RNA e eletroforese em gel de agarose em condições desnaturantes	27
18. Hibridização	29
19. Reação de polimerase em cadeia (PCR)	29
20. Construção de mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$ em <i>E. faecalis</i> OG1RF	31
20.1 - Desenhos de oligonucleotídeos e construção de vetores recombinantes	31
20.2 - Transformação de <i>E. coli</i> e seleção de clones transformantes	32

20.3 - Preparação do amplicon flanqueando o gene-alvo	33
20.4 - Eletroporação	35
20.5 - Conjugação	35
20.6 - Cura	37
20.7- Seleção de estirpes mutantes no gene <i>clpB</i> ou <i>ctsR</i>	38
21 - Virulência de <i>E. faecalis</i> OG1RF e dos mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$	38
22 - Análises Estatísticas	39
RESULTADOS	40
Parte I – Análise da regulação da expressão dos genes <i>clp</i> em <i>E. faecalis</i>	40
1. Análises das regiões promotoras dos genes <i>clp</i> presentes em <i>E. faecalis</i> V583	40
2. Análise de transcrição dos genes <i>clp</i> através de “northern blot”	46
3. Análise dos mRNAs dos genes <i>clp</i> através de “real-time PCR” sob diferentes condições de estresse	51
3.1 - Choque térmico	51
3.2 - Estresse Oxidativo	51
Parte II – Obtenção e análise das estirpes mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$ de <i>E. faecalis</i> OG1RF	54
1. Obtenção de mutantes	54
2. Estudo da regulação da expressão dos genes <i>clp</i> em <i>E. faecalis</i> OG1RF, através de qRT-PCR	56
3. Cinética de crescimento e tempo de geração de estirpes selvagens e mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$ de <i>E. faecalis</i>	59
4. Concentração mínima inibitória (CMI) de diferentes antimicrobianos apresentada pela estirpe selvagem OG1RF e pelos mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$	62
5. Teste de difusão a partir de disco	63
6. Resposta ao estresse oxidativo das células de <i>E. faecalis</i> OG1RF e das estirpes mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$	64
7. Análise das proteínas ClpB e CtsR na indução da termotolerância:	66
8. Capacidade da formação de biofilme pelos mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$ em <i>E. faecalis</i>	67
9. Virulência de <i>E. faecalis</i> OG1RF e dos mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$	68
DISCUSSÃO	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

ABREVIACÕES

AAA – ATPases associadas a diferentes atividades celulares

Amp - ampicilina

BHI - *Brain Heart Infusion* (infusão de coração e cérebro)

BM - meio base semidefinido

BSA – albumina de soro bovino

Cam - cloranfenicol

cDNA – DNA complementar

CIRCE - *Controlling Inverted Repeat of Chaperone Expression* (repetição invertida controladora da expressão de chaperonas)

Clp - protease caseinolítica

CMI - concentração mínima inibitória

D- direto

DEPC - *Diethyl pyrocarbonate*

dNTP - desoxirribonucleotídeo 5'-trifosfatado

DO - densidade óptica

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

Erm – eritromicina

Fus - ácido fusídico

Gen - gentamicina

HSPs - *Heat Shock Proteins* (proteínas de choque térmico)

Kan – canamicina

kb - quilobase(s), 1.000 pb

kDa – kilo Dalton

lacZ - gene que codifica a β -galactosidase

LB – Luria-Bertani

MOPS - *3-N-(morpholino) propanesulfonic acid*

Nor - norfloxacin

orf – seqüência aberta de leitura

oriT- origem de transferência

pb – par(es) de base(s)

PBS – tampão salina fosfato

p-Cl-phe - *p*-cloro-fenilalanina

PCR - *Polymerase Chain Reaction* (reação de polimerase em cadeia)

P-*pheS* - fenilalanil-tRNA sintetase

p/v – peso por volume

PVP - polivinilpirrolidona

R – reverso

RBS - sítio de ligação ao ribossomo

Rif - rifampicina

repA- gene que codifica a proteína de replicação

qRT-PCR - reação de polimerase em cadeia quantitativa em tempo real

SD – *Shine-Dalgarno*

SDS – deodocil sulfato de sódio

Sp - espectinomicina

TAE - Tris - Acetato - EDTA

SSC - salina - citrato de sódio

TE - Tris – EDTA

Tet - tetraciclina

TIGR - *The Institute for Genomic Research*

tm – temperatura de desnaturação média

Tris - (hidroximetil) aminometano

U – unidade(s)

UFC – unidade formadora de colônia

UV – ultravioleta

Van - vancomicina

VRE - enterococos resistentes à vancomicina

v/v – volume por volume

X - vezes concentrado

xg - gravidade

X-Gal - 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo

Δ – deleção

σ - sigma

Nota: A letra r sobre a sigla das drogas indica resistente ou resistência à (ao).

1. Gênero *Enterococcus*

O gênero *Enterococcus* é formado por micro-organismos cocos Gram-positivos, anaeróbios aerotolerantes e catalase-negativos. Entretanto, algumas espécies produzem pseudocatalase (MURRAY, 1990). Os enterococos arranjam-se aos pares, em pequenas cadeias, ou isolados. São bactérias ubíquas encontradas em uma variedade de habitats. Além de serem isolados de fezes humanas e do trato gastrointestinal de humanos e animais, são usualmente encontradas na cavidade oral, no solo, na água e nos alimentos de origem tanto animal como vegetal (FRANZ, HOLZAPFEL & STILES, 1999; GIRAFFA, 2002; ZEHNDER & GUGGENHEIM, 2009).

Os *Enterococcus* spp. são habitantes normais da microbiota anfibiótica do trato gastrointestinal de homens e animais, porém eles podem ser associados a doenças invasivas, como endocardite (MOELLERING, 1992), incluindo sítios comuns de infecções clínicas, como o trato urinário, a corrente sanguínea e ferimentos intra-abdominais e pélvicos (HOGE *et al.*, 1991; SOOD *et al.*, 2008). Outras infecções causadas com menor frequência por enterococos foram descritas em neonatais e no sistema nervoso central de adultos. Além disso, raramente podem ser encontradas infecções do trato respiratório e osteomielite (MURRAY, 2000).

Os enterococos começaram a ser reconhecidos, com maior frequência, como causa comum de infecções adquiridas em hospitais, a partir do final da década de 70. Uma vez considerados comensais que residiam no trato gastrointestinal, os enterococos surgiram como um dos principais agentes de infecções nosocomiais. Estes micro-organismos emergiram como a causa de vários surtos nas últimas décadas, principalmente, pela aquisição de resistência a múltiplas drogas e de fatores de virulência (MURRAY, 1990; MURRAY *et al.*, 2003; D'AZEVEDO, DIAS & TEIXEIRA, 2006; GIRIDHARA UPADHYAYA, RAVIKUMAR & UMAPATHY, 2009)

A literatura relata que as principais razões para a emergência de enterococos resistentes a múltiplas drogas estão relacionadas com a resistência intrínseca para vários agentes antimicrobianos e à capacidade de transferência genética dessa resistência. Esta transferência ocorre através da mobilidade de genes de resistência presentes em plasmídeos e transpósons, ou por recombinação homóloga (CETINKAYA, FALK & MAYHALL, 2000).

Estudos mostram que a forte associação dos enterococos com infecções hospitalares tem sido atribuída a sua inerente capacidade para resistir a estresses ambientais e a sua resistência

inata e adquirida para muitos antibióticos. Em particular, o aparecimento de estirpes de enterococos resistentes à vancomicina (VRE) proporcionou a estes micro-organismos uma tremenda vantagem seletiva, aumentando a probabilidade da propagação e persistência dos enterococos no ambiente hospitalar (MURRAY, 2000; SOOD *et al.*, 2008).

O tratamento das doenças causadas por enterococos é complicado devido à resistência intrínseca e adquirida a vários antibióticos. A eficácia da terapia antimicrobiana, necessária para o tratamento de infecções por enterococos, tem sido ameaçada pelo aparecimento crescente de altos níveis de resistência aos antimicrobianos, como à gentamicina e estreptomicina, em vários países, incluindo o Brasil (D'AZEVEDO, DIAS & TEIXEIRA, 2006). O surgimento de estirpes de enterococos resistentes à penicilina, à vancomicina e a altos níveis de aminoglicosídeos também se destaca como clinicamente importante, pois limita o tratamento com uso destes antibióticos (JANG *et al.*, 2010).

Os enterococos adaptaram-se para sobreviver em condições adversas no ambiente. A tolerância a condições extremas de pH, salinidade, temperatura e detergente é típica destas bactérias. Por exemplo, os *Enterococcus* spp. são capazes de sobreviver na presença de 6,5% de NaCl, pH 9,6 ou em temperaturas entre 10° e 45°C. Relatos mostram ainda que é possível que estes micro-organismos sobrevivam por 30 min a 60°C. Outro fator marcante nos enterococos é a sua capacidade de tolerar altas temperaturas, como 62°C, se primeiro as células passarem por um processo de adaptação em uma temperatura menor, como 50°C por 30 min (GILMORE, 2002; SOOD *et al.*, 2008). Estudo realizado por LAPORT e colaboradores em 2003 relatou, por exemplo, uma pequena taxa de sobrevivência por células de *E. faecium* submetidas a 70°C por 2 h.

O nome *Streptococcus faecalis* (*faecalis*, relacionado com fezes) foi usado primeiramente em 1906, por ANDREWS & HORDER (apud MURRAY, 1990), que isolaram este organismo de um paciente com endocardite. Na classificação de Lancefield, na década de 30, os enterococos foram incluídos como fazendo parte do grupo D (SHERMAN, 1937, *apud* MURRAY, 1990). Mais tarde, o termo *Enterococcus* foi utilizado agrupando organismos que cresciam sob condições extremas (SHERMAN, 1938, *apud* FACKLAM & TEIXEIRA, 1998). Durante a década de 80, a partir de estudos de similaridade de DNA, foi criado o novo gênero *Enterococcus* (SCHLEIFER & KILPPER-BÄLZ, 1984). Embora várias espécies de enterococos tenham sido identificadas, pelo menos 12 destas espécies são responsáveis por infecções enterocócicas. Atualmente, duas espécies, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, são responsáveis pela maioria das infecções em humanos (SOOD *et al.*, 2008).

E. faecalis são bactérias de caráter oportunista, capazes de sobreviver sob condições extremas e estão frequentemente envolvidas em contaminações de alimentos e água (MURRAY, 1990). Em um estudo analisando a ocorrência e distribuição de diferentes espécies de enterococos provenientes de carne e leite pasteurizado, FRACALANZZA e colaboradores em 2007 mostraram que a espécie *E. faecalis* era prevalente (62,6%) entre as espécies de enterococos encontradas nestes alimentos.

Geralmente, o tratamento térmico é utilizado para eliminar patógenos dos alimentos, porém alguns micro-organismos como *E. faecalis* podem se adaptar ao estresse térmico, causando danos ainda mais preocupantes (FLAHAUT *et al.*, 1997).

E. faecalis é a espécie mais frequentemente recuperada de espécimes clínicos humanos, representando 80 a 90% das estirpes isoladas (MURRAY *et al.*, 2003). Este micro-organismo é um patógeno clinicamente importante implicado em diferentes tipos de infecções, entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares envolvidos no processo de adaptação desta bactéria, que permite, por exemplo, a sobrevivência e o crescimento durante uma infecção na corrente sanguínea (CHANDLER, HIRT & DUNNY, 2005).

E. faecalis exibe resistência a altos níveis de alguns antimicrobianos e compartilha livremente determinantes de resistência a antibióticos com outras bactérias através de elementos genéticos móveis (KAK *et al.*, 2002), liderando a emergência de estirpes multirresistentes nos grupos hospitalares. O desenvolvimento efetivo de novos antibióticos para o combate de estirpes com múltipla resistência torna-se necessário e, para tal, é preciso um profundo entendimento da fisiologia e da genética destas bactérias (BOURGOGNE *et al.*, 2008).

VEBØ e colaboradores (2009), estudando o transcriptoma de *E. faecalis* V583 através do cultivo *in vitro* de *E. faecalis* no sangue, mostraram que alguns genes presentes no genoma desta bactéria poderiam ser candidatos potencialmente úteis para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas no tratamento de infecções por *E. faecalis*.

O genoma de *E. faecalis* V583 encontra-se sequenciado e disponível. Entretanto, a ocorrência de determinantes de resistência a múltiplos antibióticos nesta estirpe torna este micro-organismo de difícil manipulação genética (BOURGOGNE *et al.*, 2008). Assim, o uso de outras estirpes de *E. faecalis* para o estudo e entendimento desta espécie torna-se necessário. A estirpe OG1RF também se apresenta tão virulenta como a V583 em modelos hospedeiros de *Caenorhabditis elegans* (GARSIN *et al.*, 2001).

E. faeacalis OG1RF é derivada da estirpe OG1, porém com resistência à rifampicina e ao ácido fusídico (DUNNY, BROWN & CLEWELL, 1978). Por eletroforese de gel em campo

pulsado, MURRAY e colaboradores (1993) estimaram que o genoma de OG1RF apresenta o tamanho de 2.825 kb e criaram um mapa de restrição do seu cromossomo. Outros estudos mostraram que OG1RF é distinta da V583, diferindo em seis dos sete genes *housekeeping* (NALLAPAREDDY, SINGH & MURRAY, 2006). Em adição à virulência, a principal razão para a utilização da estirpe OG1RF no laboratório são os fatos desta estirpe não carrear plasmídeos, ser transformável por eletroporação e não apresentar resistência a outros antibióticos, que não sejam rifampicina e ácido fusídico. A falta de resistência à maioria dos antibióticos facilita a seleção de plasmídeos, transpósons e marcadores de substituição alélica introduzidos na estirpe (OLIVER, BROWN & CLEWELL, 1977; BOURGOGNE *et al.*, 2008).

A resistência a altas temperaturas e estresses em geral apresentada por *E. faecalis* tem conduzido à realização de diferentes estudos sobre a resposta ao choque térmico e a outros estresses, caracterizado pela expressão de proteínas com função de chaperonas moleculares ou proteases (LAPORT *et al.*, 2001; RINCÉ *et al.*, 2002; HEW, KORAKLI & VOGEL, 2006; LAPORT *et al.*, 2006).

2. Chaperonas Moleculares e Família Clp/ATPases

Mudanças nas condições ambientais ocasionam a síntese de um grupo de proteínas celulares em todos os organismos (HOURY, 2001). Esta conservada resposta molecular é melhor exemplificada através do estresse térmico. Esta observação foi primeiramente descrita por TISSIÈRES, MITCHELL & TRACEY em 1974, que mostraram que todos os organismos respondem a um súbito aumento da temperatura através da síntese de um pequeno grupo de proteínas. Algumas dessas proteínas, conhecidas como proteínas de choque térmico (HSP - *heat-shock proteins*) ou proteínas de estresse são encontradas em todos os organismos e induzidas por diferentes tipos de estresses (HENDERSON, ALLAN & COATES, 2006; SIKORA & GRZESIUK, 2007).

Inicialmente, as proteínas de choque térmico foram classificadas em famílias, de acordo com a massa molecular que apresentavam: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP10 e as pequenas HSPs (SHINNICK, 1991). A estrutura primária da maioria das HSPs permaneceu altamente conservada durante a evolução, sugerindo assim que essas proteínas exercem uma função similar em todos os organismos (SCHUMANN, 2003). Atualmente, as HSPs são classificadas pela função que exercem, sendo agrupadas como chaperonas moleculares e/ou proteases (GOTTESMAN, WICKNER & MAURIZI, 1997). As chaperonas moleculares são caracterizadas como polipeptídeos que promovem o enovelamento, desenovelamento,

montagem e desmontagem de outras proteínas, sem participarem da estrutura final das mesmas (BANEYX, 1994). A atividade de tais chaperonas moleculares é essencial para a sobrevivência da célula durante um choque térmico e para uma subsequente recuperação celular (CLARKE & ERIKSSON, 2000). Em muitos casos, chaperonas moleculares e proteases estão envolvidas no reparo de proteínas enoveladas incorretamente e trabalham juntas na degradação de proteínas inativas (GOTTESMAN, 1996; GOTTESMAN, WICKNER & MAURIZI, 1997).

Um dos principais problemas causados em uma célula por um repentino choque térmico é o imediato surgimento de proteínas desnaturadas e desenoveladas que tendem a agregar-se. Este processo pode ser prevenido pelo reconhecimento e a ligação das chaperonas às cadeias polipeptídicas inativas, em colaboração com proteases dependentes de ATP que degradam proteínas desnaturadas incapazes de retornar a sua conformação inicial (SCHUMANN, 2003).

Além das chaperonas moleculares serem induzidas por choque térmico, estas proteínas são essenciais também sob condições fisiológicas, pois interagem com polipeptídeos recém-sintetizados, promovendo o correto enovelamento, evitando agregações e se associando com proteínas a serem secretadas ou transportadas através de membranas, garantindo o seu endereçamento correto (CRAIG, GAMBILL & NELSON, 1993). Como mencionado, as proteínas de choque térmico são expressas de forma constitutiva nas células, contudo, existem aquelas formas que são induzidas mediante condições de estresse (KUHL, 2000). Entre os diferentes fatores de estresse que induzem a síntese das HSPs encontram-se o estresse térmico, o estresse oxidativo, a deficiência nutricional, a osmolaridade, as mudanças de pH, os estresses fisiológicos ou doenças, como infecção bacteriana ou viral, inflamação ou tumores (RITOSSA, 1996; MORIMOTO, 1998; JOLLY & MORIMOTO, 2000).

Quatro sistemas de chaperonas são encontrados no citoplasma de *Escherichia coli*: (1) o fator desencadeante (*trigger factor*) associado ao ribossomo, que auxilia no enovelamento de cadeias em processo de síntese; (2) o sistema HSP70, consistindo da DnaK (HSP70) e seus dois cofatores proteicos, DnaJ (HSP40) e GrpE (HSP20), que previne a agregação do peptídeo nascente com outras proteínas e evita que parte da cadeia peptídica que emerge do ribossomo inicie o enovelamento sem a presença de toda a cadeia ou domínio; (3) o sistema HSP60, que consiste de GroEL (HSP60) e de seu cofator GroES (HSP10), que ajuda no enovelamento de cadeias proteicas compactas, que apresentam suas superfícies hidrofóbicas expostas e (4) as Clp/ATPases, proteases caseinolíticas dependentes de ATP, que são tipicamente membros da família de proteínas de choque térmico ou HSP100 que atuam como chaperonas moleculares e proteases. Essas ATPases podem desenovelar proteínas, desagregar agregados proteicos pré-

formados, bem como marcá-los como alvo para degradação (HOURY, 2001), conforme mostrado na figura 1.

As proteínas de choque térmico HSP100 ou Clp/ATPases são membros da superfamília AAA (ATPases Associadas com uma variedade de Atividades celulares), que é caracterizada por um segmento conservado de cerca de 220 aminoácidos, conhecido como domínio AAA, que contém vários motivos conservados, incluindo aqueles necessários para a ligação e a hidrólise do ATP: o *Walker A* e o *Walker B*, respectivamente (NEWALD *et al.*, 1999).

A classificação dentro de subfamílias, ClpA, ClpB, ClpC, ClpE, ClpL, ClpV, ClpX e ClpY baseia-se na presença de sequências-assinaturas específicas e no número e espaço de sítios de ligação de nucleotídeos (INGMER *et al.*, 1999; PORANKIEWICZ, WANG & CLARKE, 1999; BUTLER *et al.*, 2006).

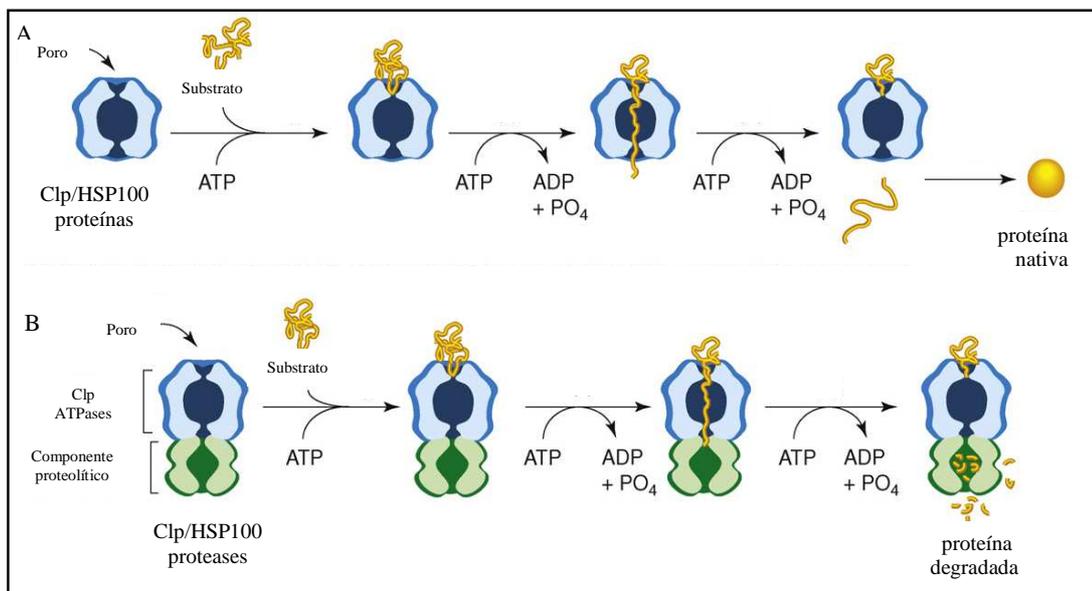


Figura 1 - Modelos para os mecanismos de ação das proteínas Clp/Hsp100. (A) Interação entre o substrato e a proteína Clp/Hsp100. O substrato é desenovelado através da translocação pelo canal central das proteínas Clp/Hsp100, usando energia da hidrólise de ATP. O polipeptídeo desenovelado é liberado, etapa induzida pela hidrólise de ATP, e enovelado de novo, espontaneamente ou com a ajuda de chaperonas moleculares, tornando-se proteína nativa. (B) Degradação do substrato por proteases associadas com Clp/Hsp100. Quando proteínas Clp/HSP100 estão associadas com uma peptidase, formam-se complexos proteolíticos que reconhecem, desdobram, translocam e promovem a degradação do substrato (adaptado de DOYLE & WICKNER, 2009).

Membros da família Clp/ATPases são classificados, baseando-se na presença de um ou dois domínios de ligação de ATP, onde proteínas de classe 1 possuem dois domínios de ligação de ATP, enquanto proteínas de classe 2, compostas por proteínas de menor tamanho, como a ClpM, ClpN ClpX e ClpY, contêm um único domínio de ligação de ATP, com maior similaridade com o sítio ATP-2 da classe 1 (SCHIRMER *et al.*, 1996). Estes domínios também são chamados de domínios *Walker* (WALKER *et al.*, 1982).

A presença de outros domínios ou sequências-assinaturas específicas é uma característica do grupo das proteínas Clps, onde se destacam: o domínio tripeptídico P requerido para ligação à proteína ClpP (KIM *et al.*, 2001); o domínio de ligação ao zinco, também chamado de dedo de zinco, possivelmente envolvido na dimerização (WOJTYRA *et al.*, 2003) e, ainda, os domínios N1 e N2 que parecem estar envolvidos na ligação de proteínas (BARNETT *et al.*, 2005).

As Clp/ATPases podem ser induzidas pela alta temperatura, estresse oxidativo, altas concentrações de sal ou etanol e limitação de ferro disponível (KRÜGER, VOLKER & HECKER, 1994; ROUQUETE *et al.*, 1996).

Embora designada como uma proteína Clp, protease caseinolítica, a ClpP não está relacionada com a família das Clp/ATPases e tem somente atividade de peptidase. Contudo, quando a ClpP está associada com membros da família das Clp/ATPases, conforme mostrado na figura 1, ela atua como uma serina-protease, prevenindo a acumulação de proteínas alteradas. Essas proteínas com enovelamento alterado podem se formar após estresse, sendo tóxicas para a célula bacteriana (MAURIZI *et al.*, 1990).

3. Regulação dos Genes *clp*

A regulação da resposta ao choque térmico em bactérias Gram-negativas tem sido estudada extensivamente em *E. coli*. Os genes *clpB*, *clpX* e *clpP* deste organismo são todos genes de choque térmico, cuja expressão é regulada pelo fator σ^{32} (KROH & SIMON, 1990; SQUIRES *et al.*, 1991).

Estudos da regulação da resposta ao choque térmico em micro-organismos Gram-positivos têm sido efetuados em *Bacillus subtilis*, onde os genes de estresse, agrupados dentro de classes, são regulados por mecanismos diferentes ao nível de transcrição (HECKER, SCHUMANN & VOLKER, 1996; SCHUMANN, 2003).

Os genes de classe I, que codificam chaperonas clássicas (DnaK, GroES e GroEL), são controlados pelo repressor HrcA, que reconhece um operador de sequência altamente conservada, nomeada CIRCE (*Controlling Inverted Repeat of Chaperone Expression*)

(ZUBER & SCHUMANN, 1994). Este elemento é composto por repetições invertidas com nove pares de bases, separadas por outros nove pares de bases quaisquer (TTAGCACTCX₉GAGTGCTAA) (ZUBER & SCHUMANN, 1994; MOGK *et al.*, 1997; NARBERHAUS, 1999).

Análises da regulação do gene *dnaK*, gene de classe I, realizadas em *E. faecalis*, mostraram o operon *dnaK* precedido por duas sequências CIRCE conservadas. Este mesmo estudo mostrou a expressão a partir de um promotor do tipo σ^A (σ -70), localizado a montante do gene *hrcA* e com múltiplos transcritos, que foram detectados após tratamento com choque térmico (LAPORT *et al.*, 2004).

Em *B. subtilis*, encontram-se ainda os genes de classe II que codificam proteínas de estresse em geral e a sua expressão requer o fator sigma de estresse σ^B . Genes de choque térmico de classe III, dentre os quais estão os genes que codificam as proteínas da família Clp/ATPases e a protease ClpP, são controlados pelo repressor CtsR, uma proteína ligada ao DNA que reconhece uma repetição direta de sete pares de bases (GGTCAA XAX GGTCAA) (DERRÉ, RAPOPORT & MSADEK, 1999).

Os genes das classes IV, V e VI são definidos como aqueles destituídos de CIRCE ou do operador CtsR e para os quais a indução por choque térmico ou condições de estresse, em geral, é independente de σ^B (CHASTANET & MSADEK, 2003; SCHUMANN, 2003).

Em muitas bactérias Gram-positivas com um baixo conteúdo G+C no genoma, a regulação dos genes *clp* é também mediada pelo repressor da transcrição CtsR, um mecanismo que parece ser altamente conservado nestas bactérias (DERRÉ, RAPOPORT & MSADEK, 1999; VARMANEN, INGMER & VOGENSEN, 2000; CHASTANET & MSADEK, 2003). Contudo, muitos mecanismos adicionais de controle para a expressão dos genes de choque térmico têm sido caracterizados em bactérias Gram-positivas, como o fator sigma σ^B , em *Staphylococcus aureus* (GERTZ *et al.*, 2000), o repressor HrcA, em *Streptococcus salivarius*, em *Staphylococcus epidermidis* e em *S. aureus* (CHASTANET, FERT & MSADEK, 2003), ou o repressor HspR, em *Streptomyces* spp., bactérias com um genoma de alto conteúdo G+C (GRANDVALET, CRECY-LAGARD & MAZODIER, 1999).

Em *B. subtilis*, verificou-se que o regulon CtsR consiste de seis membros: o operon tetracistrônico *clpC* e as unidades transcricionais monocistrônicas *clpP* e *clpE* (figura 2). Com o objetivo de melhor compreender a atividade do repressor CtsR em resposta ao choque térmico, estudos realizados em *B. subtilis* mostraram que todos os genes codificados pelo operon *clpC*, do qual consistem os genes *ctsR*, *mcsB*, *mcsA* e *clpC* mostrados na figura 2,

estão envolvidos na regulação da atividade do repressor CtsR (KRÜGER *et al.*, 2001). As proteínas McsB, McsA e ClpC formam um complexo ternário no qual a atividade de cinase da McsB é inibida durante a condição de ausência de estresse (KIRSTEIN *et al.*, 2005).

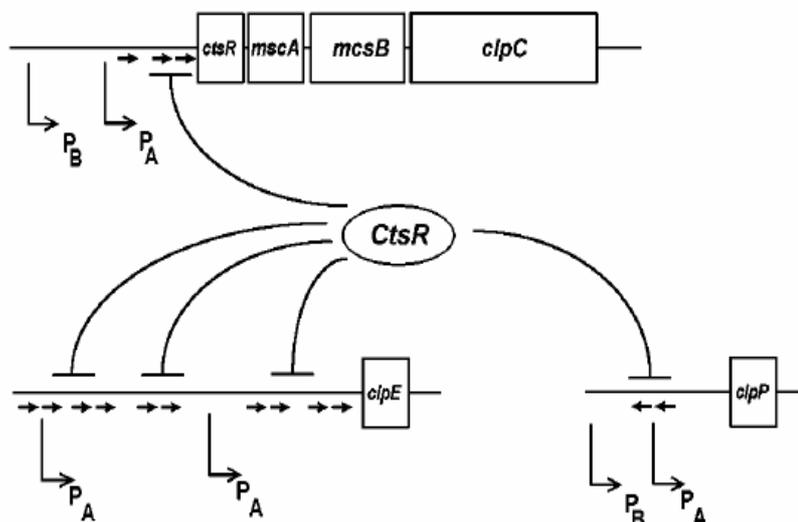


Figura 2 - Esquema do regulon CtsR em *B. subtilis*. Este regulon consiste de três unidades transcricionais, *clpC*, *clpP* e *clpE*, e todas estão sob o controle negativo do repressor CtsR. Este repressor liga-se a duas ou mais repetições diretas indicadas pelas setas. Cada gene é precedido por dois promotores: os genes *clpC* e *clpP* são precedidos por um promotor do tipo σ^A e outro do tipo σ^B , enquanto o gene *clpE* é precedido por dois promotores do tipo σ^A (SCHUMANN, 2003).

Em resposta ao estresse, a atividade repressora da CtsR é inibida pela fosforilação mediada por McsA-McsB. McsB necessita ser ativada por McsA que se torna simultaneamente fosforilada por McsB. A ativação da McsB resulta na forte inibição da atividade da CtsR quanto à ligação ao DNA e na imediata e simultânea fosforilação da CtsR. Este processo de fosforilação aumenta a afinidade da McsB por CtsR, levando à formação de um novo complexo ternário, McsB, McsA e CtsR. A formação deste complexo e a fosforilação de CtsR resultam na ausência da ligação da CtsR aos seus promotores-alvo, conduzindo à desrepressão do regulon CtsR (KIRSTEIN *et al.*, 2005; FREES *et al.*, 2007). Tem sido proposto ainda que McsB pode modificar CtsR, tornando-a alvo de degradação pelo complexo ClpCP (KRÜGER *et al.*, 2001). KIRSTEIN e colaboradores (2005) mostraram *in vivo* e *in vitro* que a fosforilação da proteína CtsR pela tirosina-cinase McsB e seu ativador McsA é importante para a inibição e a degradação da CtsR após choque térmico.

O sistema de regulação CtsR é altamente conservado em bactérias Gram-positivas de baixo conteúdo G+C e, em sua maioria, o sítio de ligação de CtsR é encontrado a montante dos genes *clp* (DERRÉ *et al.*, 1999).

4. ClpB

As proteínas ClpB (peptidases caseinolíticas B) são chaperonas moleculares que têm a habilidade de solubilizar várias proteínas que se tornam agregados proteicos após severos estresses sofridos pela célula. Embora não sejam tão requeridas sob condições normais, essas proteínas podem apresentar síntese aumentada quando células são expostas a condições extremas de calor ou outros estresses (SANCHEZ *et al.*, 1993).

A ClpB é membro da família de proteínas de choque térmico HSP100, que apresenta um importante papel na sobrevivência da célula durante estresses (YUAN *et al.*, 2007). Esta família de proteínas está envolvida em diversos processos celulares, tais como: controle de qualidade celular, degradação de proteínas, replicação do DNA e transporte de vesículas, entre outros (FRÖHLICH, 2001; IYER *et al.*, 2004).

Atuando exclusivamente como uma chaperona molecular, a proteína ClpB, ao contrário de outras proteínas Clp, não forma complexos com subunidades proteolíticas, como a ClpP. Este fato deve-se à ausência de uma sequência tripeptídica que caracteriza a ligação entre uma Clp/ATPase e uma peptidase (KIM *et al.*, 2001). A ausência de uma interação entre a proteína ClpB e peptidases sugere que o papel da ClpB na solubilização de agregados proteicos está conservado em bactérias Gram-positivas (MOGK *et al.*, 1999).

Sendo membro da família das proteínas de classe 1- AAA+, a ClpB consiste de domínios de ligação ao ATP que são flanqueados por uma região N-terminal e um domínio C-terminal e separados por um domínio central, conforme mostrado na figura 3. A ClpB distingue-se de outras grandes proteínas Clp devido ao longo intervalo entre os dois domínios de ligação ao ATP. Seis subunidades de ClpB reúnem-se em um anel hexamérico, formando a unidade funcional de ClpB (ZOLKIEWSKI, 2006).

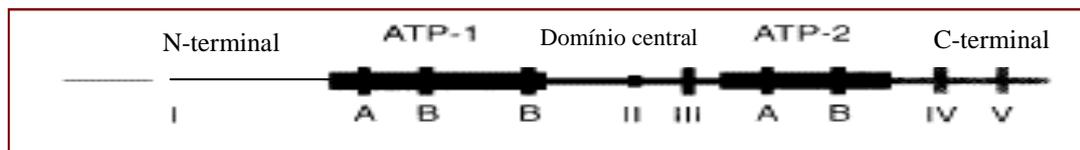


Figura 3 - Esquema estrutural da proteína ClpB, demonstrando a classificação da proteína dentro da classe I da família das Clp/ATPases; observam-se os domínios de ligação ao ATP característicos desta proteína (adaptado de SCHIRMER *et al.*, 1996).

A ClpB é diferente de outras Clp, visto que esta proteína não se associa com subunidades peptídicas, sendo encontrada não apenas em organelas eucarióticas e em procariotos, mas também no citoplasma de células de levedura e de plantas. Na verdade, a função da ClpB é distinta das outras Clp/ATPases, uma vez que não estaria envolvida na degradação de proteínas. Ao invés disso, a ClpB é responsável por desagregar e reativar complexos proteicos (MOTOHASHI *et al.*, 1999). O mecanismo de desagregação de proteínas mediado pela ClpB baseia-se no mesmo princípio usado por outras Clp/ATPases: a translocação dependente de energia do polipeptídeo diretamente no centro do poro do anel oligomérico e seu forçado desdobramento (ZOLKIEWSKI, 2006).

Como dito anteriormente, a ClpB não se associa com ClpP para a degradação de proteínas; entretanto, a proteína ClpB associada com DnaK/DnaJ forma um sistema de bichaperonas que solubiliza proteínas agregadas (MOTOHASHI *et al.*, 1999; KEDZIERSKA *et al.*, 2005).

A proteína ClpB tem sido caracterizada em diferentes micro-organismos. Duas proteínas ClpB estão presentes em procariotos e eucariotos e, em cada caso, ambas as formas são HSPs. Em *Synechococcus* spp., as duas formas proteicas foram encontradas a partir da detecção com anticorpo policlonal direcionado para o domínio carboxi-terminal da proteína ClpB. Um único gene codifica duas proteínas ClpB de diferentes tamanhos, uma de 94 kDa e outra com 78 kDa (PORANKIEWICZ & CLARKE, 1997). Foi mostrado, em bactérias, que as duas formas distintas da proteína são provenientes de dois sítios de iniciação da tradução em um único transcrito (SQUIRES *et al.*, 1991; CHASTANET *et al.*, 2004). Em *E. coli*, a inativação do gene *clpB* não somente eliminou a síntese da proteína ClpB como também levou à inativação de uma outra proteína de menor tamanho. Este estudo concluiu que a proteína menor é derivada da mesma sequência de leitura aberta correspondente à proteína

ClpB, provavelmente pela tradução a partir de um segundo códon de iniciação (SQUIRES *et al.*, 1991).

Estudos investigando o papel da ClpB na resposta ao choque térmico em *Caulobacter crescentus* mostraram que a proteína ClpB estaria envolvida na termotolerância e na resposta ao choque térmico e ao etanol mas não na resposta a outros estresses (SIMÃO *et al.*, 2005).

A termotolerância é o fenômeno geralmente usado para referir-se ao estado transitório de resistência do micro-organismo às pressões destrutivas de calor ou efeitos citotóxicos, subsequentes ao tratamento térmico letal (CARPER, DUFFY & GERNER, 1987). A importância da ClpB na aquisição de termotolerância foi demonstrada em estudos realizados com diferentes micro-organismos, tais como: *S. aureus* (FREES *et al.*, 2004), *Listeria monocytogenes* (CHASTANET *et al.*, 2004), *C. crescentus* (SIMÃO *et al.*, 2005) e *Synechococcus* spp. (ERIKSSON & CLARKE, 1996).

Outros estudos focando a caracterização e as funções da ClpB têm mostrado que esta proteína apresenta importante papel na virulência. Em *L. monocytogenes* (CHASTANET *et al.*, 2004), *Salmonella typhimurium* (TURNER *et al.*, 1998), *Leishmania donovani* (CLOS *et al.*, 2001) e *Porphyromonas gingivalis* (YUAN *et al.*, 2007), a ausência do gene *clpB* resultou em um decréscimo da virulência ocasionada por estes micro-organismos, em alguns casos, tanto *in vivo* como *in vitro*.

5. Papel de outras proteínas da família Clp/HSP100

As proteínas ClpA, ClpB, ClpC, ClpD, ClpX e ClpY constituem uma família de proteínas conservadas que são encontradas tanto em células procarióticas como eucarióticas (SCHIRMER *et al.*, 1996). As proteínas Clps podem ser induzidas pela alta temperatura, estresse oxidativo, altas concentrações de sal ou etanol e limitação de ferro disponível (KRÜGER, VOLKER & HECKER, 1994; ROUQUETE *et al.*, 1996; SCHIRMER *et al.*, 1996).

Muitas Clp/ATPases, com notável exceção de ClpB e ClpL, formam complexos com subunidades peptídicas. A ClpB atua exclusivamente como uma chaperona molecular, enquanto ClpA e ClpX, por exemplo, funcionam como chaperonas que, uma vez ligadas à ClpP, formam as proteases ClpAP e ClpXP (figura 3), dependentes de ATP. A sequência tripeptídica, na qual o primeiro aminoácido pode ser leucina, isoleucina, valina, metionina ou prolina; o segundo é sempre glicina e o terceiro, fenilalanina ou leucina, representada como [LIVMP]-G-[FL] é um indicador da presença de uma Clp/ATPase ligando-se à ClpP e foi

encontrada em muitos membros da subfamília das proteínas ClpA, ClpC, ClpE e ClpX (figura 4) (KIM *et al.*, 2001).

Na literatura, alguns trabalhos têm descrito o papel das proteínas Clps em cocos Gram-positivos. Destacam-se como principais gêneros de cocos Gram-positivos com importância clínica: *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus*. Nestes gêneros, encontram-se algumas espécies responsáveis por doenças muito comuns na comunidade e no meio hospitalar, que podem ser agudas ou crônicas e ainda resultar em maiores complicações (MANDELL, DOUGLAS & BENNETT, 1995).

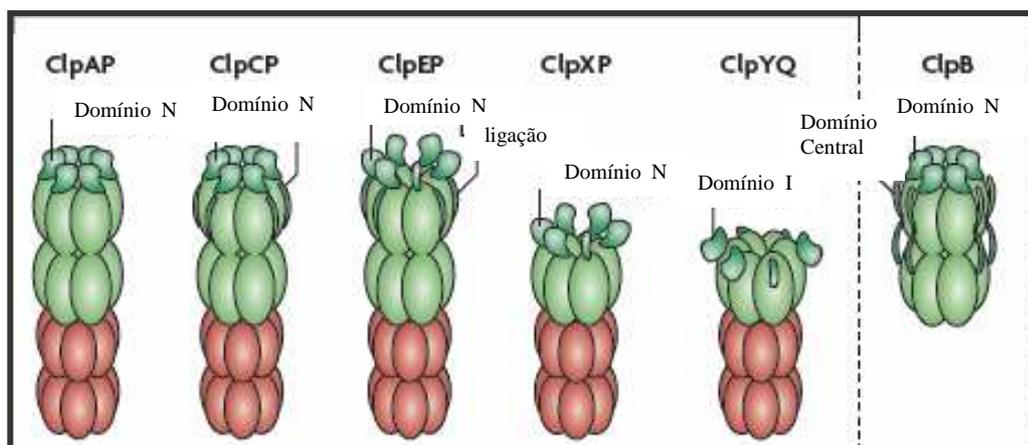


Figura 4 - Composição e estrutura das Clp/HSP100. Com exceção da ClpB, as demais proteínas Clp/HSP100 podem interagir com a protease ClpP, formando um complexo proteolítico. Os domínios AAA+ e associados estão em verde e os domínios ou subunidades das proteases (ClpP e ClpQ) estão em vermelho (KIRSTEIN *et al.*, 2009, com modificações).

No gênero *Streptococcus*, o trabalho publicado em 2002 por LEMOS e BURNE demonstrou a regulação e a significância fisiológica de ClpC e ClpP em *S. mutans*. Neste estudo, a expressão dos genes *clpC* e *clpP* foi induzida em baixo pH e em crescimento acima de 40°C. A estirpe mutante para o gene *clpP*, mas que apresentava o gene *clpC* íntegro, formava longas cadeias e foi prejudicada quanto a sua habilidade para crescer sob condições de estresse, capacidade de formar biofilme e quanto à eficiência de transformação genética (LEMOS & BURNE, 2002).

A análise da capacidade de formar biofilme por estirpes de *S. mutans* mutantes para os genes *clpL*, *clpP* e *clpX* mostrou um aumento significativo na formação de biofilme, na presença de sacarose. Entretanto, o mesmo estudo mostrou que a formação de biofilme pelos mutantes afetados em *clpX* e *clpP* foi prejudicada, quando as estirpes mutantes foram crescidas em meio contendo glicose como única fonte de carbono (KAJFASZ *et al.*, 2009).

Estudos em *Streptococcus pneumoniae* mostraram que mutantes para o gene *clpP* apresentaram-se sensíveis a altas temperaturas e a concentrações de peróxido de hidrogênio e de puromicina. Além disso, a proteína ClpP foi requerida para a colonização e a sobrevivência intracelular de *S. pneumoniae* em células do hospedeiro (KWON *et al.*, 2003; 2004).

Foi observado, em *S. pneumoniae* R6, que a ausência da proteína ClpX resultou em uma rápida perda da viabilidade celular, mostrando que o gene *clpX* é essencial para o crescimento deste micro-organismo. Porém, o mesmo não foi relatado para o gene *clpP*. A proteína ClpX mostrou-se essencial também em *Lactococcus* spp. e *Streptococcus* spp. Entretanto, a base molecular responsável por esta observação permanece desconhecida (ROBERTSON *et al.*, 2003, FREES *et al.*, 2007).

A função da ClpX pode variar entre os micro-organismos, visto que, em *B. subtilis*, mutantes no gene *clpX* foram sensíveis ao calor, enquanto que, em *S. aureus*, a deleção do gene *clpX* resultou na tolerância ao calor, demonstrando que a proteína ClpX não estava cooperando na degradação de proteínas danificadas pelo calor (FREES *et al.*, 2003; 2004).

Notavelmente, o gene *clpX* parece não fazer parte do regulon CtsR em nenhum organismo estudado. Baseando-se nesta observação e na ausência da indução da ClpX sob condições de calor, especula-se que o papel celular primário da ClpX em bactérias Gram-positivas de baixo conteúdo G+C não está ligado ao controle das proteínas que sofreram danos causados por estresses (GERTH *et al.*, 1996; FREES *et al.*, 2003; 2007).

O papel da proteína Clp/HSP100 também tem sido estudado em *S. aureus*. A proteína ClpL também é destituída da sequência tripeptídica característica para ligação à ClpP, mostrando que, assim como ClpB, esta proteína não tem função de protease. Em *S. aureus*, o fenótipo dos mutantes para os genes *clpB* e *clpL* sugere que ambas as proteínas, ClpB e ClpL, podem apresentar funções similares (FREES *et al.*, 2004).

Em 2003, FREES e colaboradores, estudando as funções das proteínas ClpX e ClpP na virulência e tolerância ao estresse em *S. aureus*, mostraram que as ambas proteínas são importantes para o crescimento bacteriano na presença de estresse oxidativo ou em baixas temperaturas. Os mesmos autores mostraram ainda que tanto a proteína ClpX como a ClpP contribuem para a virulência em camundongos infectados com *S. aureus*. Outro estudo realizado por FREES e colaboradores, publicado em 2004, demonstrou que Clp/ATPases são requeridas para a tolerância ao estresse, divisão celular e formação de biofilme em *S. aureus*.

Na ausência de associações com ATPases, a ClpP degrada somente peptídeos pequenos (WOO *et al.*, 1989), mas associada com ClpA ou ClpX, a ClpP apresenta atividade de protease contra substratos específicos. A especificidade é determinada pela subunidade da

ATPase que serve para desdobrar e translocar o substrato dentro do compartimento proteolítico da ClpP (HOSKINS *et al.*, 1998, 2000).

Em *Lactococcus lactis*, três genes *clp* (*clpB*, *clpC* e *clpE*), que codificam proteínas Clp contendo dois domínios conservados de ligação de ATP, foram identificados. O nível da expressão dos genes *clpB*, *clpC* e *clpE* foi aumentado durante choque térmico (INGMER *et al.*, 1999).

A comparação entre um duplo mutante *clpP* e *htrA* de *L. lactis* e a estirpe selvagem revelou uma redução da atividade proteolítica nesta bactéria, mostrando o papel da protease intracelular ClpP e da extracelular HtrA (CORTES-PEREZ *et al.*, 2006).

Em *B. subtilis*, os genes codificando ClpC, ClpY, ClpQ, ClpX e ClpP têm sido caracterizados (MSADEK, KUNST & RAPOPORT, 1994; SLACK *et al.*, 1995; GERTH *et al.*, 1996; MSADEK *et al.*, 1998). Publicações a respeito das Clps em *B. subtilis* têm demonstrado que a presença da ClpC, ClpP ou ClpX na célula é essencial para a tolerância ao estresse, porque mutantes *clp* não podem crescer sob diferentes condições de estresse (KRÜGER, VÖLKER & HECKER, 1994; GERTH *et al.*, 1998; MSADEK *et al.*, 1998).

Em *L. monocytogenes*, foi demonstrada a participação dos genes *clpP*, *clpC* e *clpE* no parasitismo intracelular (GAILLOT *et al.*, 2000), na adesão celular (NAIR, MILOHANIC & BERCHE, 2000) e na virulência (NAIR *et al.*, 1999).

A ClpC de *L. monocytogenes* é necessária para o crescimento intracelular e a sobrevivência *in vivo* no tecido de hospedeiros, promovendo o escape do compartimento fagossômico (ROUQUETTE *et al.*, 1996, 1998) e também é necessária para a adesão e a invasão celular (NAIR, MILOHANIC & BERCHE, 2000).

Em alguns organismos, as proteínas de choque térmico ClpC, ClpX e ClpP apresentam um papel essencial na resposta adaptativa da fase estacionária, assim como no desenvolvimento de competência, na motilidade e na esporulação, e também são requeridas para o crescimento em altas temperaturas e a tolerância ao estresse (KRÜGER, VOLKER & HECKER, 1994; MSADEK, KUNST & RAPOPORT, 1994; GERTH *et al.*, 1996, 1998; MSADEK *et al.*, 1998).

A literatura relata que a inativação do gene *clpP* em *B. subtilis*, *L. lactis*, *L. monocytogenes*, *S. pneumoniae*, *S. mutans* e *S. aureus* resulta em mutantes que são significativamente mais sensíveis ao calor e a outras condições de estresse do que as suas respectivas estirpes selvagens (MSADEK *et al.*, 1998; FREES & INGMER, 1999; GAILLOT *et al.*, 2000; LEMOS & BURNE, 2002; ROBERTSON *et al.*, 2002; FREES *et al.*, 2003).

Um grupo de estudos relatou que a capacidade para sobreviver em condições de estresse, frequentemente envolvendo uma aumentada expressão de genes de resposta ao estresse, está altamente correlacionada com a virulência em *S. aureus* (CLEMENTS & FOSTER, 1999) e outros patógenos (HÜBEL *et al.*, 1997; ROUQUETE *et al.*, 1998). O papel das proteínas Clp/HSP100 na virulência de bactérias tem sido observado, como ClpX de *S. aureus* (FREES *et al.*, 2003), ClpE e ClpC de *S. pneumoniae*, ou ainda ClpB, ClpC, ClpE e ClpP de *L. monocytogenes* (GAILLOT *et al.*, 2000; CHASTANET *et al.*, 2004).

Em *L. monocytogenes*, a ausência da proteína ClpP resultou em estirpes não virulentas em modelo de camundongo, uma vez que a deleção do gene *clpP* reduziu fortemente a atividade hemolítica de um dos maiores fatores de virulência da *Listeria* spp., a listeriolisina O, que é requerida pela bactéria para escapar de macrófagos (GAILLOT *et al.*, 2000).

De acordo com FREES e colaboradores (2003), as proteínas ClpX e ClpP afetam a virulência de *S. aureus*, sugerindo que, assim, como em outros micro-organismos, estas proteínas contribuem regulando a expressão de fatores de virulência da bactéria.

JUSTIFICATIVA

O gênero *Enterococcus* encontra-se presente no grupo de bactérias cocos Gram-positivos de baixo conteúdo G+C, com grande importância clínica. Entretanto, ainda não existem trabalhos publicados caracterizando os genes *clp* que codificam as proteínas da família HSP100 ou Clp/ATPases. A importância clínica apresentada pelos *Enterococcus* spp., assim como a sua marcante resistência ao calor, justificaram a necessidade de se realizar este trabalho relacionado às proteínas de choque térmico Clp/ATPases neste micro-organismo.

OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a regulação da expressão dos genes *clpB*, *clpC*, *clpE*, *clpP* e *clpX* sob diferentes condições de estresse, assim como caracterizar a função da proteína ClpB e do repressor CtsR através da análise dos mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$ em *E. faecalis*.

Os objetivos específicos foram:

- 1) Analisar as regiões promotoras dos genes *clp* presentes em *E. faecalis* V583.
- 2) Obter células mutantes dos genes *clpB* e *ctsR* em *E. faecalis* OG1RF.
- 3) Estudar a função dos genes *clpB* e *ctsR*, através da análise dos mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$ de *E. faecalis* OG1RF quanto: (i) a sua capacidade de sobreviver sob condições de estresse (térmico, ácido, salino e oxidativo), (ii) a sua capacidade de formar biofilme e (iii) à participação destes genes na virulência em *Galeria mellonella*.
- 4) Analisar a expressão dos genes *clpB*, *clpC*, *clpE*, *clpP* e *clpX* na estirpe selvagem de *E. faecalis* OG1X, através de estudos por “northern blot”, e a regulação da expressão destes mesmos genes na estirpe selvagem e no mutante $\Delta ctsR$ de *E. faecalis* OG1RF, através de qRT-PCR.

MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir, encontram-se descritas, as principais metodologias que foram utilizadas para a realização deste projeto, conforme os objetivos apresentados.

1. Estirpes bacterianas e condições de cultivo

As estirpes bacterianas, as estirpes derivadas e os plasmídeos utilizados neste trabalho encontram-se descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Estirpes bacterianas e plasmídeos usados neste trabalho.

Estirpes e suas derivadas	Características	Referências
<i>E. faecalis</i>		
OG1X	Sensível à canamicina	IKE <i>et al.</i> , 1983
OG1RF	Estirpe Rif ^r , Fus ^r	DUNNY, BROWN & CLEWELL, 1978.
V583	Estirpe clínica; Van ^r	www.tigr.org
CK111	Estirpe conjugativa, doadora, carreando no cromossomo um alelo <i>repA</i> ; Sp ^r , Tet ^r .	KRISTICH, CHANDLER & DUNNY, 2007
EF- <i>clpB</i>	Mutante com deleção no gene <i>clpB</i> - $\Delta clpB$	Este estudo
EF- <i>ctsR</i>	Mutante com deleção no gene <i>ctsR</i> - $\Delta ctsR$	Este estudo
<i>E. coli</i>		
DH10B	Hospedeira para clonagem	GRANT <i>et al.</i> , 1990
EC1000	Hospedeira para clonagem em plasmídeos dependentes de <i>repA</i> .	LEENHOUTS <i>et al.</i> , 1996
Plasmídeos		
pGEM7	Vetor de clonagem; Amp ^r , <i>lacZ</i>	Promega
pCJK47	Plasmídeo utilizado na troca genética sem a utilização de um marcador de seleção; carreando <i>oriT</i> _{PCF10} , <i>lacZ</i> , cassete P- <i>pheS</i> *; Erm ^r	KRISTICH, CHANDLER & DUNNY, 2007

onde: Amp^r, resistência à ampicilina; Erm^r, resistência à eritromicina; Fus^r, resistência ao ácido fusídico; *lacZ*, gene que codifica a β -galactosidase; *oriT*, origem de transferência; P-*pheS*, cassete de fenilalanina; *repA*, gene que codifica a proteína iniciadora da replicação; Rif^r, resistência à rifampicina; Sp^r, resistência à espectinomicina; Tet^r, resistência à tetraciclina; Van^r, resistência à vancomicina; *, representa uma mutação no gene.

Durante a realização deste trabalho, quatro estirpes de *E. faecalis* foram utilizadas: a estirpe *E. faecalis* OG1X, sensível à canamicina, foi usada para o estudo da expressão dos genes *clp* através de uma análise por “northern blot”. A estirpe *E. faecalis* OG1RF, derivada de OG1, porém previamente selecionada em rifampicina e ácido fusídico, gerando OG1RF

[estirpe depositada na “American Type Culture Collection (ATCC)”] e a estirpe *E. faecalis* CK111 foram usadas na construção dos mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$. Por último, foram utilizados ainda os dados anotados da estirpe *E. faecalis* V583, que apresenta um perfil de resistência a múltiplas drogas e cujo genoma está sequenciado e disponível (www.tigr.org). A estirpe V583 apresenta resistência à vancomicina e é derivada de cultura de sangue de um paciente do hospital “Barnes Hospital, St Louis, MO, USA”.

Os seguintes meios foram utilizados para o crescimento das estirpes:

- BHI (Difco), para o cultivo de estirpes de *E. faecalis* a 37°C.
- LB (Difco), para o cultivo de estirpes de *E. coli* a 37°C.
- M9 10X [Na₂HPO₄ 6% (p/v); KH₂PO₄ 3% (p/v); NaCl 0,5% (p/v); NH₄Cl 1% (p/v)].
- MM9YEG, meio base semidefinido [M9 10X 10% (v/v); extrato de levedura 0,25% (p/v); Difco]; *p*-cloro-fenilalanina 10 mM (p-Cl-phe; Sigma); ágar 1,5% (p/v) (“Bacto agar”) suplementado com glicose 0,5% (v/v).
- BM, meio base definido [“Base medium”: MgSO₄.7H₂O 0,5% (p/v); CaCl₂.2H₂O 0,5% (p/v); glicose 1% (p/v); 100X solução de vitamina; 100X solução de aminoácidos] para análise da formação de biofilme de *E. faecalis*.
- 100X solução de aminoácidos [L-glutâmico 5% (p/v); L-arginina 2% (p/v); L-cisteína 2% (p/v); triptofano 0,2% (p/v)].
- 100X solução de vitaminas [piridoxina 0,24% (p/v); ácido nicotínico 0,046% (p/v); ácido pantotênico 0,024% (p/v); riboflavina 0,004% (p/v); tiamina 0,001% (p/v); D-biotina 0,00012% (p/v)].

Estes meios foram utilizados em caldos ou sólidos [acrescidos de ágar a 1,5% (p/v)].

Cada estirpe foi cultivada em placas de Petri com meio BHI ou LB sólido e incubada a 37°C, por 16 h. Uma colônia de cada estirpe foi semeada em caldo BHI ou LB e incubada a 37°C, por 16 h. Cada estirpe foi armazenada em meio BHI ou LB contendo glicerol 50% (v/v), a - 20°C ou - 80°C. Quando necessário, os meios foram acrescidos dos seguintes antibióticos: ampicilina (100 µg/ml), eritromicina (10 µg/ml, para *E. faecalis*; 300 µg/ml, para *E. coli*), tetraciclina (10 µg/ml), espectinomicina (1.000 µg/ml), rifampicina (200 µg/ml) ou ácido fusídico (25 µg/ml). Quando necessário, a solução de X-Gal (20 mg/ml; Invitrogen) foi acrescida ao meio na concentração de 250 µg/ml, para *E. faecalis*, e 60 µg/ml, para *E. coli*.

2. Análise de cinética de crescimento

Para se avaliar a capacidade da estirpe *E. faecalis* OG1RF e dos seus respectivos mutantes crescerem sob condições de estresse, culturas da estirpe selvagem e dos mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$, na fase exponencial, foram diluídas 1:100 em meio fresco e o crescimento foi monitorado usando-se o monitor de crescimento “Bioscreen C” (Oy Growth Curves AB Ltd, Helsinki), conforme descrito por Abranches e colaboradores, em 2009. Foram realizadas leituras da DO_{600nm} em intervalos de 30 min, por 24 h, e as análises foram expressas através de gráficos.

3. Cinética de sobrevivência

Para se avaliar a capacidade de sobrevivência da estirpe selvagem e dos mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$ de *E. faecalis* OG1RF sob condições letais de estresse oxidativo, culturas celulares na fase exponencial foram diluídas 1:100 em meio fresco e, em seguida, mantidas a 37°C até atingirem uma leitura de DO_{600nm} correspondente a 0,5. Posteriormente, as culturas foram submetidas a peróxido de hidrogênio 30 mM durante 2 h. Em intervalos de 30 min, diluições seriadas foram realizadas em solução salina [NaCl 0,85% (p/v)] e alíquotas de 100 μ l de cada diluição foram então semeadas em ágar-BHI. A sobrevivência das células viáveis foi determinada pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/ml), após incubação das placas a 37°C por 16 h.

4. Análise da indução das proteínas ClpB e CtsR na termotolerância

Para se testar o envolvimento das proteínas ClpB e CtsR na indução por termotolerância, culturas das estirpes selvagens *E. faecalis* OG1RF e dos mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$ foram divididas em duas alíquotas, onde uma delas foi mantida a 37°C e a outra pré-incubada a 48°C por 30 min. Em seguida, ambas alíquotas de todas as culturas foram submetidas ao tratamento com choque térmico a 60°C, durante 30 e 60 min. Decorrido cada tempo, diluições 1/10 apropriadas foram realizadas e alíquotas semeadas em ágar-BHI. Para análise da sobrevivência das células, as unidades formadoras de colônias foram contadas (UFC/ml), após incubação das placas a 37°C por 16 h (CHASTANET *et al.*, 2004, com modificações).

5. Teste de difusão a partir de disco

A sensibilidade da estirpe selvagem *E. faecalis* OG1RF e dos mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$, quanto ao crescimento em condições de estresse, tais como: ácido, alcalino e oxidativo, foi

testada através da inibição do crescimento empregando-se o método de difusão a partir de disco (ABRANCHES et al., 2009). Para tal, uma camada uniforme de uma cultura celular em crescimento exponencial foi aplicada em uma placa contendo ágar-BHI, usando-se um “swab” estéril. Em seguida, discos de papel de filtro (1 mm de espessura) saturado com a substância de interesse foram colocados sobre o meio de cultura. As placas foram incubadas a 37°C por 16 h e o halo de inibição foi avaliado, comparando-se as estirpes mutantes com a selvagem. Cada estirpe foi testada em relação a todos os agentes em uma mesma placa e o experimento foi realizado em triplicata.

6. Determinação da CMI (concentração mínima inibitória)

A concentração mínima inibitória (CMI) para antibióticos, tais como: ampicilina, canamicina, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, norfloxacin, tetraciclina e vancomicina, foi determinada em caldo BHI usando-se diluições do antibiótico (1.024 a 2 µg/ml). Dentro de cada poço da placa de microdiluição foram adicionados 200 µl de cada antibiótico e 5 µl de uma cultura bacteriana em fase exponencial. Em seguida, a placa de microdiluição foi incubada a 37°C, por 18 h. Após este tempo, a densidade ótica (DO_{600nm}) da cultura em cada poço foi avaliada através de um espectrofotômetro para placa de microdiluição (“Benchmark Plus” – BioRad) e a menor concentração do antibiótico que inibiu o crescimento celular foi designada como a concentração mínima inibitória das estirpes selvagens *E. faecalis* OG1RF e dos mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$, (ABRANCHES et al., 2009, com modificações).

7. Capacidade da formação de biofilme por mutantes *clp* de *E. faecalis*

Para a análise da formação de biofilme, a estirpe selvagem e seus respectivos mutantes em *E. faecalis* OG1RF foram crescidos em meio semidefinido BM (descrito no item 1), por 24 h a 37°C. A análise da formação de biofilme foi realizada, conforme descrito por ABRANCHES e colaboradores (2009).

A partir de culturas de *E. faecalis* OG1RF crescidas a 37°C por 18 h, em caldo BHI, foram feitas diluições de 1:10 em meio semidefinido BM com glicose 1% (p/v). Em seguida, foram distribuídos 300 µl da cultura nos poços das placas de microdiluição, que foram incubadas a 37°C, por 24 h. A placa foi retirada da temperatura de 37°C e o meio desprezado para a retirada das células planctônicas. Para lavagem, a placa foi mergulhada em água destilada e, em seguida, adicionou-se aos poços 50 µl de cristal violeta (0,1% p/v). Após

incubação à temperatura ambiente por 15min, uma última lavagem em água corrente foi realizada e depois adicionaram-se 200 µl de uma solução de ácido acético 33% (v/v), a cada poço da placa. A absorbância das células de biofilme foi analisada em uma leitura de DO_{575nm}, através de espectrofotômetro (“Spectrophotometer DU 650” – Beckman).

8. Preparo de células competentes de *E. coli*

O preparo de células competentes foi realizado para as estirpes *E. coli* DH10B e EC1000. Uma cultura de células de *E. coli* foi crescida a 37°C durante 16 h em meio LB, sob agitação. A partir desta cultura, uma diluição de 1:100 em meio LB fresco foi realizada e incubada a 37°C sob agitação, até atingir a DO_{600nm} de 0,5. Em seguida, a cultura foi resfriada em gelo durante 30 min. As células foram coletadas por centrifugação a 1.000xg por 10 min 4°C e, em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células suspensas em CaCl₂ 100 mM adicionado de glicerol 10% (v/v). Durante um período de 30 min, as células foram novamente resfriadas em gelo e, ao fim deste período, foram coletadas por centrifugação a 1.000xg a 4°C por 10 min. O sobrenadante foi descartado e as células foram imediatamente suspensas em CaCl₂ 100 mM adicionado de glicerol 10% (v/v). As células foram divididas em alíquotas com 50 µl cada e estocadas a – 80°C até o momento do uso (SAMBROOK & RUSSELL, 2001).

9. Preparação de células eletrocompetentes de *E. faecalis* CK111

As células de *E. faecalis* eletrocompetentes foram preparadas conforme descrito por BAE, KOZLOWICZ & DUNNY (2002). Células de *E. faecalis* CK111 foram crescidas em caldo BHI, por 16 h a 37°C. Uma diluição de 1/10 foi realizada em um volume final de 50 ml, utilizando-se caldo BHI fresco, e incubada a 37°C sob agitação até atingir a DO_{600nm} de 0,5. Após esta etapa, a cultura foi centrifugada a 4°C por 20 min a 1.000xg e as células foram suspensas em uma solução de glicerol 10% (v/v). A suspensão celular foi dividida em tubos contendo 1 ml e, para cada volume, foram acrescidos 250 µl de solução de lisozima [25 µg/ml de lisozima em Tris/HCl 10 mM (pH 8,0); sacarose 25% (p/v); EDTA 10 mM e NaCl 50 mM]. Em seguida, as suspensões celulares foram incubada durante 2 h a 37°C, para lise das células. Decorrido este tempo, as suspensões foram centrifugadas a 4°C por 5 min a 1.000xg e os precipitados foram lavado três vezes em uma solução de eletroporação gelada [sacarose 0,5M e glicerol 10% (v/v)]. Após as lavagens, as células foram suspensas na mesma solução de eletroporação e alíquotas de 100 µl foram armazenadas a – 80°C até o momento de uso.

10. Extração de DNA plasmidial de *E.coli* DH10B e EC1000

Uma cultura crescida em 10 ml de LB a 37°C, por 16 h, foi centrifugada a 14.000xg, por 20 min. A extração do DNA plasmidial foi realizada a partir de células submetidas ao protocolo de extração do sistema comercial (“QIAprep Spin – Minipreps Kit – Qiagen”), segundo as instruções do fabricante.

11. Dosagem de ácidos nucleicos e digestão de DNA com enzimas de restrição

Para dosagem, foram utilizados 2 µl da preparação do ácido nucleico em um aparelho “Nano-drop” (“NanoDrop 1000” - Technologies). A digestão do DNA com enzimas de restrição foi realizada conforme descrito pelos fabricantes. Para um volume final de 20 a 50 µl, 1-5 µg de DNA plasmidial ou amplificado por PCR foram adicionados a uma solução contendo tampão apropriado e, aproximadamente, 5-10 U da enzima de restrição. Esta solução foi incubada a 37°C por, pelo menos, 1 h. O DNA digerido foi analisado em eletroforese em gel de agarose.

12. Eletroforese de DNA em gel de agarose

O gel contendo agarose (Invitrogen) a 0,8% (p/v) ou 1% (p/v) foi preparado em tampão TAE 1X [Tris 40 mM; ácido acético glacial 20 mM (Merck); EDTA 1 mM (pH 7,8)]. Às preparações de DNA, foi adicionado $\frac{1}{5}$ do volume do tampão de amostra [sacarose 60% (p/v); EDTA 0,1 M (pH 7,8); azul de bromofenol 0,2% (p/v)] e elas foram submetidas à eletroforese em cuba horizontal (Life Technologies – Horizon 11-14) a 80 V, durante 1 h, em tampão TAE 1X. Após ou durante a corrida, o gel foi corado com uma solução de brometo de etídio na concentração final de 0,5 µg/ml. Posteriormente, o gel foi observado e fotografado através do emprego de um transiluminador de luz UV e um captador de imagens (“Viber Lourmat”). Em cada gel, foi colocado o padrão de tamanho molecular “1 kb-DNA ladder” (Invitrogen). A eletroforese em gel de agarose foi realizada de acordo com SAMBROOK E RUSSELL (2001).

13. Extração de RNA para análise por PCR em tempo Real

As estirpes bacterianas selvagens de *E. faecalis* OG1RF e do mutante Δ *ctsR* foram crescidas em 5 ml de caldo BHI a 37°C por 16 h. Da cultura, foram feitas diluições de 1:100 em caldo BHI fresco e, em seguida, cada cultura foi incubada a 37°C até atingir a fase exponencial de crescimento (DO 0,4). As células foram submetidas a diferentes condições de

estresse, como choque térmico a 48°C, tratamento com 10 µg/ml de vancomicina ou estresse oxidativo com 4 mM de peróxido de hidrogênio. O RNA total foi isolado pelo método de ácido-fenol quente, como descrito por ABRANCHES e colaboradores (2006). Para cada condição testada, o RNA total foi isolado em triplicata. Após serem submetidas a 15, 30 ou 60 min de estresse, 15 ml de cada cultura foram centrifugados a 3.000xg, por 10 min a 4°C. O sedimento foi mantido no gelo e tratado com 800 µl de “RNA Protect reagent” (Qiagen) e 400 µl de água livre de RNase. Cada solução foi incubada por 5 min em temperatura ambiente, sob agitação a cada minuto, e, em seguida, centrifugada a 3.000xg, por 10 min a 4°C. Em um microtubo de 2 ml, as células foram suspensas em uma solução de Tris/HCl 50 mM; EDTA 10 mM (pH 8,0) e misturadas com 1% (p/v) de SDS fenol clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1; Baker) e aproximadamente, 800mg de pérolas de vidro (Biospec -“0,1mm glass beads”). Os tubos contendo a mistura foram submetidos a um aparelho de “Bead Beat” por 45 s a 4°C, com intervalos de 2 min, no gelo. O processo foi repetido três vezes. Ao final da lise, as células foram centrifugadas a 3.000xg por 10 min a 4°C. A fase aquosa foi, então, transferida para um novo microtubo e adicionou-se igual volume de fenol clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) aquecido a 65°C. Os tubos foram invertidos várias vezes e incubados a 65°C por 10 min. Em seguida, os tubos foram resfriados no gelo por 10 min e, posteriormente, centrifugados a 10.000xg por 5 min. A fase aquosa foi mais uma vez transferida para um novo microtubo e igual volume de fenol clorofórmio-álcool isoamílico foi adicionado, seguido de resfriamento em gelo por 5 min e centrifugação a 10.000xg por 5 min. Em um novo microtubo, à fase aquosa foi adicionado igual volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1; Merck). Os tubos foram centrifugados a 10.000xg por 5 min a 4°C. A fase aquosa foi, então, transferida para um novo microtubo e o RNA precipitado com igual volume de isopropanol (Merck) gelado e 1/10 do volume de acetato de sódio livre de RNase (NaOAc 3 M, pH 5,0) durante 1 h a - 80°C, ou por 18 h a - 20°C. Decorrido este tempo e após centrifugação a 10.000xg durante 30 min a 4°C, o sedimento foi mantido no gelo, lavado três vezes com 700 µl de etanol gelado a 70% (v/v; Merck) e lavado uma vez em etanol gelado a 99% (v/v; Merck). O sobrenadante foi, então, desprezado e o sedimento, após secar à temperatura ambiente, foi dissolvido em 80 µl de água livre de RNase. O RNA obtido foi armazenado a - 20°C.

14. Síntese de cDNA

O cDNA foi sintetizado a partir do RNA total. Este RNA foi previamente tratado com DNase I (Ambion) e purificado usando-se o sistema comercial “Qiagen RNeasy kit” (Qiagen), conforme descrito pelo fabricante.

A síntese da primeira fita do cDNA foi realizada utilizando-se 1 µg de RNA total em 10 µl de água livre de RNase. Os reagentes utilizados para o preparo do cDNA foram: o tampão de síntese de primeira fita, dNTPs, oligonucleotídeos randômicos e a enzima “MultiScribe Reverse Transcriptase”, em um volume final de 10 µl. O RNA foi acrescido de igual volume da mistura dos reagentes para o preparo do cDNA e toda a reação, em um volume final de 20 µl, foi submetida às seguintes condições em um termociclador: 25°C por 10 min, a 37°C por 120 min e a 85°C por 5 s. O controle negativo da reação foi preparado utilizando-se a mistura de reação sem a adição da enzima “MultiScribe Reverse Transcriptase”. O cDNA foi dosado em triplicata e, a partir da dosagem, foi diluído dez vezes em água e mantido a - 20°C até o momento de uso. O protocolo de síntese de cDNA foi executado segundo instruções de “Applied Biosystems”.

15. PCR em Tempo Real (qRT-PCR)

A PCR em tempo real foi realizada em um termociclador – “StepOnePlus Real-time PCR System” (Applied Biosystems), utilizando-se “SYBR green supermix” (Bio-Rad). As reações de amplificação foram realizadas em placas de 96 poços, em um volume final de 20 µl, com 5 µl do cDNA previamente diluído dez vezes e 15 µl da mistura composta por “SYBR Green” e 150 nM de cada iniciador (direto e reverso), específico para cada gene *clp* estudado, conforme descrito na tabela 2.

Os oligonucleotídeos foram desenhados usando-se os programas “mfold DNA” (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/dna/>) e “Beacon Designer 2.0” (Premier Biosoft Internacional, Palo Alto, CA) para gerar produtos de PCR que apresentassem até 150 pb. O programa de amplificação foi composto por 40 ciclos de 95°C por 10 s e 60°C por 45 s, com um ciclo inicial a 95°C por 30 s. Durante cada ciclo, o acúmulo do produto de PCR foi detectado pelo monitoramento do aumento da fluorescência do corante “SYBR-green” ligado à dupla fita do DNA. Os dados obtidos na reação de PCR em tempo real foram coletados e analisados, usando-se o “software” e programas gráficos fornecidos pelo fabricante (Applied Biosystems) (AHN, LEMOS & BURNE, 2005, com modificações).

Tabela 2 - Oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR em tempo real.

Oligonucleotídeos	Sequência	<i>tm</i>
<i>clpB</i> – D	GAT GCT GGT TTA GAT GTT GAC G	54,0 °C
<i>clpB</i> – R	CGA AGT GAA TCA GCT TCT TGC	54,3 °C
<i>clpC</i> – D	TCA CAA TGG ACA GGC GTT C	55,4 °C
<i>clpC</i> – R	CGA CCC GTT GAT GTA AAA TGG	54,1 °C
<i>clpE</i> – D	GCG GAC AAT TTG AAG AAC GG	54,7 °C
<i>clpE</i> – R	CAT CAC CAG CAG CAC CAG	56,5 °C
<i>clpP</i> – D	TGA AGT GAT TGA ACG TGA TAC C	52,7 °C
<i>clpP</i> – R	AGG CGC TAC TAT TTT CCA TTA C	52,7 °C
<i>clpX</i> – D	AAT GTT GAA CGT GCG GAA AAG G	56,6 °C
<i>clpX</i> – R	CAC CCT CAC CTG AAA CAT CTC G	57,6 °C
<i>16SrDNA</i> - D	CGC TAG TAA TCG TGG ATC AGA ATG	55,2 °C
<i>16SrDNA</i> – R	TGT GAC GGG CGG TGT GTA	59,3 °C

onde D é direto e R é reverso.

Cada cDNA foi amplificado em triplicata e uma amostra correspondente sem transcriptase reversa foi incluída como controle negativo para cada amplificação. Além disso, a expressão do gene escolhido foi normalizada através da construção de uma curva-padrão própria para cada gene-alvo, segundo AHN, LEMOS e BURNE (2005), com modificações, e preparada a partir do número de cópias do gene.

A curva-padrão foi preparada utilizando-se oito diluições seriadas, preparadas com os produtos de PCR de cada gene, para se determinar a quantidade de cada cDNA. As concentrações dos produtos de PCR purificados foram estimadas e os números de cópias/ml para as curvas-padrão foram calculados de acordo com a seguinte equação:

$$\frac{6,023 \times 10^{23} \times \text{concentração do DNA na reação em g/ml}}{\text{tamanho do produto de PCR em pares de bases (pb)} \times 6,58 \times 10^2 \text{g}} = \text{número de cópias/ml}$$

16. Extração de RNA para análise por “northern blot”

O RNA total de células de *E. faecalis* OG1X em crescimento exponencial foi isolado usando-se o método de extração com guanidina-fenol-clorofórmio, descrito por CHOMCZYNSKI e SACCHI (1987).

Para se analisar o mRNA sintetizado sob choque térmico, as células foram mantidas a 37°C ou submetidas a diferentes temperaturas: 42°, 45°, 48° e 50°C, por 10 min. Em seguida, as células foram lisadas pela incubação com lisozima (20 mg/ml), por 2 h a 37°C. Após a lise celular, 600 µl da solução de isotiocianato de guanidina [Tris/HCl 50 mM (pH 7,5); isotiocianato de guanidina 4 M; EDTA 25 mM (pH 7,8)] com 120 µl de mercaptoetanol foram adicionados. A solução foi agitada até ficar clara e, em seguida, adicionaram-se 200 µl de etanol absoluto (Merck). A adição de etanol nesta etapa precipita diferencialmente o RNA, deixando o DNA em solução. Pequenos grumos de proteínas podem aparecer durante a adição do etanol. Logo, deve-se misturar por inversão até o desaparecimento dos mesmos. A solução foi centrifugada a 16.000 xg, por 5 min a 4°C, e o sobrenadante foi descartado. O RNA foi dissolvido em 50 µl da solução de hidrocloreto de guanidina [hidrocloreto de guanidina 6M (pH 7,5) e EDTA 25mM (pH 7,8)] com 0,2 µl de mercaptoetanol e, em seguida, 0,05 do volume (2,5 µl) de ácido acético 1 M e 0,5 do volume (25 µl) de etanol absoluto foram adicionados à mistura. A mistura foi invertida várias vezes e deixada a - 20°C por 10 min. Após este tempo, a solução foi centrifugada a 7.000 xg, por 10 min a 4°C e o sedimento dissolvido em 100 µl de água bidestilada tratada com DEPC. Quando necessário, a solução foi incubada a 65°C por 5 a 10 min para facilitar a dissolução do sedimento. O RNA foi precipitado com acetato de sódio 1 M, pH 7,8, (1/10 do volume) e etanol 70% (v/v; 2,5 vezes o volume) e imediatamente armazenado a - 20°C, por 16 h. A seguir, a solução contendo o RNA foi centrifugada a 16.000xg, por 20 min a 4°C, e todo o sobrenadante foi removido para a lavagem do sedimento com etanol 70% (v/v), sob as mesmas condições de centrifugação. Por fim, o RNA foi dissolvido em 50 µl de água e armazenado a - 70°C.

17. Preparo da amostra do RNA e eletroforese em gel de agarose em condições desnaturantes

Quantidades equivalentes a 5 µg de RNA desnaturado foram analisadas por “northern blot”, como descrito por SAMBROOK E RUSSELL (2001). Inicialmente, as amostras de RNA foram tratadas com MOPS 10X 12,8% (v/v; Merck), formaldeído 37% (v/v) 19,5% (v/v; Merck) e formamida 64,4% (v/v; Mallinckrodt). A solução foi aquecida a 55°C por 15 min e, em seguida, resfriada em gelo por 2 min. Às preparações do RNA, foi adicionado $\frac{1}{5}$ do volume do tampão de amostra [glicerol 50% (v/v) diluído em água tratada com DEPC, EDTA 10 mM (pH 7,8), azul de bromofenol 0,25% (p/v) e xileno cianol 0,25% (p/v)]. O gel desnaturante constituído de agarose 1,2% (p/v), MOPS 10X a 10% (v/v) e formaldeído 37% a 3% (v/v). As amostras do RNA foram submetidas à eletroforese em gel desnaturante de

agarose-formaldeído em cuba uma horizontal (Life Technologies – Horizon 11-14) a 60 V, durante 2 h, em tampão MOPS 1X (SAMBROOK & RUSSELL, 2001). Após a corrida, o gel foi corado com uma solução de brometo de etídio na concentração final de 0,5 µg/ml. Posteriormente, o gel foi observado e fotografado. Em cada gel foi colocado o marcador de tamanho molecular “0,24 – 9,5 kb RNA ladder” (Invitrogen). Para se confirmar a integridade e a concentração do RNA, uma réplica do gel foi corada com brometo de etídio e os dados fotodocumentados.

O RNA contido no gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose por capilaridade e a membrana foi hibridizada com sonda *clp* específica. O gel utilizado para a transferência do RNA para uma membrana de nitrocelulose foi colocado em uma cuba sobre um suporte de vidro com duas folhas de papel filtro, embebidas em água e solução de SSC 10X [NaCl (3 M); citrato de sódio (0,3 M)]. A membrana de nitrocelulose utilizada apresentava o mesmo tamanho do gel e foi previamente tratada com água e solução de SSC 10X. A nitrocelulose foi colocada sobre o gel de agarose e acima desta foram colocadas duas folhas de papel filtro embebidas em água bidestilada e solução de SSC 10X. A partir deste ponto, uma pilha de papel absorvente, com aproximadamente 11 cm de espessura, uma placa de vidro e um peso de aproximadamente 0,5 kg foram colocados sobre o papel filtro. O processo de transferência de RNA do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizado em uma cuba contendo SSC 10X, à temperatura ambiente por aproximadamente 20 h. Decorrido este tempo, o RNA foi fixado à membrana e, para tal, a mesma foi colocada entre duas folhas de papel de filtro e entre duas placas de vidro a 80°C, em forno a vácuo, durante 2 h. A membrana permaneceu envolta em papel de filtro e plástico, à temperatura ambiente, para posterior hibridização.

As sondas específicas para os genes *clpB*, *clpC*, *clpE*, *clpP* e *clpX* foram obtidas por PCR, segundo descrito no item 19, e marcadas randomicamente com [α -³²P]-dCTP. Para tal, a sonda foi fervida por 3 min e, imediatamente, resfriada em gelo por 2 min. A sonda foi marcada utilizando-se o sistema comercial de marcação “Ready to Go-DNA labelling Beads (-dCTP; Amersham Pharmacia Biotech)”, conforme descrito pelo fabricante, e a adição de 50 µCi de [α -³²P]-dCTP. Após misturar todo o material gentilmente, o tubo contendo a mistura foi incubado a 37°C por 1 h. Após este tempo, usou-se o sistema comercial de remoção de nucleotídeos (“QIAquick Nucleotide Removal Kit” – Qiagen), conforme descrito pelo fabricante, e, ao final do processo, a sonda foi fervida por 5 min para se obter a desnaturação da dupla cadeia de DNA e, em seguida, colocada no gelo por 2 min.

18. Hibridização

A membrana contendo o RNA fixado conforme descrito no item anterior foi fluçada uma vez em água e uma vez em SSC 1X até molhar completamente. A membrana foi envolta em saco plástico apropriado e as bordas foram seladas. Adicionou-se ao saco uma solução de pré-hibridização {DNA de esperma de salmão (5 mg/ml) degradado, SSC 6X, SDS 0,5% (p/v), solução de Denhardt 5X [Ficoll 400 1% (p/v); PVP 1% (p/v); BSA 1% (p/v)]} e EDTA 1 mM (pH 7,8)], e, em seguida, o saco com o filtro foi incubado a 45°C, por aproximadamente 16 h. Terminada a incubação, as sondas marcadas e específicas para os genes *clpB*, *clpC*, *clpE*, *clpP* e *clpX* foram individualmente adicionadas à mesma solução no saco de hibridização e incubadas a 58°C por 16 h. Após incubação, as laterais do saco foram abertas e a membrana foi retirada e lavada duas vezes, por 15 min, em solução de SSC 0,1X e SDS 0,1% (p/v) (aproximadamente, 250 ml para cada lavagem), sob agitação, à mesma temperatura usada para hibridização da membrana. Ao final das lavagens, a membrana foi secada em papel absorvente, colocada sobre um papel de filtro e exposta a um filme de raio-X, com intensificador, a - 70°C. A quantidade dos fragmentos transcritos presentes visualizada foi avaliada a partir de densitômetro (Storm 860).

19. Reação de polimerase em cadeia (PCR)

As reações de PCR, para a obtenção de sondas específicas utilizadas nos experimentos de “northern blot” foram realizadas utilizando-se um termociclador com controle de temperatura programável (PTC-100; MJ Research, Inc.).

A mistura de reação, com volume final de 50 µl, foi constituída por uma solução contendo os quatro desoxinucleotídios 5'-trifosfatados (2,5mM de cada dNTP) (Biotools), tampão 1X da enzima (KCl 50mM, Tris-HCl 20mM, pH 8,4; Biotools), MgCl₂ 2mM (Biotools), 100ng de DNA, 1,5 U de *Taq* DNA-polimerase (Biotools) e 0,4 pM/µL dos iniciadores apropriados, desenhados a partir dos genes *clpB*, *clpC*, *clpE*, *clpP* e *clpX*.

O protocolo para a amplificação das sondas consistiu em uma etapa inicial de aquecimento a 94°C por 5 min, para a desnaturação do DNA, seguido por 30 ciclos de 95°C por 1 min (desnaturação), 50°C por 1 min (anelamento) e 72°C, variando, conforme o tamanho do fragmento amplificado, de 1 a 4 min (extensão), e uma extensão final a 72°C durante 5 min.

Os produtos amplificados pela reação de PCR foram purificados, empregando-se o sistema comercial de purificação de DNA da QIAGEN (QIAquick – PCR Purification Kit).

Outras reações de PCR utilizadas neste trabalho foram realizadas, utilizando-se um termociclador com controle de temperatura programável (MyCycler – BioRad).

A mistura da reação, com volume final de 100 µl, era constituída de uma solução “Premix E 2X” (Epicentre – Biotechnology), 100 ng de DNA, 1,5 U de *Taq* DNA-polimerase (Biotools) e 0,4 pM/µl dos iniciadores apropriados, desenhados a partir da sequência dos genes (Tabela 3).

Tabela 3 - Oligonucleotídeos desenhados neste trabalho para a amplificação por PCR de fragmentos flanqueando o gene *clpB* ou *ctsR*.

Gene	Oligonucleotídeos	Tamanho esperado do fragmento amplificado	<i>T_m</i>
<i>clpB</i>	“ <i>clpB</i> up <i>E.faecalis</i> dir” - <i>EcoRI</i> 5' GGAGGAT GGAATT CTCGCTTTTCT 3'	0,86 kb	57,0°C
	“ <i>clpB</i> up <i>E.faecalis</i> rev” - <i>XmaI</i> 5' TGAGCTTCACCC GGGGC CTCTTGA 3'		66,3°C
<i>clpB</i>	“ <i>clpB</i> down <i>E.faecalis</i> dir” - <i>XmaI</i> 5' GAAGGGTGTGCC CGGGGA AGGAAC 3'	0,95 kb	64,4°C
	“ <i>clpB</i> down <i>E.faecalis</i> rev” - <i>SphI</i> 5' AACCTTG GGCATG CGACAGACAA 3'		63,4°C
<i>ctsR</i>	“ <i>ctsR</i> up <i>E.faecalis</i> dir” <i>BamHI</i> 5' CTTTGCAA AAGGATCC GCG 3'	0,7 kb	55,0°C
	“ <i>ctsR</i> up <i>E.faecalis</i> rev” - <i>EcoRI</i> 5' AGCCTCA AGAATTC CTGACGTATT 3'		56,1°C
<i>ctsR</i>	“ <i>ctsR</i> down <i>E.faecalis</i> dir” - <i>EcoRI</i> 5' GGAAGGCA AGAATTC GCTAGCTG 3'	0,7 kb	58,3°C
	“ <i>ctsR</i> down <i>E.faecalis</i> rev” - <i>BamHI</i> 5' CCAACTACT GGATCC AAAC 3'		50,4°C

Em negrito, estão indicados os sítios da restrição enzimática.

O protocolo para a amplificação de todos os fragmentos dos genes desejados consistiu em uma etapa inicial de aquecimento a 95°C por 10 min, para a desnaturação do DNA, seguida por cinco ciclos de 95°C por 30 s (desnaturação), 45°C por 30 s (anelamento) e 72°C por 1 min (extensão) e, em seguida, foram acrescentados 25 ciclos de 95°C por 30 s (desnaturação), 55°C por 1 min (anelamento) e 72°C por 1 min (extensão), e uma extensão final a 72°C durante 5 min.

Os produtos amplificados pela reação de PCR foram purificados, empregando-se o sistema comercial de purificação de DNA da QIAGEN (“QIAquick – PCR Purification Kit”). Os produtos obtidos por PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v).

20. Construção de mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$ em *E. faecalis* OG1RF

O sistema de substituição alélica sem a utilização de um marcador de seleção foi utilizado para a construção de mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$ em *E. faecalis* OG1RF (KRISTICH, CHANDLER & DUNNY, 2007).

20.1 - Desenho de oligonucleotídeos e construção de vetores recombinantes

Dois produtos de PCR de regiões que flanqueiam os genes *clpB* ou *ctsR* foram obtidos a partir dos oligonucleotídeos apresentados na tabela 3 e utilizando-se a reação de polimerase em cadeia, descrita no item 19.

Os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho foram desenhados a partir da sequência genômica a jusante e a montante dos genes *clpB* e *ctsR* de *E. faecalis* OG1RF e cada fragmento amplificado apresentava tamanho menor do que 1,0 kb. Cada iniciador foi acrescido de uma sequência de bases, contendo um sítio de enzima de restrição, para posterior clonagem dos fragmentos no vetor de clonagem.

Os fragmentos de DNA provenientes da reação de PCR foram digeridos com as enzimas de restrição apropriadas, apresentadas na tabela 3. Após purificação com o sistema comercial de purificação de DNA da Qiagen (“Qiagen PCR Purification Kit”), os dois produtos de PCR flanqueando o gene de interesse foram simultaneamente ligados ao vetor pGEM7 (3,0 kb; Promega) (Figura 5), que codifica a resistência à ampicilina. A ligação foi realizada na proporção vetor:inserto de 1:5 ou 1:10. Para a clonagem, utilizou-se como bactéria hospedeira *E. coli* DH10B. A ligação entre insertos e vetor ocorreu na presença de DNA-ligase do fago T4 (Invitrogen). Para isto, uma solução de 15 μ l finais, contendo os fragmentos do PCR purificados e digeridos, o vetor pGEM7 digerido com as mesmas enzimas de restrição dos fragmentos, o tampão apropriado e 1U da enzima, foi incubada a uma temperatura de 14°C, por 16 h.

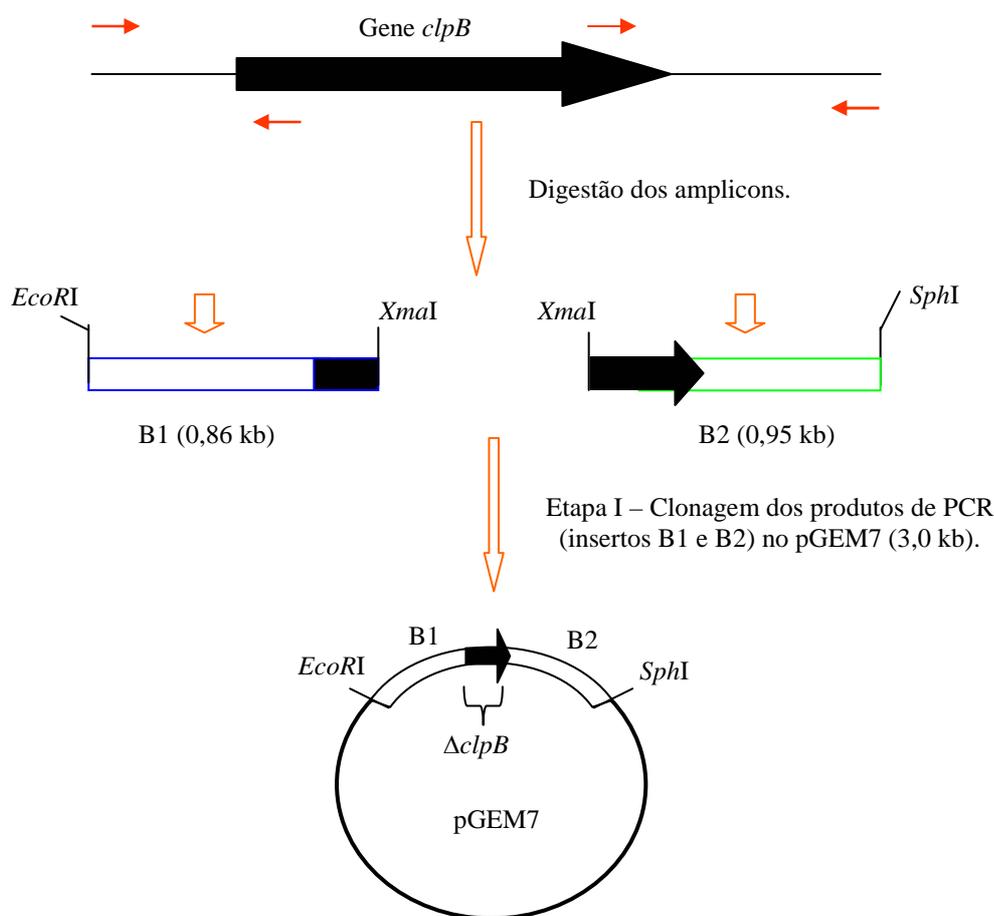


Figura 5 - Estratégia para construção dos plasmídeos usados neste trabalho. Primeira clonagem: dois produtos de PCR flanqueando o gene de interesse *clpB* ou *ctsR* (exemplificado pelo gene *clpB*) foram simultaneamente clonados dentro do vetor de clonagem pGEM7, originando os plasmídeos recombinantes pGEM*clpB* e pGEM*ctsR*, respectivamente. As setas vermelhas finas indicam o local de ligação dos iniciadores; as enzimas de restrição utilizadas encontram-se indicadas; B1 e B2 estão representando os fragmentos que flanqueiam o gene *clpB*.

20.2 - Transformação de *E. coli* e seleção de clones transformantes

Metade do volume da ligação gelada foi adicionada às células competentes (preparadas conforme descrito no item 8), de *E. coli* DH10B, que foram incubadas por 30 a 45 min no gelo. Decorrido este tempo, foi aplicado às células um choque térmico de 42°C por 2 min. Em seguida, foi adicionado 1 ml de meio LB pré-aquecido à suspensão, que foi incubada a 37°C, por 1 h, com agitação. Em seguida, a suspensão de células foi centrifugada a 12.500 xg, por 5 min, concentrada dez vezes e semeada em placas contendo meio LB adicionado de ampicilina e de X-Gal. As placas foram incubadas a 37°C, por 16 h.

As colônias brancas selecionadas foram purificadas em meio ágar-LB com ampicilina, posteriormente semeadas em 3 ml de LB, contendo o antibiótico de seleção, e incubadas a

37°C, por 12 h a 16 h. Após este tempo, o DNA das culturas foi extraído (conforme o item 10) e o mesmo foi clivado com as enzimas utilizadas na clonagem (Tabela 3), liberando o amplicon, contendo o fragmento a jusante e a montante do gene-alvo, do vetor pGEM7. O DNA digerido foi submetido à eletroforese em gel de agarose para se comprovar a clonagem do amplicon no plasmídeo. Aqueles transformantes nos quais a presença dos insertos foi comprovada foram armazenados a -20°C, até o momento de uso.

20.3 - Preparação do amplicon flanqueando o gene-alvo

A fim de obter-se o amplicon contendo uma sequência a jusante e a montante do gene-alvo, foi crescida a estirpe de *E. coli* contendo os plasmídeos recombinantes originados da primeira clonagem, pGEM*clpB* e pGEM*ctsR*. A cultura foi crescida a 37°C, por 16 h, e o DNA plasmideal, extraído a partir de um sistema comercial (conforme descrito no item 10). Após a extração, o DNA foi digerido com diferentes enzimas (*EcoRI* e *SphI*, no caso do gene *clpB*, ou somente *EcoRI*, para o *ctsR*), conforme descrito no item 11, e submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v). Após a coloração do gel e a visualização do fragmento correspondente ao amplicon (1,8 kb, para o gene *clpB*, e 1,4 kb, para o gene *ctsR*), o mesmo foi cortado do gel e a purificação do mesmo foi realizada, utilizando-se o sistema comercial “Qiagen gel extraction kit” (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante.

O fragmento contendo uma sequência a jusante e a montante do gene-alvo foi subclonado dentro de outro vetor de clonagem, pCJK47 (6,7 kb) (Figura 6), usando-se *E. coli* EC1000 como hospedeira. O vetor de clonagem pCJK47 é um plasmídeo mobilizável que codifica a resistência à eritromicina e que possui um cassete P-*pheS** e foi usado para a construção dos plasmídeos recombinantes pCJK47/*clpB* ou pCJK47/*ctsR*, utilizados para criar uma deleção “in frame” nos genes *clpB* ou *ctsR* na estirpe *E. faecalis* OG1RF. A ligação entre o amplicon e o vetor de clonagem foi realizada conforme descrito no item 20.1.

Para todos os clones, uma nova transformação em *E. coli* EC1000 foi realizada (como descrito no item 20.2), para a seleção de clones transformantes pCJK47/*clpB* ou pCJK47/*ctsR* (Figura 6).

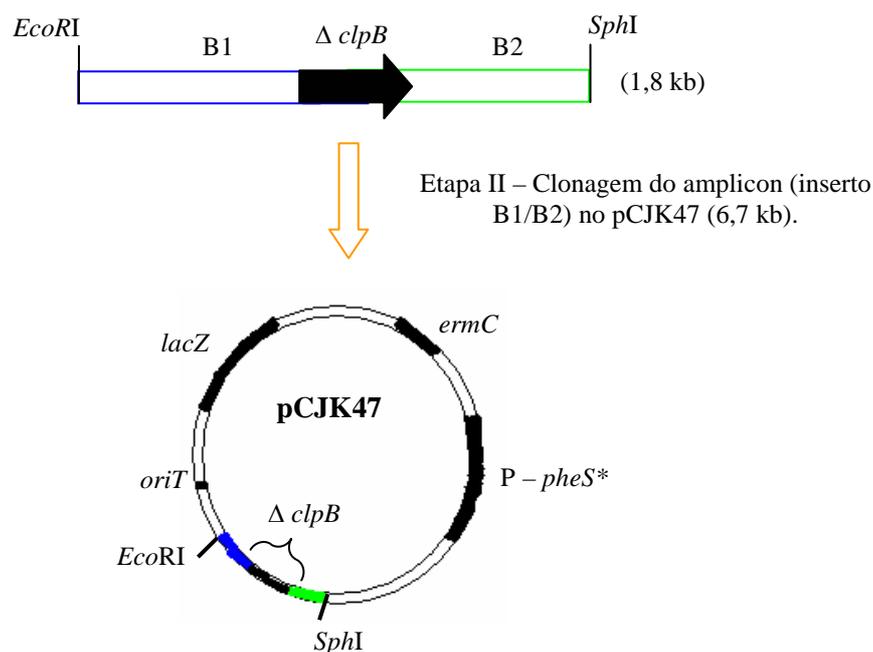


Figura 6 - Estratégia para construção dos plasmídeos usados neste trabalho. Segunda clonagem: amplicon contendo inserto correspondente a sequências a jusante e a montante do gene-alvo (exemplificado pelo *clpB*) foi sub-clonado dentro do vetor de clonagem pCJK47, originando os plasmídeos recombinantes pCJK47-*clpB* ou pCJK47-*ctsR*. *oriT*, origem de transferência; *lacZ*, gene que codifica a β-galactosidase; P- *pheS**, cassete de fenilalanina; *ermC*, gene que codifica resistência à eritromicina; *, representa uma mutação no gene.

A seleção das células transformadas foi realizada em ágar-LB contendo eritromicina e X-Gal. As placas foram incubadas a 37°C, por 24 h. As colônias Erm^r e $LacZ^+$ selecionadas foram inoculadas em 3 ml de caldo LB contendo eritromicina e incubadas a 37°C, por 16 h. Após este tempo, o DNA da cultura foi extraído (conforme item 10) e o mesmo foi submetido a diferentes clivagens com enzimas de restrição, *EcoRI* e *SphI*, liberando o amplicon do gene *clpB* e *BamHI* para liberar o amplicon do *ctsR* do vetor de clonagem.

Em seguida, o DNA dos clones transformantes pCJK47/*clpB* ou pCJK47/*ctsR* foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 0,8% (p/v) para se comprovar a segunda clonagem.

O DNA dos clones transformantes pCJK47/*clpB* ou pCJK47/*ctsR* foi introduzido diretamente, por eletroporação, na estirpe doadora *E. faecalis* CK111/pCF10-101 eletrocompetente (preparadas conforme descrito no item 9) e, subsequentemente, transferido por conjugação, para a estirpe receptora *E. faecalis* OG1RF (Figura 7).

20.4 - Eletroporação

Para o processo de eletroporação, foram usadas cubetas de 0,1 nm de espessura, estéreis e previamente resfriadas. Nestas cubetas, misturou-se o DNA a ser inserido e as células eletrocompetentes de *E. faecalis*. A mistura de DNA e células foi submetida a pulsos de 1,6 kV, 200 Ω e 25 mF em um eletroporador (“Gene Pulser” – BioRad). Imediatamente após o pulso, foram adicionados às células eletroporadas 200 μ l de meio de cultura STHB [meio de cultura THB (Difco) acrescido de sacarose 0,5 M]. As células foram incubadas por 2 h a 37°C e, em seguida, semeadas em meio de cultura seletivo contendo eritromicina, espectinomomicina e X-Gal (BAE, KOZLOWICZ & DUNNY, 2002), onde foram selecionadas células de *E. faecalis* CK111-pCF10-101 Sp^r Erm^r e LacZ⁺, carreando o plasmídeo pCKJ47/*clpB* ou *ctsR*. Para se comprovar a presença dos plasmídeos nas células, foram realizadas reações de PCR onde o DNA cromossômico obtido a partir da colônia purificada foi adicionado à mistura da reação da PCR, preparada conforme descrito no item 19. Os oligonucleotídeos utilizados nesta reação foram desenhados a partir da sequência do plasmídeo pCKJ47, (pCJK47D: 5' GCATGTTGATACGCTTG 3' e pCJK47R: 5' AACATGTATTCACGAACGAA 3'). O protocolo para a amplificação do fragmento de confirmação da presença dos plasmídeos pCKJ47/*clpB* ou *ctsR* nas células de *E. faecalis* CK111-pCF10-101 Sp^R consistiu em uma etapa inicial de aquecimento a 95°C por 5 min, para a desnaturação do DNA, seguida por 30 ciclos de 95°C por 30 s (desnaturação), 47°C por 30 s (anelamento) e 72°C por 2 min (extensão) e, em seguida, uma extensão final a 72°C durante 5 min.

20.5 - Conjugação

Para a conjugação, as estirpes doadoras CK111-pCF10-101-pCKJ47/*clpB* ou CK111-pCF10-101-pCKJ47/*ctsR* foram cultivadas em ágar-BHI suplementado com os antibióticos de seleção e a estirpe receptora *E. faecalis* OG1RF foi crescida em caldo BHI, durante aproximadamente 16 h, a 37°C. Ambas as estirpes (receptora e uma das doadoras) foram lavadas duas vezes em meio BHI e, em seguida, foram diluídas dez vezes no mesmo meio de cultura, na ausência de antibióticos, e incubadas a 37°C por 1 h. Decorrido este tempo, as culturas das estirpes doadora e a receptora foram misturadas em uma proporção de 1:9 e centrifugadas por 5 min, a 3.000 xg. O sedimento bacteriano foi suspenso em 0,1 ml de meio BHI. Em seguida, 50 μ l da suspensão foram aplicados sob uma membrana de filtro localizada no centro de uma placa contendo ágar-BHI.

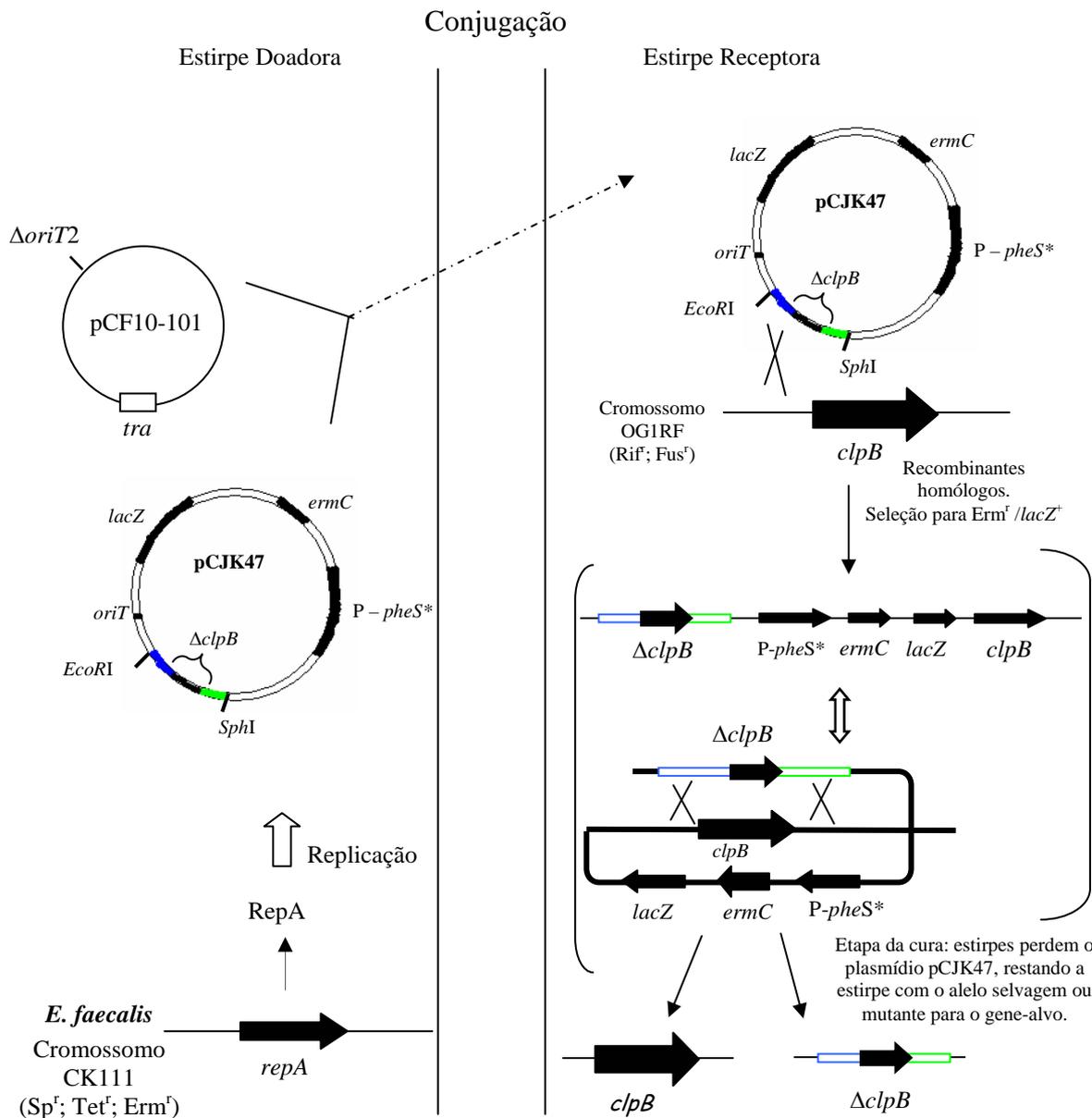


Figura 7 - Estratégia do sistema de substituição alélica, sem a utilização de um marcador de seleção, usada para a construção de mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$ em *E. faecalis* OG1RF. A estirpe doadora *E. faecalis* CK111 (lado esquerdo) contém o plasmídeo conjugativo pCF10 (pCF10-101) com ausência de *oriT*. A estirpe doadora suporta a replicação de plasmídeos mobilizáveis *repA*⁻ devido à expressão de uma cópia cromossômica do gene *repA*. Funções de transferência conjugativa fornecidas pelo plasmídeo pCF10-101 possibilitam a mobilização com alta frequência do plasmídeo pCJK47/*clpB* para a célula receptora *repA*⁻, OG1RF (direita). Após a conjugação, os recombinantes apresentam resistência à eritromicina e são sensíveis à presença de *p*-Cl-Phe devido à expressão constitutiva do gene *pheS**. No passo seguinte, as estirpes curadas, ou seja, livres do plasmídeo pCJK47/*clpB*, podem carrear um alelo tanto do gene *clpB* selvagem, como do mutante $\Delta clpB$. A mesma estratégia foi utilizada para a obtenção do mutante $\Delta ctsR$. Rif, rifampicina; Fus, ácido fusídico; Sp, spectinomicina; Erm, eritromicina; Tet, tetraciclina; ^r, resistência.

Após aproximadamente 5 h de incubação a 37°C, a membrana coberta pelas bactérias foi submetida a uma lavagem com 1 ml de PBS [NaCl 137 mM (Merck); KH₂PO₄ 20 mM (Reagen); Na₂HPO₄.12H₂O 80 mM (Reagen); KCl₂ 7 mM (Merck)]. Diluições seriadas e decimais foram realizadas em PBS e 0,1 ml de cada diluição foi semeado em ágar-BHI suplementado com rifampicina, ácido fusídico, eritromicina e X-Gal, para crescimento dos transconjugantes com o plasmídeo integrado pCJK47-*clpB* ou pCJK47-*ctsR*. Como controle, as diluições foram semeadas em ágar-BHI suplementado com espectinomicina, tetraciclina e eritromicina para selecionar a estirpe doadora CK111-pCF10-101-pCKJ47/gene-alvo. A confirmação da presença dos plasmídeos nas células de OG1RF foi realizada também através da utilização de PCR com DNA cromossômico obtido a partir da colônia purificada e iniciadores para a sequência do plasmídeo pCKJ47, conforme descrito acima no item 20.5.

20.6 - Cura

O cultivo de estirpes de *E. faecalis*, carreando o plasmídeo pCJK47 com uma mutação no gene *phe*, em meio de cultura MM9YG com a adição de *p*-Cl-Phe, resulta na inibição do crescimento desta estirpe, provavelmente como consequência da produção de proteínas não-funcionais, em que resíduos de fenilalanina foram substituídos por *p*-cloro-fenilalanina (*p*-Cl-Phe). Contudo, as células de *E. faecalis* que sofrem a perda do plasmídeo e, conseqüentemente, perdem o gene *pheS** mutado, crescem normalmente na presença de *p*-Cl-Phe 10 mM. Assim, o cassete P-*pheS** pode formar a base de uma estratégia contrasseletiva neste sistema.

Este sistema de contrasseleção foi utilizado para selecionar recombinantes livres do plasmídeo. Assim, após a conjugação, as colônias dos transconjugantes, células de *E. faecalis* OG1RF carreando o plasmídeo integrado pCJK47-*clpB* ou pCJK47-*ctsR* (“crossingover” simples) foram selecionadas e purificadas em meio de cultura contendo rifampicina, eritromicina, ácido fusídico e X-Gal. Em seguida, foi realizada a cura da estirpe transconjugante, para a obtenção de estirpes mutantes, a partir de “crossingover” duplo. A cura foi realizada após três sucessivas passagens em meio BHI e incubação a 37°C por 16 h. Após a última passagem, preparou-se diluições em glicina a 0,1% (p/v). As diluições foram semeadas em meio seletivo MM9YG contendo *p*-Cl-Phe. As colônias selecionadas foram capazes de crescer na presença de *p*-Cl-Phe indicando a cura do plasmídeo pCJK47/gene-alvo.

20.7- Seleção de estirpes mutantes no gene *clpB* ou *ctsR*

Recombinantes *lacZ*, livres do plasmídeo, podem carrear tanto o alelo *clpB* ou *ctsR* da linhagem selvagem ou o alelo mutante, conforme mostra a figura 7. Para se identificar os recombinantes com deleção no gene-alvo cromossômico, DNA das colônias do recombinante foram analisadas após a cura, através de PCR (ABRANCHES *et al.*, 2009). Devido à possibilidade de que o pCJK47 poderia integrar-se, por recombinação homóloga, no locus *pheS* do cromossomo destinatário (através do alelo do plasmídeo, P-*pheS**), foi realizada ainda uma reação da PCR, utilizando-se os iniciadores externos (*pheS* 5'D - GGATGGTAACACGATAGCTCGTTCC; *pheS* 3'R - TTCAGGTACAGCAACGCCCTCAAC) para o gene clonado *pheS*, a fim de se garantir a integridade do locus *pheS* no cromossomo.

A reação de PCR usada para se confirmar a deleção no gene-alvo foi realizada utilizando-se DNA cromossômico obtido a partir da colônia purificada dos transconjugantes. Para confirmação da inativação do gene *ctsR*, foram utilizados o par de oligonucleotídeos externos ao gene *ctsR*, os iniciadores “*ctsR*down*E.faecalis* rev” – *EcoRI* e o “*ctsR* up*E.faecalis* dir” *EcoRI*, descritos na tabela 3. Para análise do gene *clp*, foram utilizados novos oligonucleotídeos, um par de iniciadores que flanqueiam o gene *clpB* (*clpB*2up dir – GCGATTAACCAGTTTGGCG; *clpB*2down rev – CACAGACAGCCGCCAAC) e outro par de iniciadores desenhados a partir da sequência presente no interior do gene (*clpB*int5'dir-AGCACAACGAATGGTTCG; *clpB*int3'rev – CAGCATCGACGGCTTCG).

A mistura da reação da PCR foi preparada conforme descrito acima no item 19. O protocolo para a amplificação dos fragmentos de confirmação da deleção do gene *clpB* ou *ctsR* e a integridade do gene *pheS* consistiu em uma etapa inicial de aquecimento a 95°C por 10 min, para a desnaturação do DNA, seguida por 30 ciclos de 95°C por 40 s (desnaturação), 47°C por 40 s (anelamento) e 72°C por 3 min (extensão) e, em seguida, uma extensão final a 72°C durante 5 min.

As sequências de DNA das estirpes mutantes para os genes *clpB* ou *ctsR* foram sequenciadas (ambos os sentidos), utilizando-se os iniciadores que flanqueiam o gene *clpB* ou *ctsR*, através de sequenciador automático, na “University of Rochester” –NY, para se confirmar a deleção nos genes.

21 - Virulência de *E. faecalis* OG1RF e dos mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$

Para se testar a virulência dos mutantes e da estirpe selvagem em um modelo *in vivo*, larvas de *Galleria mellonella* foram selecionadas com 2 a 3 cm de comprimento e peso variando entre 200 e 300 mg. As larvas foram infectadas subcutaneamente com 5 μ l de uma

cultura da estirpe *E. faecalis* OG1RF ou da estirpe mutante $\Delta clpB$ ou $\Delta ctsR$, crescida a 37°C por 16 h e lavada em salina. Como controle não virulento, foram testadas larvas infectadas somente com salina ou com a estirpe OG1RF submetida ao calor de 75°C por 20 min. A mortalidade das larvas foi monitorada a 37°C a cada 1 h nas primeiras 24 h e, a partir daí, até completar cinco dias de infecção. O experimento foi realizado em triplicata e em cada um foram utilizadas 20 larvas para cada estirpe ou controle testados, totalizando uma amostragem de 60 larvas.

22 - Análises Estatísticas

Todos os resultados gerados nos experimentos realizados com os mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$ em *E. faecalis* OG1RF foram expressos através de gráficos ou tabelas e, quando necessário, as comparações de dados foram analisadas através de teste T de “student” não pareado utilizando-se como nível de significância $p \leq 0,05$.

Parte I – Análise da regulação da expressão dos genes *clp* em *E. faecalis*

1. Análises das regiões promotoras dos genes *clp* presentes em *E. faecalis* V583

Os genes *clp*, classificados como genes de choque térmico de classe III, são regulados negativamente pelo repressor CtsR. Para se investigar o mecanismo de regulação dos genes *clp* em *E. faecalis*, primeiramente, foi analisada a sequência da região promotora dos genes *clp* descritos em *E. faecalis* V583.

Através da análise *in silico*, os genes de choque térmico *clpB*, *clpC*, *clpE*, *clpP* e *clpX* presentes no genoma de *E. faecalis* V583, sequenciado pelo “Institute for Genomic Research” (www.tigr.org), foram analisados quanto à região promotora, ao sítio de ligação ao ribossomo e à região “CtsR-box”, que consiste de uma sequência repetida e direta de 7 pb (GGTCAAA-xAx-GGTCAAA) (DERRÉ, RAPOPORT & MSADEK, 1999). Potenciais sítios de ligação para o repressor CtsR na região promotora dos genes *clp* foram encontrados, com exceção apenas da região promotora do gene *clpX*.

A análise da sequência localizada logo acima do gene *clpB* revelou uma possível região promotora do tipo σ^A (TTGACC-N₁₉-TATAAT) localizada 119 pb a montante do códon de iniciação do gene *clpB*. O sítio de ligação ao ribossomo, GGAGG, foi encontrado a 8 pb a montante do códon de iniciação ATG (Figura 8-A). Em adição, uma sequência repetida e direta de 7 pb, (GGTCAAA-N₃-GGTCAAT), foi localizada 30 pb a montante da região -10, conforme mostrado na figura 8-A. Esta região é característica da sequência-consenso “CtsR-box”, à qual o repressor CtsR se liga no DNA, para regular a expressão do gene *clpB*. Interessantemente, um segundo códon de iniciação (GTG), precedido pelo sítio de ligação ao ribossomo, AGGAGG, foi encontrado 149 códon a jusante do códon de iniciação (ATG) do gene *clpB*.

(A) Região promotora do tipo σ^A do gene *clpB* de *E. faecalis*

```
ACAGTGATATTTAGTTGTTTTAGGTTTTTTTTATCAAAAAGGTCAAAAGGTCAATTTA 60
                                     —————→
TTCATTGACCTTTTACTGACCAATGAGGTATAATAAATCTATAAGGTTTACGAATACCTTA 120
      -35                               -10

ACTTTTGAAGAAATCCATCAAAAAGTCGGATAATAATAATTGTAAAGAATGTTAAAAATAAA 180
AAAGACAAAACAATAAACGGGAGGGATCGTTTATGAATATTGAAAAAATGACAACCACGC 240
      SD
TACAAGAGGCGATTGCTGAAGCTCAAAAAGTTGCGGTGACACGTCAACATCAAGAAATTG 300
ATATCGCACATTTATGGAAAATTTTTCTTCAACCAAACCATTTTGGACGTAATTTTTTACA 360
CAGATGCTGGTTTAGATGTTGACGCATTTGAACGAGAAGTAGATAACGCGTTAGATGAAT 420
ATCCAAGTGTGGCAGGCGGTAATGTGCAATATGGTCAAAAATTTAAGTCAAAATTTGTTCC 480
ATTTATTGCAAGAAGCTGATTCACCTTCGAGAAGAATCCAAGATGAATTTTTATCAACCG 540
AAATTGTACTTTTAGCTTTAATGAAATTGAAAAATTATCGTTTAAACAAAATATTTAATGC 600
ACAAGGCATTACGGAAAAAGAGTTAAGAAAAAATATTGAAGAGATGAGAGGAGGAGATC 660
                                     SD
GTGTGACTTCTCAAAACCAGGAAGAACAATATAAAGCACTAGAAAAATACGGTGTGACT 720
```

(B) Sequências -consenso de regiões promotoras do tipo σ^A

TTGAcA - 16 a 19pb - TAtAaT - 5 a 9pb

Figura 8 - Sequência de nucleotídeos da região promotora e da região 5' do gene *clpB* de *E. faecalis* (A). Sequências-consenso de regiões promotoras do tipo σ^A (B). A sequência reguladora, “CtsR-box”, está indicada em negrito e sublinhada; a seta indica a presença da sequência-consenso de heptanucleotídeos repetida e direta, identificada a montante das regiões - 35 e - 10, indicada em negrito. Encontram-se também em destaque o códon de iniciação (ATG) da tradução e o sítio de ligação ao ribossomo ou SD (Shine-Dalgarno). Um segundo códon de iniciação GTG (em negrito), precedido por uma sequência SD, foi identificado.

A análise da região promotora do gene *clpC* mostrou que o gene *clpC* parece fazer parte de um operon que apresenta a montante deste gene uma ORF (sequência de leitura aberta) que codifica o repressor CtsR. Como mostra a figura 9, os sítios de ligação ao ribossomo e o códon de iniciação dos genes *clpC* e *ctsR* foram identificados. A montante do gene *ctsR* foram encontradas possíveis regiões -35 e -10, enquanto que, a jusante da possível região -10, um sítio de ligação ao repressor foi identificado, a “CtsR-box” (GGTCAAT-N₃-AGTCAAG).

Região promotora do tipo σ^A do gene *clpC* de *E. faecalis*

```

GCTTTTGTGAGACATTAAGATAATCAGCTGAACAAAAGCAACTCCTTCGGAAATAAGCCG 60
AAATTCTCCAAAAATTAAAGAACAATTTTCGGAAATTTCTTCTTATTTCTTGGAGCTAAA 120
CACTTTTGTCTCAGCCTCTGTGATTCAATAACATATTTTCATTTTTAGGAGGGGAACTTA 180
AGTCAGTTTGACTGAGGTTGCTCCTCCTGTTTTGCATTTTTTTATTTAAAGTCAAAGCGTT 240
                                                    -35

CCTCTTTATTTAATAGGCAAAGTTCGATATAATAATGGTCAATATTAGTCAAGAGAGAAG 300
      -10
AAGGATGGAAGACTATGAGTAATCAAATACGTCAGATTTAATCGAGGCTTATTTAAAAA 360
SD      ↳ gene ctsR

AGATTTTAGAAGAAAGTAATAAAAATTGAAATCCGTCGGGCGGAAATGGCTAATTTATTTA 420
ATTGCGTTCCCTTCACAAATTAACATATGTAATTAATACACGTTTTACCATCCAACGAGGCT 480
ACGCAGTTGAAAGTAAACGTGGTGGAGGCGCTATATTCGCATTGTCAAAGTACAAATTT 540
CAGATAACGATCAATTACTAAAACAAATGGATCAATTGATTGGCGCAACCTTAACAGAAA 600
AAGATGCGCTAACATTTATTCAAACATTGTATGAAGAAGAAGTGATTACGAAAAAGGAAG 660
GCAATTTAATGCTAGCTGCTTTAAGTAAAAGCACATTGAATGGTCTGGGGAATCACGAAG 720
ATTTTCTAAGAGCTCAAATAATGCGTTTATTTTTAGAGCGCTTGAGCTATGAGGAGGAAT 780
                                                    SD
AACTATGGATGAACTATTTACAGAAAGTGCGAAAGCCGTAAGGCGATTGCCCAAGAAGA 840
      ↳ gene clpC

AGCGAAGTATTTTCGTCACCAATCCGTCGGTTCTGAACATTTATTATTAGCACTCGTTTT 900

```

Figura 9 - Sequência de nucleotídeos da região promotora e da região 5' do gene *clpC* de *E. faecalis*. A sequência reguladora, “CtsR-box”, está indicada em negrito e sublinhada; a seta indica a presença da sequência-consenso de heptanucleotídeos repetida e direta. Encontram-se também em destaque o códon de iniciação (ATG) e o sítio de ligação ao ribossomo ou SD (Shine-Dalgarno).

A análise da região promotora do gene *clpE* indicou um possível promotor do tipo σ^A (TTGATT-N₁₆-TATAAT), o provável sítio de ligação ao ribossomo, GAAAGGA, do gene *clpE*, localizado 13 pb a montante do códon de iniciação, ATG, e uma repetição direta característica da sequência “CtsR-box” (GGTCAAA-N₃-GGTCAAG), encontrada 9 pb a jusante da região -10 (Figura 10).

Região promotora do tipo σ^A do gene *clpE* de *E. faecalis*

```

TCACGAAATTGGAAAAATTCATTTTGTCTCCACGATTAATTCAGAGATTTCTCCAGCTTTT 60
AATGAAGCAATTTTTTCTACAAAAGGATTTTCAGCCATTGATTTACCACTCTTTCTCTT 120
AAATATCAACTCTTATAGTTTACTTGAAAATGGCGCAATTGTCTGTAAAAAAATCGAATC 180
TTTGCCTTTTTTTAAACAAAGTCTTTTACTTTGATTCTCTTACAAAAAATGCTTATAATAAC 240
                                     -35                               -10

CTCAAGGTCAAAAATGGTCAAGTGGTTTTATAGACAGAATTTATTCTTGCTATCTAGTA 300
      ────────────────────────────────────────────────────────────────────▶
CTTGGCTGGTTTGAGGAAAAATGGTCTGTTTATTAGAAAATAATAGAGCAAACAACACTATTT 360
TTCTGGCCTCAGTTATTTTTGAAAGGATGTGTTTCATTCAATGATTTGTCAAATTTGTCAA 420
                                     SD
CAAAATGAAGCAACAATTCATTTATATGCAAATGTGAATGGTCAAAGAAAACAACACTGGAC 480

```

Figura 10 - Sequência de nucleotídeos da região promotora e da região 5' do gene *clpE* de *E. faecalis*. A sequência reguladora, “CtsR-box”, está indicada em negrito e sublinhada; a seta indica a presença da sequência-consenso de heptanucleotídeos repetida e direta, a jusante das regiões -35 e -10, indicadas em negrito. Encontram-se também em destaque o códon de iniciação (ATG) e o sítio de ligação ao ribossomo ou SD (Shine-Dalgarno).

Com relação ao gene *clpP*, observou-se que o códon de iniciação, ATG, é precedido por um sítio de ligação ao ribossomo característico, AGGAGG. O possível promotor do tipo σ^A (TTGACC-N₁₇-TATACT) parece estar presente também neste gene, entretanto, localizado exatamente onde se inicia a sequência repetida de heptanucleotídeos característica da região “CtsR-box” (GTTGACC-N₃-ATTGACC) (Figura 11).

Região promotora do tipo σ^A do gene *clpP* de *E. faecalis*

```

TAATTTTCCATTTTAGTATAACATAATCCAAAAGTTTCGGATAAAAAATGACACAAAATT 60
TTTCAAGCGACTTCGTTGACCTTTATTGACCAAAGAGGTATACTTTTCATAGGCATTCAA 120
      -35                                     -10
      ────────────────────────────────────────────────────────────────────▶
AGTGCTTTGTGATAGAATGACTTTAAAAGTTTCTTTATATAGGAGGATTTACTTATGAAT 180
                                     SD
TTAATTTCCAACAGTTATTGAACAATCATCTCGCGGTGAACGTGCTTATGACATTTACTCT 240
CGTTTATTTAAAAGACCGCATCATTATGCTAAGCGGCCCTATCGATGATAACGTGGCAAAC 300
TCAGTGATTGCACAGTTATTATTCTTAGATGCCCAAGATTTCAGAAAAAGACATTTACTTG 360
TACATTAACCTCCTGGTGGCAGCGTTTCTGCAGGCTTAGCGATTTTCGATACCATGAAT 420
TTCGTTAAAGCGGATGTCCAAACGATCGTATTAGGAATGGCAGCTTCAATGGGTAGCTTC 480

```

Figura 11 - Sequência de nucleotídeos da região promotora e da região 5' do gene *clpP* de *E. faecalis*. A sequência reguladora, “CtsR-box”, está indicada em negrito e sublinhada; a seta indica a presença da sequência-consenso de heptanucleotídeos repetida e direta; as regiões -35 (realce em cinza) e -10 estão indicadas em negrito. Encontram-se também em destaque o códon de iniciação (ATG) e o sítio de ligação ao ribossomo ou SD (Shine-Dalgarno).

Como observado na figura 12, na sequência que antecede o gene *clpX*, foi identificado um possível promotor do tipo σ^A (TTCGCA-N₁₈-TATTAT), localizado 52 pb a montante do códon de iniciação (ATG) do gene *clpX*. Contudo, a mesma análise nos mostrou que nenhuma sequência repetida e direta de 7 pb, representando uma possível região “CtsR-box”, foi encontrada para este gene, indicando que provavelmente o gene *clpX* não é regulado pelo repressor CtsR.

Região promotora do tipo σ^A do gene *clpX* de *E. faecalis*

```

GACCTTGTGTCGTATCTAATGCAATTTTATAAATGCCTTGGCTGGCTCTTCGAGTATAGG 60
TACCTAGTAAAATTTGTTCTAACATCACAATTCCTCCAATTTGTTTCAACACAATCACTT 120
TTTATGAAAGTGCTTTTATATAATGTAGTATACCATAAGAAGTCTAAGAACAATAAAACT 180
TTCTATCTGAGATGTTCGCATTTTAAAGTGGTTTGTGCTTATTATGATGAGAGACTGTGAT 240
                -35                               -10

GACAGTCATTTTTTGATTTTTAGAGGGGTGACGAACATGTACGACAATACGGATAATAAC 300
                SD
GGGACCGTTCGTTGTTTCAATTTGTGGGAAAACACAAGAAGAAGTAAAAAAATTGTTGCT 360
GGTCCGGGTGTCTATATTTGTAATGAATGTATTGATCTATGTAAAGAGATTATTGATGAA 420
GAATTTTATGATGAAGCAGTCCGAGAATTAACGGATGTGCCAAAACCCCAAGAAATTTTA 480

```

Figura 12 - Sequência de nucleotídeos da região promotora e da região 5' do gene *clpX* de *E. faecalis*. Nenhuma sequência reguladora, “CtsR-box”, foi encontrada na região promotora deste gene; as regiões -35 e -10 estão indicadas em negrito. Encontram-se também em destaque o códon de iniciação (ATG) e o sítio de ligação ao ribossomo ou SD (Shine-Dalgarno).

2. Análise de transcrição dos genes *clp* através de “northern blot”

Para a análise dos transcritos dos genes *clpB*, *clpC*, *clpE*, *clpP* e *clpX*, o RNA total de células de *E. faecalis* OG1X mantidas a 37°C ou submetidas a choque térmico. A partir da análise do “northern blot”, utilizando-se uma sonda específica para cada gene *clp*, detectou-se a presença de cada transcrito do gene, aparentemente induzido pelo estresse térmico.

O mRNA do gene *clpB* é um transcrito monocistrônico com tamanho de aproximadamente 2,6 kb. Este tamanho é compatível com o do gene *clpB*, com 2.607 pb. Assim, como esperado, sob temperaturas elevadas de 48° e 50°C, aumentos maiores do que 10 e 35 vezes na quantidade do transcrito foram observados, respectivamente (Figura 13).

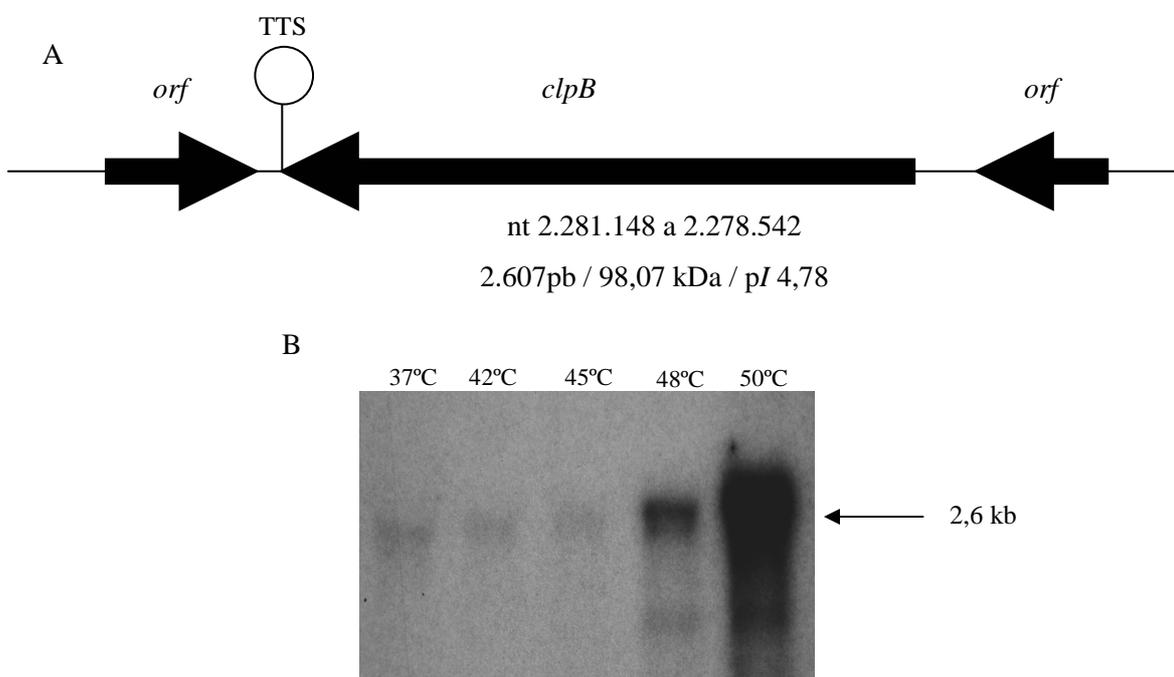


Figura 13 – Análise da região genômica e da expressão do gene *clpB*. (A) Representação esquemática da região genômica do gene *clpB* de *E. faecalis* V583. A seta indica a direção da transcrição. O diagrama está apresentado conforme anotado no genoma e mostra a localização e o tamanho do gene no genoma do micro-organismo (www.tigr.org), a massa molecular (kDa) da provável sequência de aminoácidos e o ponto isoelétrico (pI). (B) Análise por hibridização, através de “northern blot”, da indução de *clpB* sob condições de estresse térmico, em *E. faecalis*. A cultura foi mantida a 37°C (controle) ou a 42°, 45°, 48° e 50°C, por 10 min. Os sinais observados na autorradiografia representam a hibridização com uma sonda específica para *clpB*. TTS, sítio de terminação da transcrição.

As análises por “northern blot” com sonda específica para *clpC* revelaram diferentes transcritos com aproximadamente 9,0, 2,8 e 1,4 kb (Figura 14). O transcrito com tamanho de 2,8 kb provavelmente representa os genes *ctsR-clpC*, sugerindo uma organização na forma de operon.

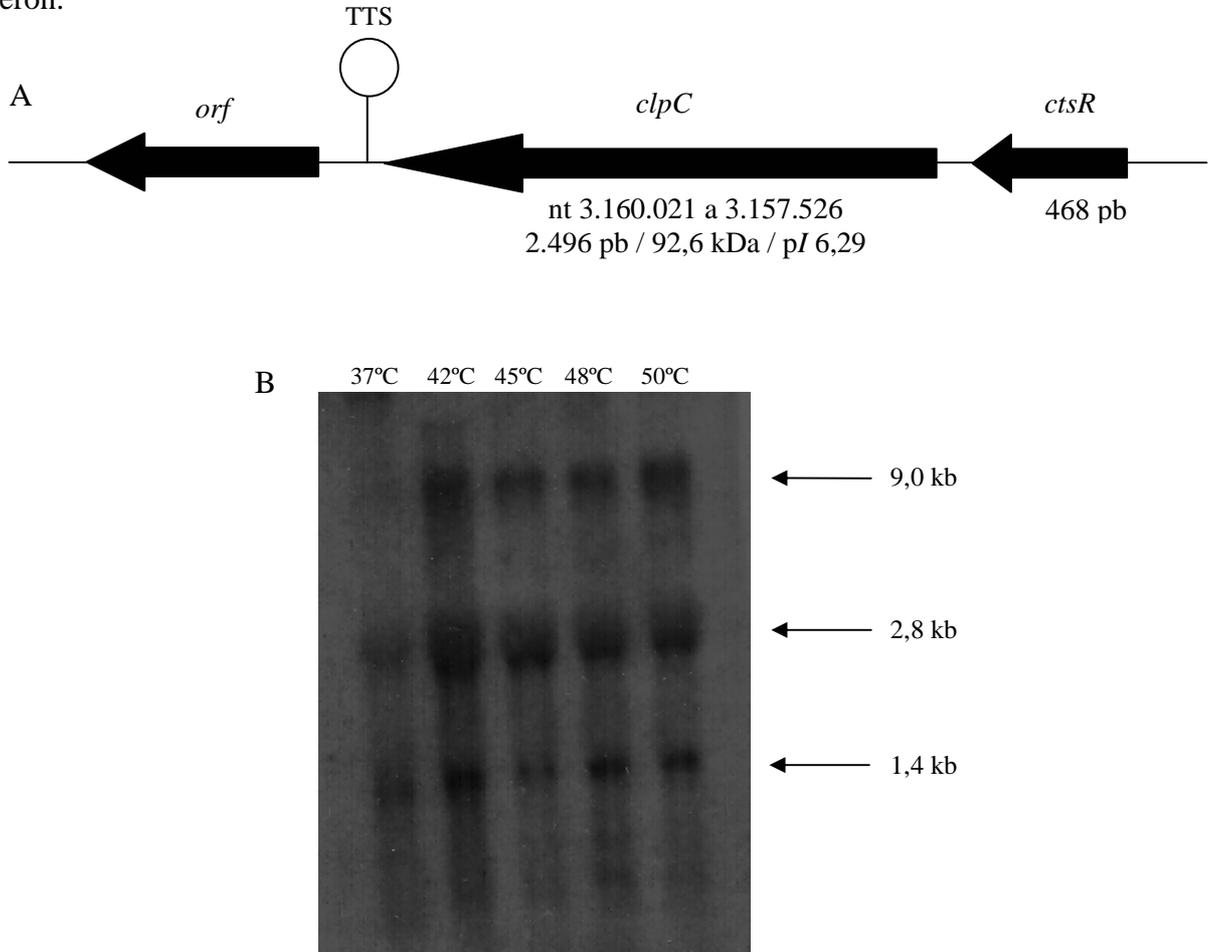


Figura 14 - Análise da região genômica e da expressão do gene *clpC*. (A) Representação esquemática da região genômica do gene *clpC* de *E. faecalis* V583. A seta indica a direção da transcrição. O diagrama está apresentado conforme anotado no genoma e mostra a localização e o tamanho do gene no genoma do micro-organismo (www.tigr.org), a massa molecular (kDa) da provável sequência de aminoácidos e o ponto isoelétrico (pI). (B) Análise por hibridização, através de “northern blot”, da indução de *clpC* sob condições de estresse térmico, em *E. faecalis*. A cultura foi mantida a 37°C (controle) ou a 42°, 45°, 48° e 50°C, por 10 min. Os sinais observados na autorradiografia representam a hibridização com uma sonda específica para *clpC*. TTS, sítio de terminação da transcrição.

Os transcritos dos genes *clpE* e *clpX* apresentaram tamanho um pouco acima do esperado, 3,0 kb e 1,7 kb, respectivamente, indicando que ambos poderiam estar organizados sob a forma de operon, como mostram as figuras 15 e 16. A análise do transcrito de *clpE* revelou que este gene poderia ser cotranscrito com as *orfs* que flanqueiam o gene *clpE*. Sob temperaturas elevadas de 45°, 48° e 50°C, observou-se um aumento maior do que dez vezes na quantidade do transcrito do gene *clpE* (Figura 15). Já o transcrito do gene *clpX* não parece apresentar diferenças de expressão sob diferentes temperaturas; entretanto, as análises sugerem que o gene *clpX* poderia ser cotranscrito com o gene *gtp*, que codifica a proteína ligante ao GTP (Figura 16).

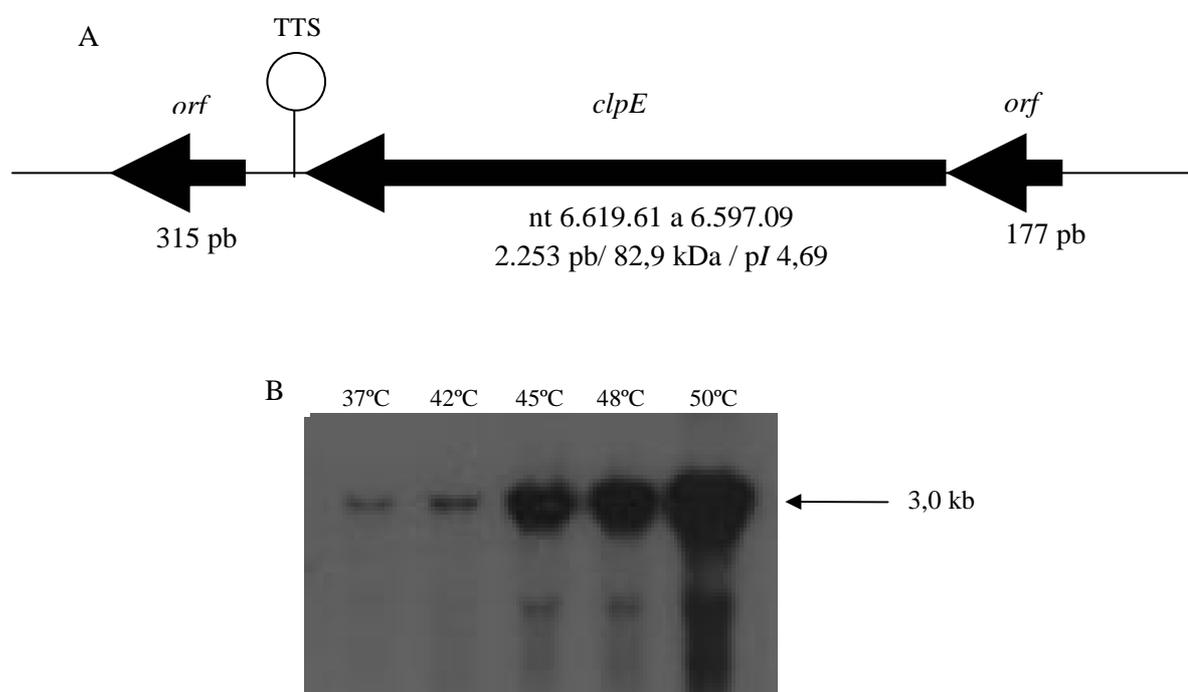


Figura 15 - Análise da região genômica e da expressão do gene *clpE*. (A) Representação esquemática da região genômica do gene *clpE* de *E. faecalis* V583. A seta indica a direção da transcrição. O diagrama está apresentado conforme anotado no genoma e mostra a localização e o tamanho do gene no genoma do micro-organismo (www.tigr.org), a massa molecular (kDa) da provável sequência de aminoácidos e o ponto isoelétrico (pI). (B) Análise por hibridização, através de “northern blot”, da indução de *clpE* sob condições de estresse térmico, em *E. faecalis*. A cultura foi mantida a 37°C (controle) ou a 42°, 45°, 48° e 50°C, por 10 min. Os sinais observados na autorradiografia representam a hibridização com uma sonda específica para *clpE*. TTS, sítio de terminação da transcrição.

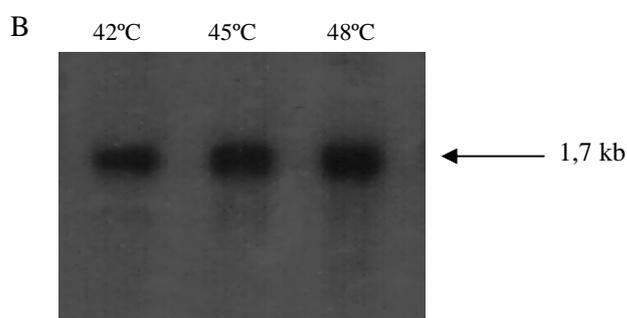
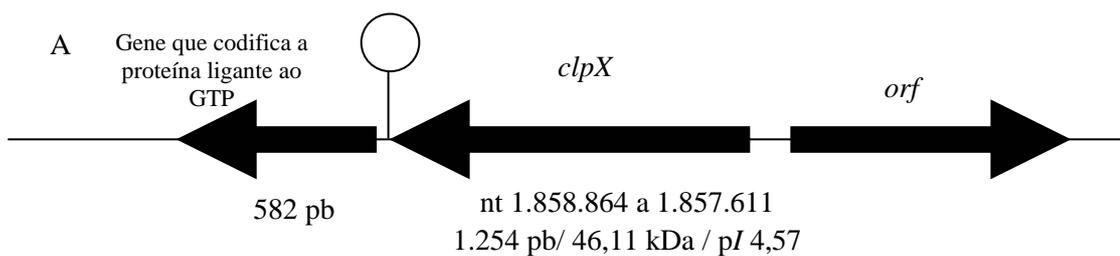


Figura 16 - Análise da região genômica e da expressão do gene *clpX*. (A) Representação esquemática da região genômica do gene *clpX* de *E. faecalis* V583. A seta indica a direção da transcrição. O diagrama está apresentado conforme anotado no genoma e mostra a localização e o tamanho do gene no genoma do micro-organismo (www.tigr.org), a massa molecular (kDa) da provável sequência de aminoácidos e o ponto isoelétrico (pI). (B) Análise por hibridização, através de “northern blot”, da indução de *clpX* sob condições de estresse térmico, em *E. faecalis*. A cultura foi submetida a temperaturas de 42°, 45° e 48°C, por 10 min. Os sinais observados na autorradiografia representam a hibridização com uma sonda específica para *clpX*. TTS, sítio de terminação da transcrição.

O mRNA do gene *clpP* também apresentou-se como um transcrito monocistrônico, com tamanho de aproximadamente 0,6 kb, compatível com o tamanho do gene de 594 pb, e teve a sua expressão aumentada em aproximadamente dez vezes à temperatura de 48°C e 50°C (Figura 17).

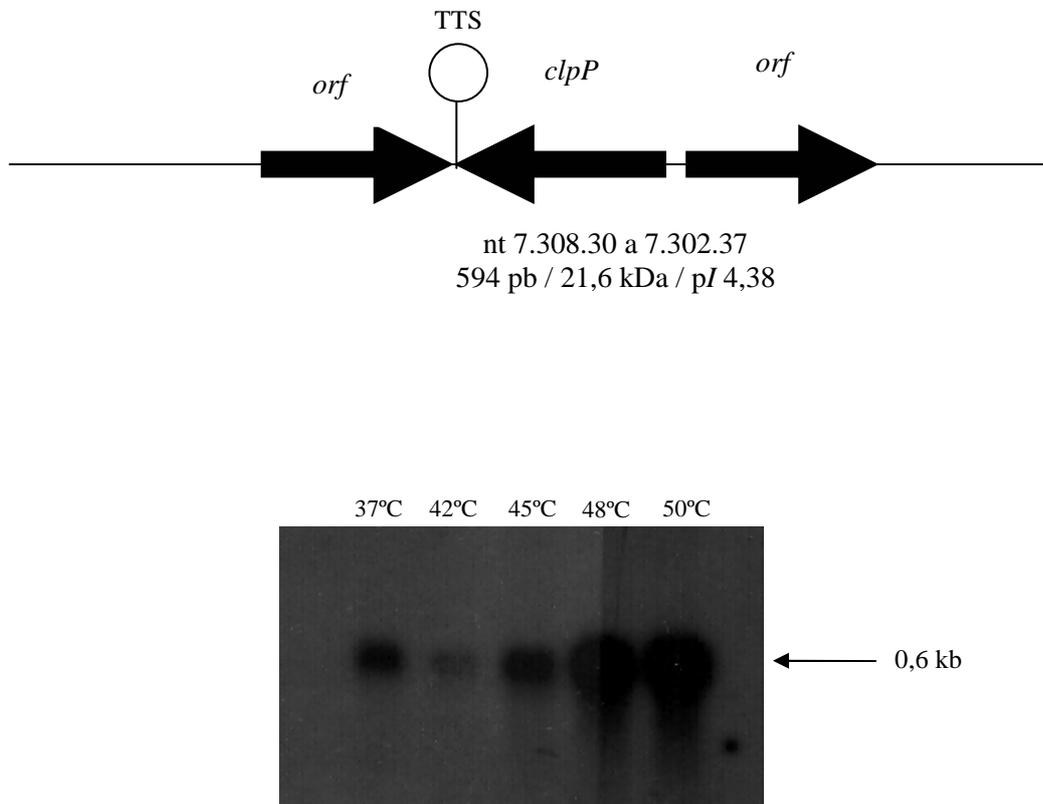


Figura 17- Análise da região genômica e da expressão do gene *clpP*. (A) Representação esquemática da região genômica do gene *clpP* de *E. faecalis* V583. A seta indica a direção da transcrição. O diagrama está apresentado conforme anotado no genoma e mostra a localização e o tamanho do gene no genoma do micro-organismo (www.tigr.org), a massa molecular (kDa) da provável sequência de aminoácidos e o ponto isoelétrico (pI). (B) Análise por hibridização, através de “northern blot”, da indução de *clpP* sob condições de estresse térmico, em *E. faecalis*. A cultura foi mantida a 37°C (controle) ou a 42°, 45°, 48° e 50°C, por 10 min. Os sinais observados na autorradiografia representam a hibridização com uma sonda específica para *clpP*. TTS, sítio de terminação da transcrição.

3. Análise dos mRNAs dos genes *clp* através de “real-time PCR” sob diferentes condições de estresse

3.1 – Choque térmico:

Com o objetivo de se avaliar a expressão dos genes *clp* da estirpe selvagem *E. faecalis* OG1RF submetida ao choque térmico, experimentos de PCR em tempo real foram realizados. Assim como observado nos experimentos de *northern blot*, os resultados do qRT-PCR (Figura 18) mostraram que os mRNAs dos genes *clpB*, *clpC*, *clpE* e *clpP* apresentaram um aumento significativo ($p \leq 0,05$) na expressão quando as células estavam sob a temperatura de 48°C por 15 e 30 min. Estes perfis de expressão gênica sugerem que *E. faecalis*, mediante um estresse térmico, ajusta os níveis de transcrição dos genes *clp*, permitindo que a bactéria sobreviva sob estresse. O transcrito do gene *clpX* também foi analisado (Figura 18-E), entretanto, ao contrário do observado para os outros genes *clp* de *E. faecalis*, nenhuma alteração significativa ($p \leq 0,05$) foi observada na expressão do gene *clpX*, mesmo após 30 min de exposição ao estresse térmico. Como controle interno, o transcrito do gene 16S rDNA foi analisado e os resultados mostraram que, sob o choque térmico a 48°C, nenhuma alteração significativa foi observada na expressão deste gene.

3.2 -Estresse Oxidativo:

Durante a avaliação da expressão dos genes *clp* da estirpe selvagem *E. faecalis* OG1RF sob estresse com peróxido de hidrogênio, através da técnica de PCR em tempo real, verificou-se que as alterações nos níveis de expressão dos genes *clp* foram opostas àquelas encontradas sob estresse térmico. A expressão dos genes *clpB*, *clpC*, *clpE*, *clpP* e *clpX* (Figura 19, A-E) foi reprimida quando as células foram submetidas ao tratamento com estresse oxidativo. Estes resultados mostraram que, provavelmente, os genes *clpC*, *clpE* e *clpP* poderiam apresentar um papel na resposta ao estresse oxidativo. Entretanto, embora uma repressão para os genes *clpB* e *clpX* tenha sido observada, a mesma parece não ser estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$), o que nos levaria a supor que estes genes não estariam relacionados com a resposta a este tipo de estresse. Como controle interno, análises do transcrito do gene 16S rDNA mostraram que, sob estresse oxidativo, nenhuma alteração significativa ($p \leq 0,05$) foi observada na expressão do pré-rRNA (Figura 19-F).

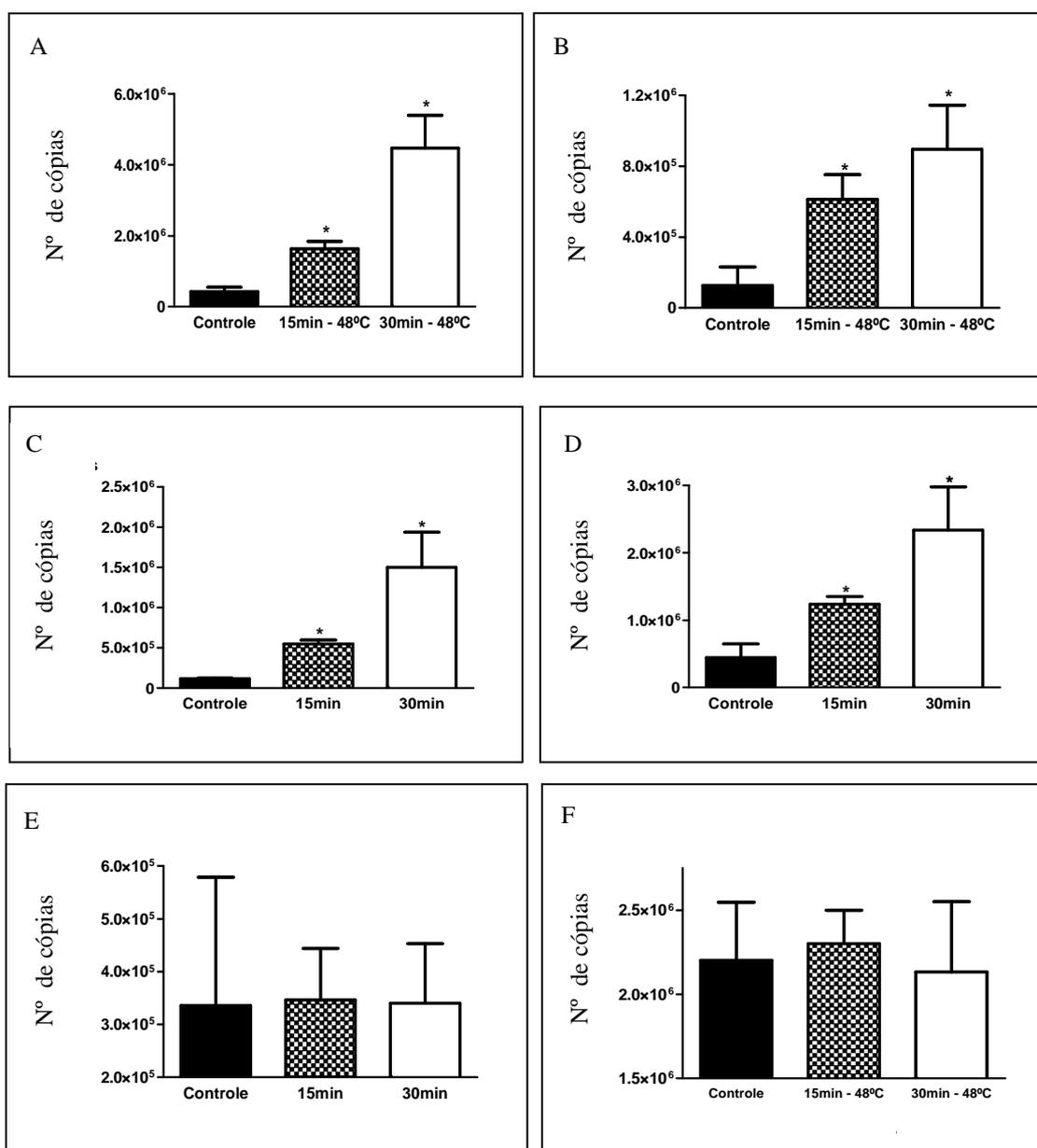


Figura 18 – Análise da expressão dos RNAs dos genes *clpB* (A), *clpC* (B), *clpE* (C), *clpP* (D), *clpX* (E) e 16S rDNA (F) por qRT-PCR. As células selvagens de *E. faecalis* OG1RF foram submetidas ao choque térmico a 48°C por 15 (barra xadrez) e 30 min (barra branca). Como controle, foram usadas células a 37°C (barra preta). O 16S rDNA foi usado como controle interno da reação. *, representa $p \leq 0,05$ (teste T de “student”) em relação ao controle a 37°C.

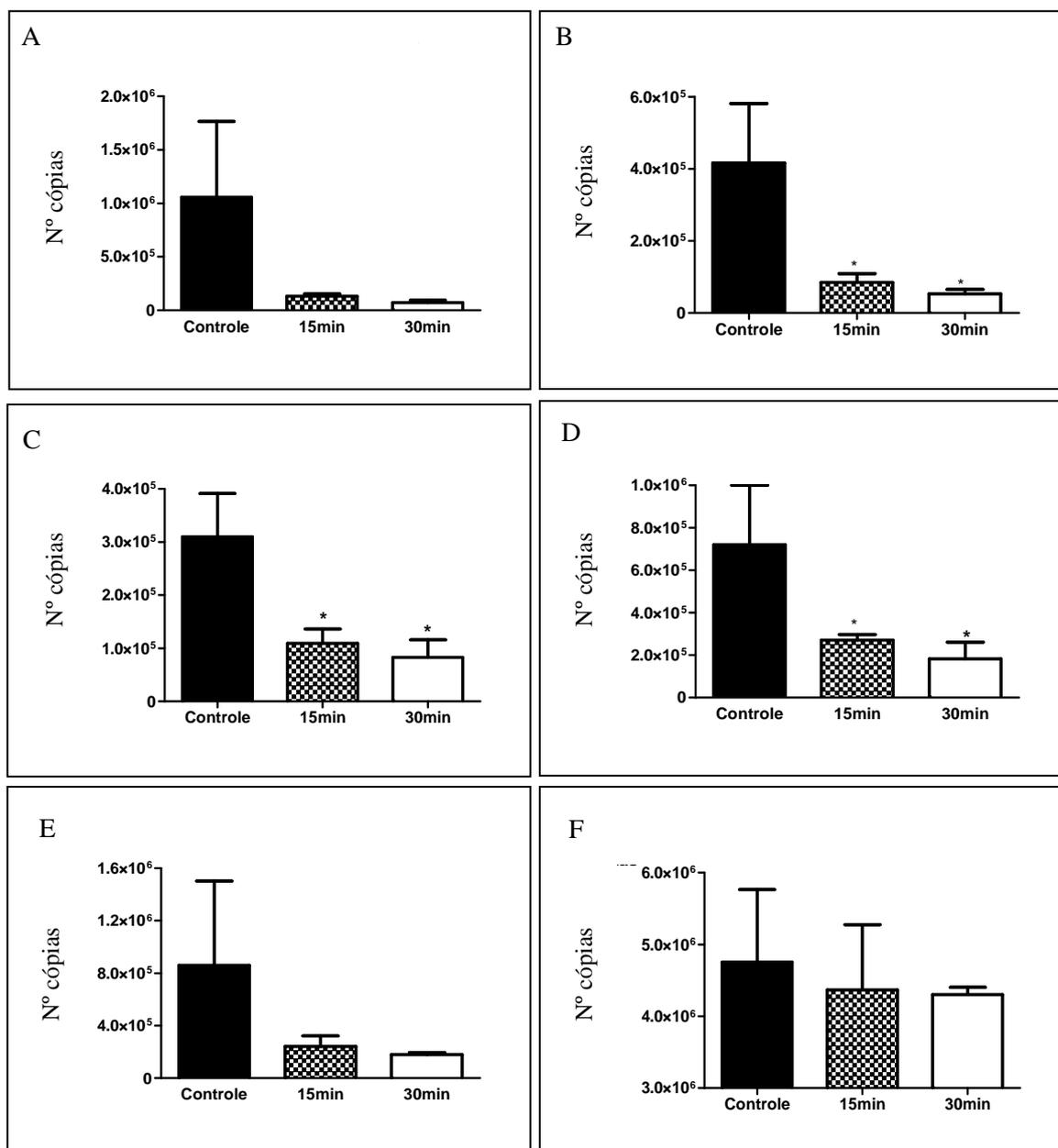


Figura 19 – Análise da expressão dos RNAs dos genes *clpB* (A), *clpC* (B), *clpE* (C), *clpP* (D), *clpX* (E) e 16S rDNA (F) por qRT-PCR. As células selvagens de *E. faecalis* OG1RF foram submetidas a estresse oxidativo com H₂O₂ (4 mM) por 15 (barra xadrez) e 30 min (barra branca). Como controle, foram usadas células a 37°C (barra preta). O 16S rDNA foi usado como controle interno da reação. *, representa $p \leq 0,05$ (teste T de “student”) em relação ao controle a 37°C.

Parte II – Obtenção e análise das estirpes mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$ de *E. faecalis* OG1RF

Com o objetivo de se verificar se os genes *clpB*, *clpC*, *clpE*, *clpP* e *clpX* fazem ou não parte do regulon CtsR, um mutante de *E. faecalis* para o gene *ctsR* foi construído. Além dele, um mutante de *E. faecalis* para o gene *clpB* foi também construído com o intuito de caracterizar a proteína ClpB.

2. Obtenção de mutantes

Os experimentos para a obtenção de mutantes *clpB* e *ctsR* em *E. faecalis* OG1RF foram executados conforme descrito em materiais e métodos, no item 20. A inativação dos genes resultou em mutantes $\Delta clpB$ ou $\Delta ctsR$ em *E. faecalis* OG1RF. Para se confirmar a obtenção dos mutantes $\Delta clpB$ ou $\Delta ctsR$ de *E. faecalis* OG1RF, o DNA cromossômico obtido a partir da colônia purificada de cada estirpe transconjugante foi analisado pela reação de PCR e por sequenciamento, confirmando assim a deleção no gene-alvo.

A análise da PCR mostrou que com a inativação do gene-alvo, o DNA dos mutantes ($\Delta clpB$ ou $\Delta ctsR$) gerou fragmentos amplificados com menor tamanho do que os gerados a partir do DNA da estirpe selvagem (wt), mostrando a deleção no gene, ou, especificamente no caso de *clpB*, a PCR também pôde significar a ausência de amplificação na estirpe mutante.

Uma vez que o par de oligonucleotídeos originais não funcionou para confirmação da deleção no gene *clpB*, novos pares de iniciadores foram desenhados, conforme descrito em materiais e métodos. A análise com os oligonucleotídeos desenhados para a região interna do gene *clpB* indicou ausência de amplicon, quando da análise do DNA dos transconjugantes (Figura 20 B, coluna 2), contudo, como esperado um fragmento de 1,0 kb foi detectado no produto da PCR da estirpe selvagem (Figura 20 B, coluna 1). Além disso, a utilização de um novo par de oligonucleotídeos flanqueando o gene *clpB* detectou um fragmento de DNA com tamanho de cerca de 3,0 kb na estirpe selvagem (Figura 20 B, coluna 3), enquanto os mutantes *clpB* apresentaram um fragmento menor, com apenas 1,0 kb (Figura 20 B, coluna 4), demonstrando a deleção no gene.

A análise dos produtos amplificados pela PCR, utilizando-se os iniciadores externos ao gene *ctsR*, mostrou que, como esperado, a estirpe selvagem apresentou um fragmento amplificado de 1,8 kb (Figura 20 C, coluna 1), enquanto a deleção no gene *ctsR* gerou um fragmento de 1,4 kb, (com 0,4 kb a menos, correspondentes à deleção de uma parte central da sequência do gene *ctsR*), conforme mostrado na figura 20 C, coluna 2.

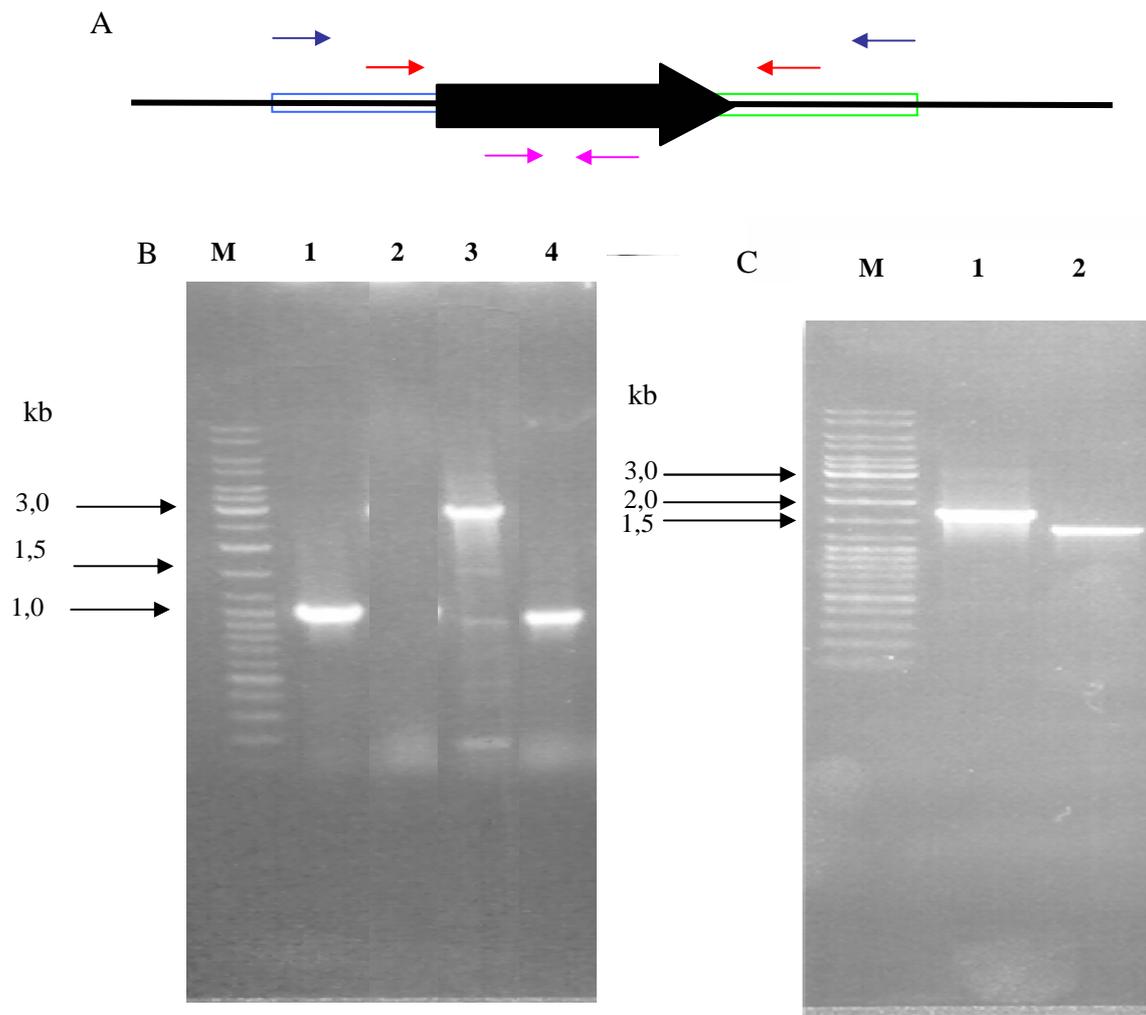


Figura 20 - Análise dos mutantes $\Delta ctsR$ e $\Delta clpB$ em *E. faecalis* OG1RF. (A) Posição dos oligonucleotídeos desenhados para confirmação da deleção nos genes *clpB* (iniciadores indicados pelas setas vermelha e lilás) ou *ctsR* (iniciadores indicados pelas setas azuis). (B) Amplificação por PCR do fragmento interno do gene *clpB* na estirpe selvagem (coluna 1) e no mutante $\Delta clpB$ (coluna 2), utilizando-se os iniciadores representados pelas setas lilás; amplificação por PCR do fragmento flanqueando o gene *clpB* na estirpe selvagem (coluna 3) e no mutante $\Delta clpB$ (coluna 4), usando-se os iniciadores representados pelas setas vermelhas. (C) Amplificação por PCR do fragmento flanqueando o gene *ctsR* na estirpe selvagem (coluna 1) e no mutante $\Delta ctsR$ (coluna 2), usando-se os iniciadores representados pelas setas azuis; Padrão de tamanho molecular de DNA (1 kb-“DNA ladder”) (coluna M).

2. Estudo da regulação da expressão dos genes *clp* em *E. faecalis* OG1RF, através de qRT-PCR.

A análise da expressão dos genes *clp* em células selvagens de *E. faecalis* mostrou que os genes *clpB*, *clpC*, *clpE* (Figura 21- A, B e C) e *clpP* (Figura 22-A) foram induzidos durante choque térmico a 48°C, durante 30 min, enquanto nenhum aumento de indução foi observado para o gene *clpX* (Figura 22-B). Quando foi analisada a expressão dos genes *clp*, através de PCR em tempo real, no mutante Δ *ctsR*, os resultados revelaram que, já a 37°C, a expressão dos genes *clpB*, *clpC*, *clpE* e *clpP* uma maior expressão na ausência do repressor CtsR. Da mesma maneira, pôde-se observar que a expressão dos genes *clpB*, *clpC*, *clpE* (Figura 21- A, B e C) e *clpP* (Figura 22-A) sofreu uma indução, quando comparamos as quantidades do mRNA de células-controle a 37°C com àquelas de células submetidas ao choque térmico a 48°C.

Em relação à expressão do gene *clpX* (Figura 22-B), os resultados da qRT-PCR em células Δ *ctsR* mostraram que não houve aumento na expressão do mRNA a 37°C como observado para os outros genes *clp* de *E. faecalis*. Embora não tenha sido observada indução da expressão do gene *clpX* em células selvagens de *E. faecalis* OG1RF, em células mutantes Δ *ctsR*, verificou-se um aumento significativo na indução do mRNA de *clpX* sob o choque térmico a 48°C.

As análises destes resultados e as análises *in silico* da região promotora dos genes *clp* sugerem que todos os genes *clp*, com exceção do gene *clpX*, fazem parte do regulon *ctsR* e, assim, são regulados negativamente pelo repressor CtsR, visto que um aumento na expressão destes genes foi observado em células mutantes Δ *ctsR* a 37°C. A indução dos transcritos de *clpB*, *clpC*, *clpE*, *clpP* e *clpX*, sob o choque térmico de 48 °C em mutantes Δ *ctsR*, sugerem ainda que possivelmente estes genes estejam sob a regulação de um segundo sistema regulador, visto que a expressão destes genes aumentou significativamente sob o choque térmico a 48°C, quando comparado com a expressão a 37°C.

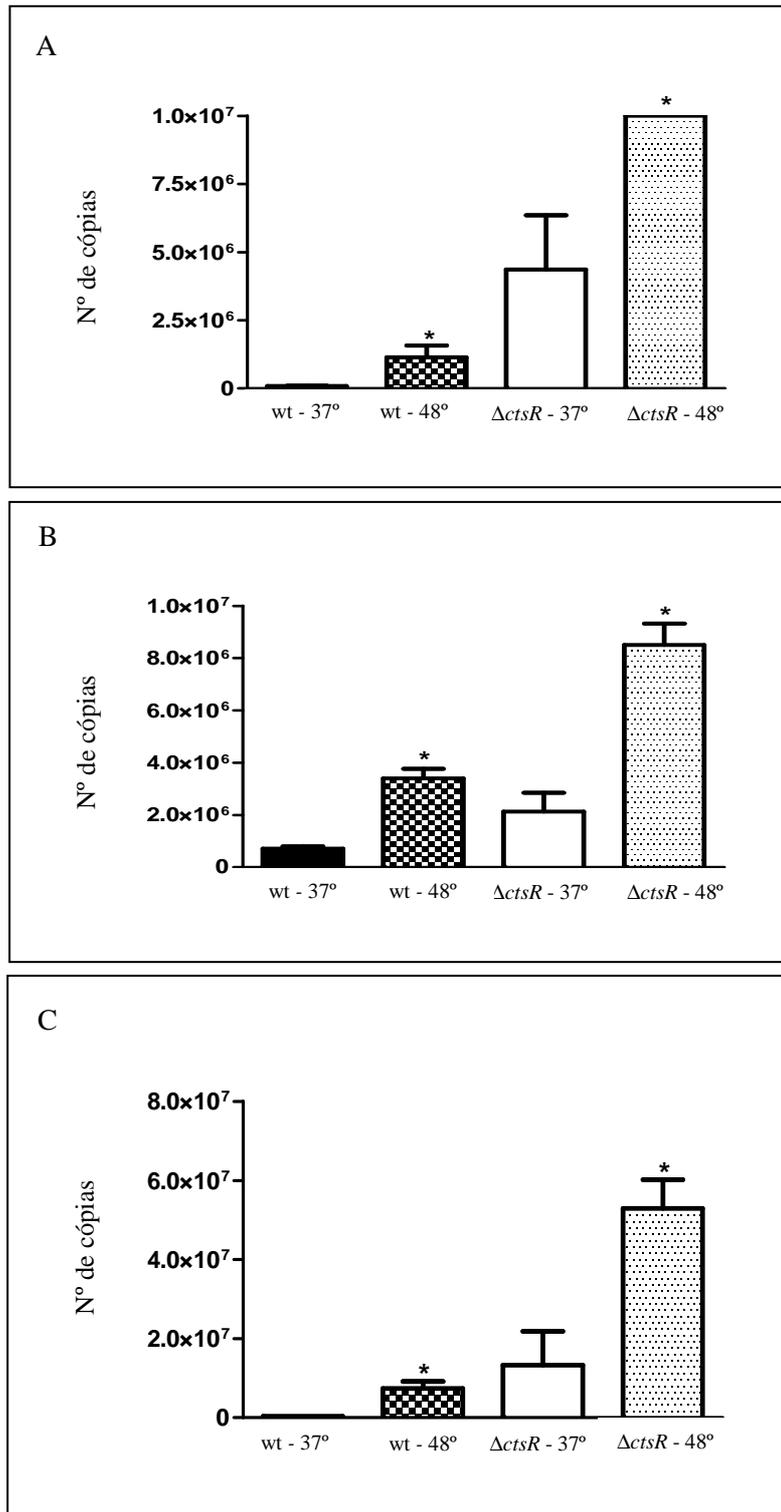


Figura 21 - Análise da expressão dos mRNAs dos genes *clp* por qRT-PCR. Análise da expressão dos mRNAs dos genes *clpB* (A), *clpC* (B) e *clpE* (C), em células selvagens (wt) de *E. faecalis* OG1RF (duas primeiras barras – preta e xadrez) ou no mutante Δ *ctsR* (duas últimas barras – branca e pontilhada) submetidos ao choque térmico de 48°C por 30 min (barras xadrez e pontilhada). Como controle, foram usadas células a 37°C (barras preta e branca). * $p \leq 0,05$ (Teste T “student”) em relação ao controle a 37°C.

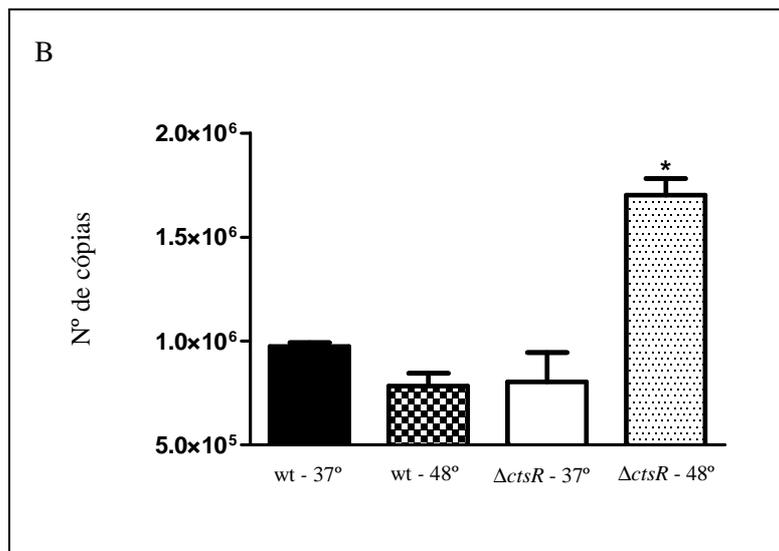
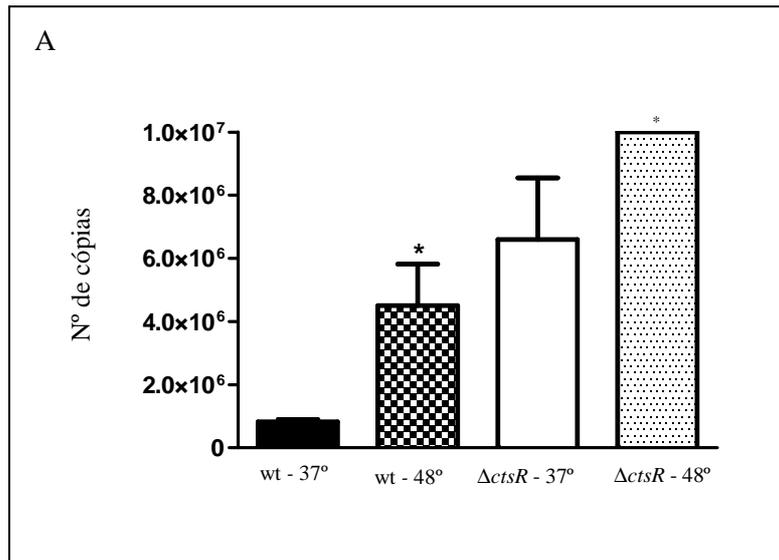


Figura 22 - Análise da expressão dos mRNAs dos genes *clp* por qRT-PCR. Análise da expressão dos mRNAs dos genes *clpP* (A) e *clpX* (B), em células selvagens de *E. faecalis* OG1RF (duas primeiras barras – preta e xadrez) ou no mutante Δ *ctsR* (duas últimas barras – branca e pontilhada) submetidos ao choque térmico de 48°C por 30 min (barras xadrez e pontilhada). Como controle, foram usadas células a 37°C (barras preta e branca). * $p \leq 0,05$ (Teste T “student”) em relação ao controle a 37°C.

3. Cinética de crescimento e tempo de geração de estirpes selvagens e mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$ de *E. faecalis*

Para se realizar um estudo sobre o papel da proteína de choque térmico ClpB em *E. faecalis* OG1RF e do regulador de choque térmico CtsR, as estirpes mutantes para os genes *clpB* e *ctsR* foram caracterizadas.

Os *Enterococcus* spp. são conhecidos por sua capacidade de sobreviver em ambientes hostis. Assim, células de *E. faecalis* OG1RF e os mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$ foram analisados quanto à capacidade de crescimento em diferentes condições de estresse. O crescimento da estirpe selvagem ou dos mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$ foi monitorado através da leitura da densidade óptica. A análise do crescimento de mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$ em BHI a 37°C, após 12 h de crescimento, indicou que estas estirpes mutantes crescem de forma semelhante à estirpe selvagem, conforme mostrado na figura 23.

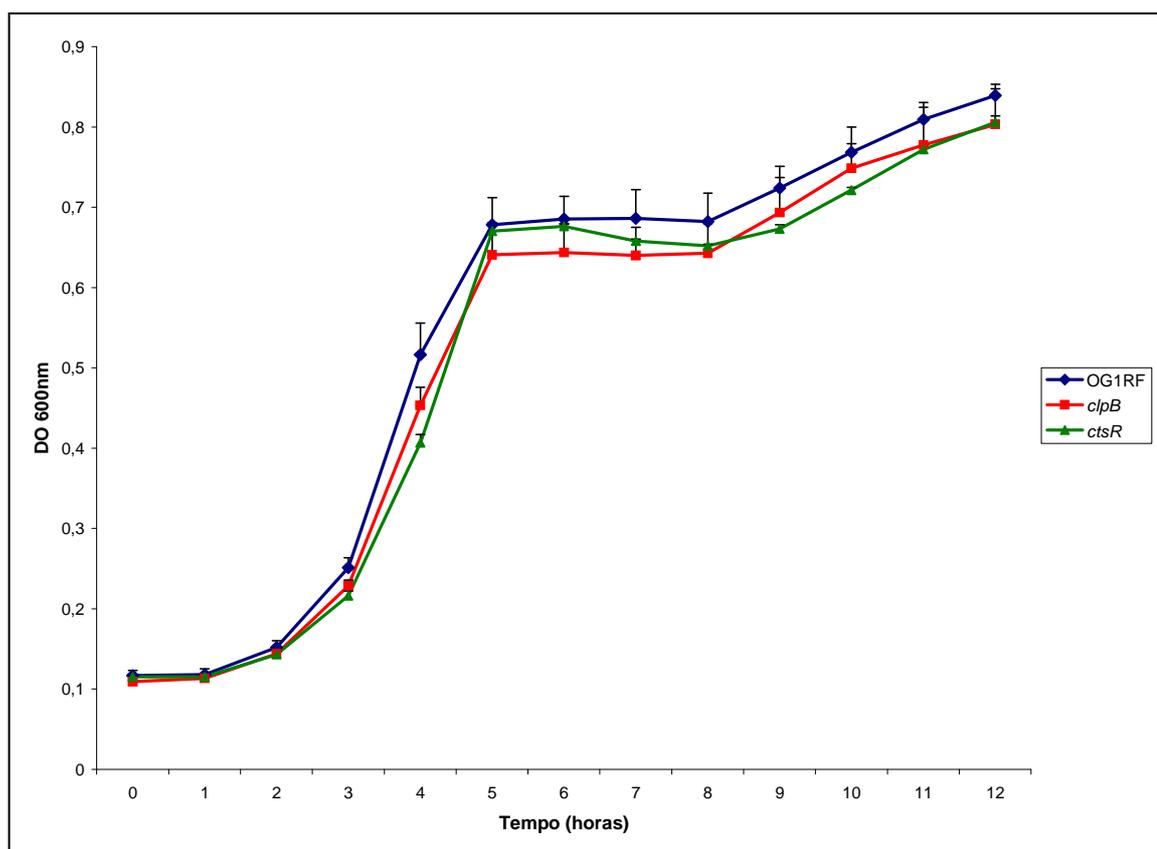


Figura 23 - Cinética de crescimento de células selvagens e mutantes ($\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$) de *E. faecalis* OG1RF. O crescimento da estirpe selvagem OG1RF (azul) e dos mutantes $\Delta clpB$ (vermelho) e $\Delta ctsR$ (verde) foi determinado por 12 h, a 37°C em meio de cultura BHI, usando-se o monitor de

leitura de crescimento “Bioscreen C”. O resultado apresentado representa a média de três experimentos independentes.

A habilidade das estirpes mutantes e da selvagem crescerem sob diferentes condições de estresse foi examinada e nenhuma diferença significativa foi observada entre as diferentes estirpes durante o crescimento na presença de NaCl 5% (p/v) (Figura 24) ou nas demais condições testadas, como: pH 5, pH 9, presença de SDS 0,003% (p/v), presença de ácidos biliares ou sob estresse oxidativo (H_2O_2 1 ou 2 mM). Estes resultados mostraram que a ausência dos genes *clpB* e *ctsR* não alterou no crescimento de *E. faecalis* OG1RF sob condições de estresse (dados não mostrados).

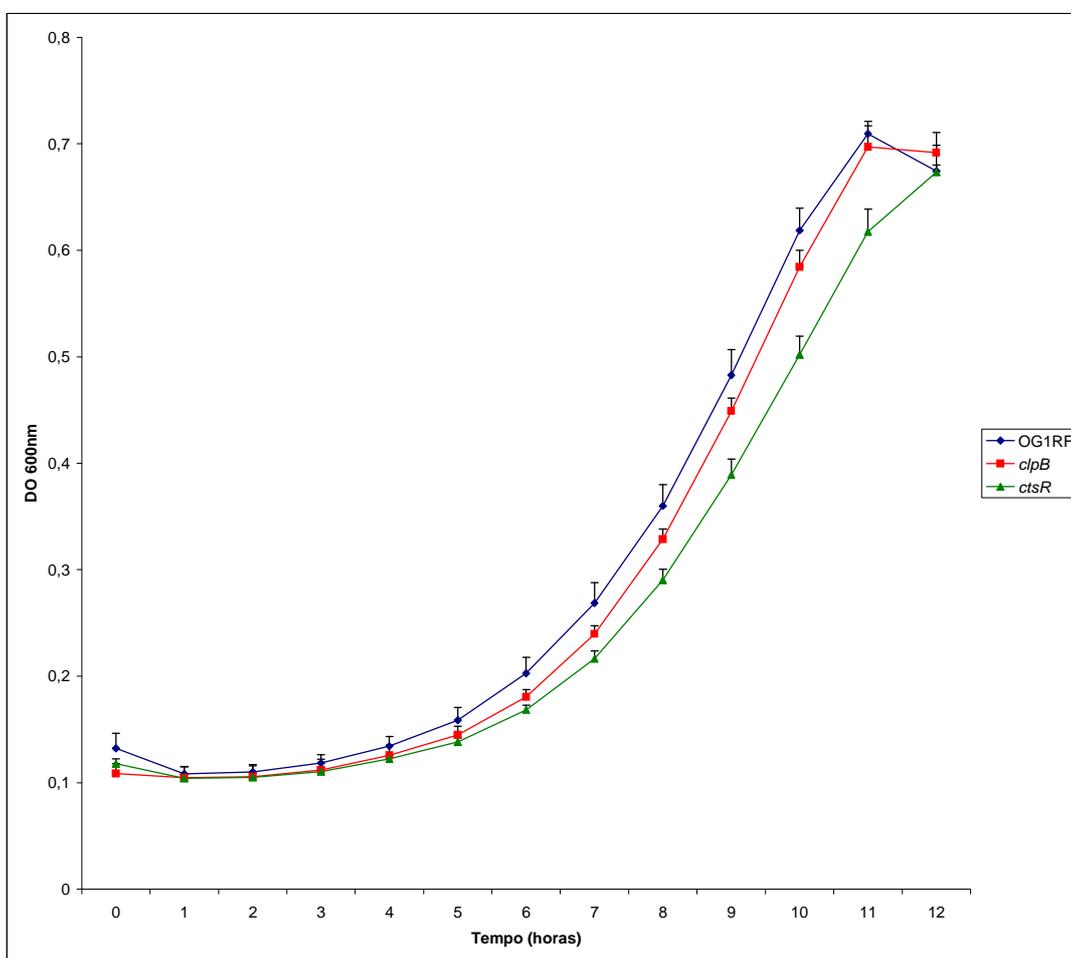


Figura 24 - Cinética de crescimento de células selvagens e mutantes ($\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$) de *E. faecalis* OG1RF. O crescimento da estirpe selvagem OG1RF (azul) e dos mutantes $\Delta clpB$ (vermelho) e $\Delta ctsR$ (verde) foi determinado por 12 h, a 37°C em meio de cultura BHI adicionado de NaCl 5% (p/v), usando-se o monitor de leitura de crescimento “Bioscreen C”. O resultado apresentado representa a média de três experimentos independentes.

A partir dos resultados obtidos nas cinéticas de crescimento em diferentes condições de estresse e utilizando-se o programa “Microsoft Excel”, o tempo de geração da célula selvagem e dos mutantes de $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$ foi calculado sob as mesmas condições de estresse testadas para a análise da cinética de crescimento. Em comparação com a estirpe selvagem, o mutante $\Delta ctsR$ apresentou uma diferença significativa no tempo de geração da célula, sob todas as condições testadas, com exceção do tratamento com detergente (SDS) e sais biliares (Figura 25). Sob estas condições de crescimento (pH 5,0, pH 9,0, presença de NaCl ou H₂O₂), a inativação do gene *ctsR* em *E. faecalis* resultou em um crescimento mais lento, quando comparado com o da estirpe selvagem. Entretanto, o mutante $\Delta clpB$, diferentemente do mutante para o gene *ctsR*, apresentou diferença significativa de tempo de geração apenas durante o crescimento em pH 9, quando comparado com a estirpe selvagem, mostrando que, provavelmente, a proteína ClpB não está envolvida na resposta a estresses em geral.

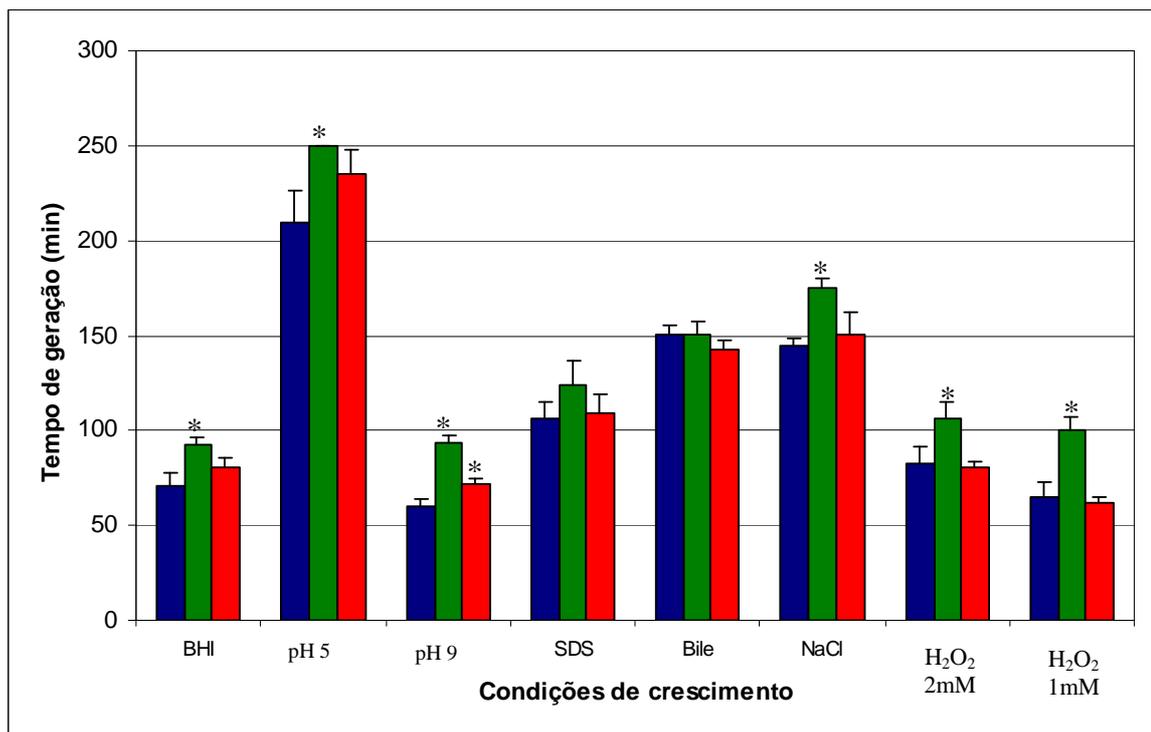


Figura 25 - Tempo de geração em diferentes condições de crescimento. O gráfico mostra o tempo de geração da estirpe selvagem de *E. faecalis* OG1RF (azul) e $\Delta ctsR$ (verde) e dos mutantes $\Delta clpB$ (vermelho) sob diferentes condições de crescimento. O tempo de geração foi dado em minutos. *, representa $p \leq 0,05$. A barra acima das colunas representa o desvio padrão.

4. Concentração mínima inibitória (CMI) de diferentes antimicrobianos apresentada pela estirpe selvagem OG1RF e pelos mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$

A concentração mínima inibitória (CMI) para antibióticos comumente usados na clínica, como: ampicilina, canamicina, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, norfloxacin, tetraciclina e vancomicina, foi determinada após 24 h de incubação. A densidade óptica de cada estirpe foi avaliada e os resultados mostraram que a menor concentração dos diferentes antibióticos, que inibiu o crescimento celular, não apresentava diferença entre os mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$ e a estirpe selvagem OG1RF (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores da concentração mínima inibitória de diferentes antimicrobianos apresentada pela estirpe selvagem OG1RF e pelos mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$.

Estirpes	Amp	Cam	Van	Nor	Tet	Kan	Erm	Gen
OG1RF	16	16	4	32	2	1.024	2	500
$\Delta clpB$	16	16	4	32	2	1.024	2	500
$\Delta ctsR$	16	16	4	32	2	1.024	2	500

Os valores da CMI são dados em $\mu\text{g/ml}$. Este experimento foi realizado em triplicata. Amp, ampicilina; Cam, cloranfenicol; Erm, eritromicina; Gen, gentamicina; Kan, canamicina; Nor, norfloxacin; Tet, tetraciclina; Van, vancomicina.

5. Teste de difusão a partir de disco

A susceptibilidade da estirpe selvagem e dos mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$, sob condições de estresse como: HCl 3 N, H₂O₂ 2 ou 5% (v/v), NaCl 5 M e Tris (pH 12,6), foi testada utilizando-se testes de difusão a partir de disco. Após 24 h de incubação, a leitura do diâmetro da zona de inibição de cada composto testado mostrou que não houve grandes diferenças no halo de inibição provocado pelo estresse ácido e oxidativo (Tabela 5), mostrando que a estirpe selvagem e os mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$ não apresentam diferença significativa na sensibilidade a estas condições testadas. Em relação ao estresse salino e básico, observou-se ausência de halo de inibição para todas as estirpes testadas, o que provavelmente também indica que as proteínas ClpB e CtsR não estariam envolvidas na resposta a estas condições de estresse (Tabela 5).

Tabela 5: Valores do diâmetro da zona de inibição de cada estirpe testada para diferentes condições de estresse.

Estirpe	HCl (3N) pH 2,0	H ₂ O ₂ 5%	H ₂ O ₂ 2%	Tris (pH 12,6)	NaCl (5M)
OG1RF	13	25,1	19	0	0
$\Delta clpB$	14	25,5	19	0	0
$\Delta ctsR$	14	25,5	19	0	0

Os valores são dados em milímetros e representam a média de um experimento realizado em triplicata.

6. Resposta ao estresse oxidativo das células de *E. faecalis* OG1RF e das estirpes mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$

Para se avaliar se as proteínas ClpB e CtsR desempenham um papel na resposta de *E. faecalis* OG1RF ao estresse oxidativo, a capacidade das estirpes mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$ para suportar o estresse oxidativo com H_2O_2 foi analisada. As unidades formadoras de colônias de células submetidas a H_2O_2 (30 mM) foram determinadas em um período de 2 h a 37°C. Ambas as estirpes mutantes apresentaram sensibilidade semelhante frente ao tratamento com peróxido de hidrogênio. Todavia, não houve diferenças significativas entre os mutantes e a estirpe selvagem (Figura 26). Estes resultados mostraram que a ausência das proteínas ClpB e CtsR não alterou a sobrevivência de *E. faecalis* sob duas horas de estresse oxidativo.

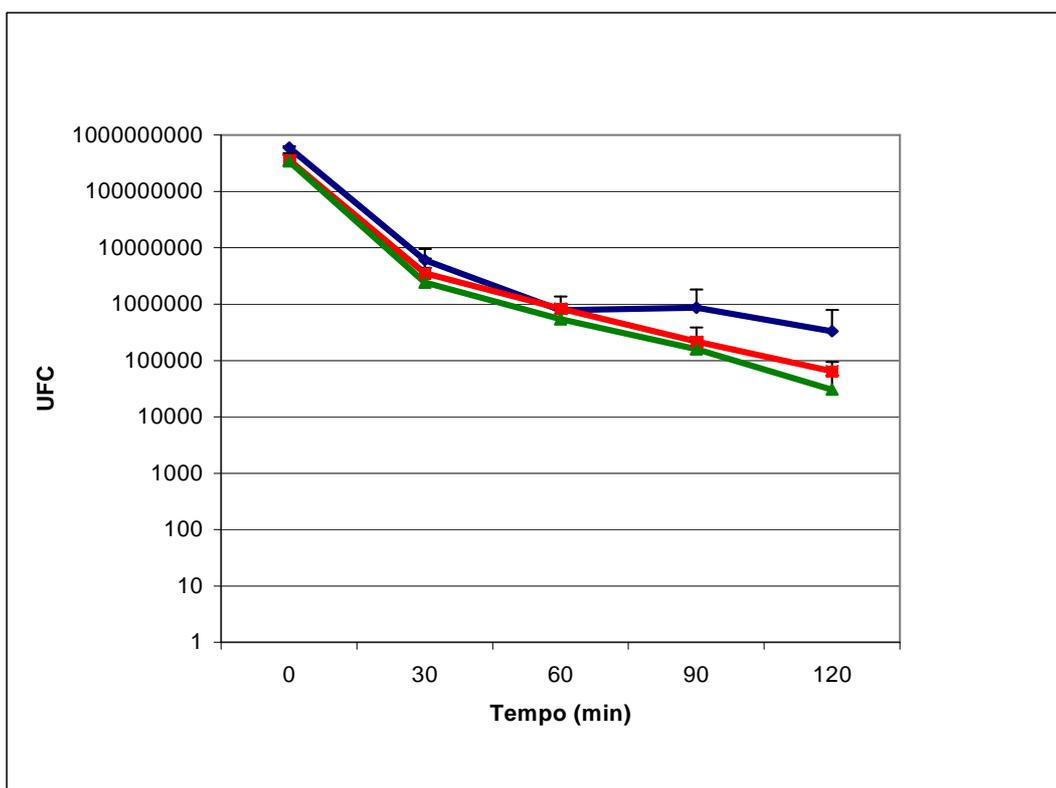


Figura 26 - Análise de viabilidade dos mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$ sob estresse oxidativo. As células de *E. faecalis* OG1RF (azul) e as células mutantes $\Delta clpB$ (vermelho) e $\Delta ctsR$ (verde) foram submetidas ao estresse oxidativo com H_2O_2 (30 mM), por 2 h a 37°C.

Análises da expressão do gene *clpB* na estirpe selvagem OG1RF, por qRT-PCR, mostraram que não houve indução do transcrito do gene *clpB* quando as células foram submetidas ao estresse oxidativo com H₂O₂ (Figura 27). Análises estatísticas mostraram que a redução da expressão do gene *clpB* não foi estatisticamente significativa. Os dados obtidos através destes experimentos mostraram que, possivelmente, a proteína ClpB não é essencial à resposta ao estresse oxidativo.

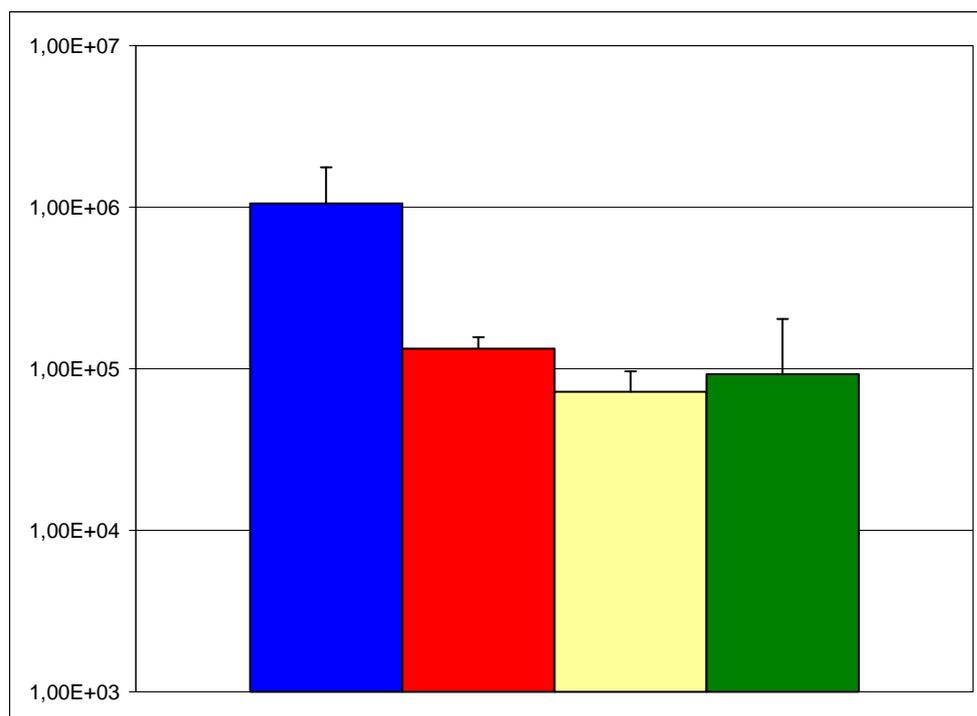


Figura 27 - Análise da expressão do mRNA do gene *clpB* de *E. faecalis* OG1RF por qRT-PCR sob condição de estresse oxidativo. A cultura da estirpe selvagem foi submetida a 4 mM de H₂O₂ durante 15 min (barra vermelha), 30 min (barra amarela) e 60 min (barra verde) a 37°C. Como controle, foram usadas células mantidas a 37°C em meio de cultura BHI (barra azul).

7. Análise das proteínas ClpB e CtsR na indução da termotolerância:

Para se testar o envolvimento das proteínas ClpB e CtsR na indução de termotolerância por células de *E. faecalis*, uma cultura da estirpe selvagem OG1RF e dos mutantes $\Delta ctsR$ e $\Delta clpB$ foi submetida à pré-incubação a 45°C por 30 min e/ou ao tratamento com choque térmico a 60°C, durante 30 e 60 min, conforme descrito em materiais e métodos. O gráfico apresentado na figura 28 mostra que a estirpe selvagem OG1RF e o mutante $\Delta ctsR$, previamente submetidos à temperatura de 45°C, foram capazes de sobreviver a 30 e 60 min de exposição ao calor de 60°C, demonstrando que *E. faecalis*, como outras bactérias, pode induzir a termotolerância. Por outro lado, o mutante $\Delta clpB$ morreu rapidamente depois de exposto ao calor de 60°C, mesmo quando submetido anteriormente a uma pré-adaptação a 45°C (Figura 28), revelando, assim, a importância da proteína ClpB na indução da termotolerância. Quando as células foram submetidas ao choque térmico a 60°C, sem a pré-incubação a uma temperatura intermediária, as análises mostraram que células, tanto selvagens como dos mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$, apresentaram marcada redução de sobrevivência (Figura 28).

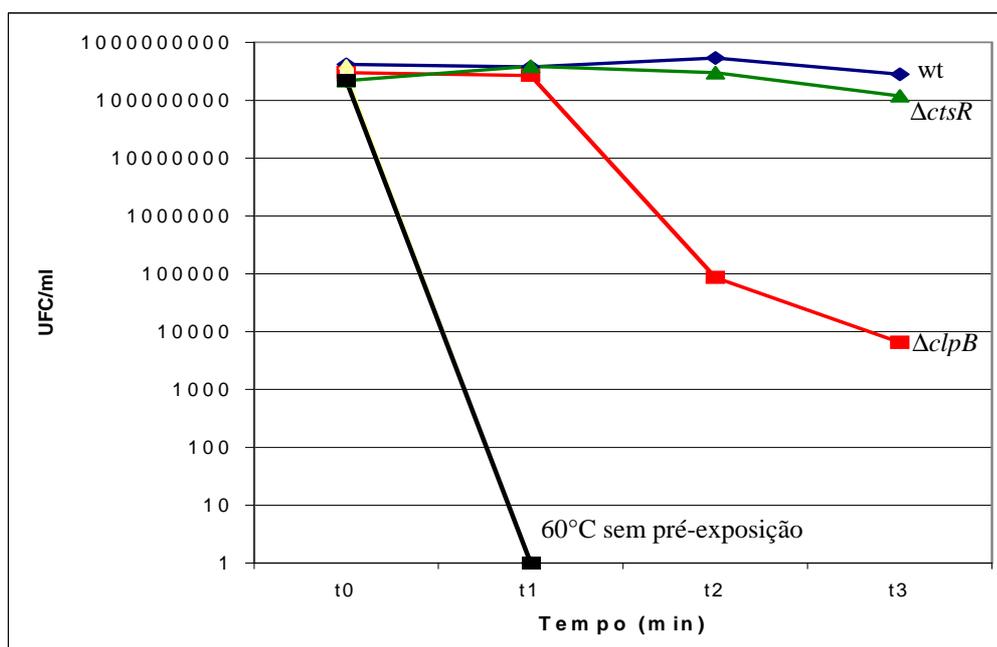


Figura 28 - ClpB é requerida para induzir termotolerância em *E. faecalis* OG1RF. O gráfico mostra a viabilidade celular da estirpe selvagem OG1RF (azul) e dos mutantes $\Delta clpB$ (vermelho) e $\Delta ctsR$ (verde) após pré-incubação das células a 45°C (t1) e posterior choque térmico a 60°C por 30 (t2) e 60 min (t3). A viabilidade celular da estirpe selvagem OG1RF e dos mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$ foi avaliada após o choque térmico a 60°C por 30 min (60°C direto – linha preta).

8. Capacidade da formação de biofilme pelos mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$ em *E. faecalis*

Para se avaliar a formação de biofilme por células selvagens e mutantes de *E. faecalis* OG1RF, foi analisada a aderência das células crescidas em placas de poliestireno, em meio semidefinido contendo 1% de glicose, conforme descrito em materiais e métodos. A produção de biofilme foi detectada após incubação por 24 h, entretanto, as células mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$ não apresentaram nenhuma diferença significativa em relação à estirpe selvagem OG1RF, conforme mostrado na figura 29. A produção de biofilme pôde ser observada pelos valores da absorbância das células formadoras de biofilme (Figura 29). Estes resultados indicam que, provavelmente, nem a proteína ClpB e nem a CtsR são necessárias para uma eficiente formação de biofilme por *E. faecalis* OG1RF.

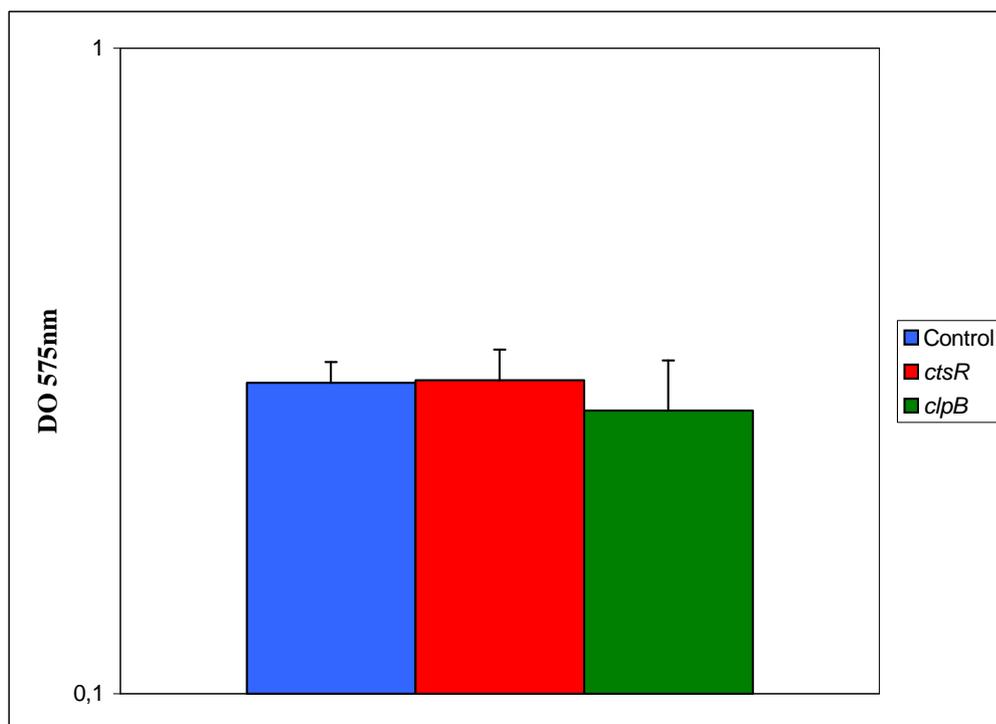


Figura 29 - Análise da formação do biofilme. Gráfico dos valores da absorbância das células formadoras de biofilme: *E. faecalis* OG1RF (azul) e por mutantes $\Delta clpB$ (verde) e $\Delta ctsR$ (vermelho).

9. Virulência de *E. faecalis* OG1RF e dos mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$

Para se testar a virulência dos mutantes e da cepa selvagem de *E. faecalis* OG1RF em um modelo *in vivo*, larvas de *Galleria mellonella* foram selecionadas com, aproximadamente, 2 cm de comprimento e peso variando entre 200 e 300 mg (Figura 30-A). Conforme mostrado na figura 30-B, através da utilização de uma microsseringa, as larvas foram inoculadas com uma alíquota de 5 μ l da estirpe bacteriana (1×10^6 CFU). Durante o curso da infecção por *E. faecalis*, observou-se que as larvas demonstraram sinais evidentes de melanização, caracterizando as larvas como doentes ou mortas (Figura 30 - C). O efeito da deleção dos genes *clpB* e *ctsR* na virulência de *E. faecalis* pôde ser observado e, conforme mostrado na figura 30 (D), as taxas de morte foram significativamente menores nas larvas infectadas com os mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$ do que naquelas infectadas com a estirpe selvagem OG1RF ($p \leq 0,001$). Após 28 h de infecção, aproximadamente 65% das larvas infectadas com a estirpe OG1RF estavam mortas, enquanto 35% e 25% das larvas infectadas com as estirpes mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$, respectivamente, foram mortas (Figura 30 - D). As larvas utilizadas como controle apresentaram, aproximadamente, 95% de sobrevivência, após os cinco dias de infecção.

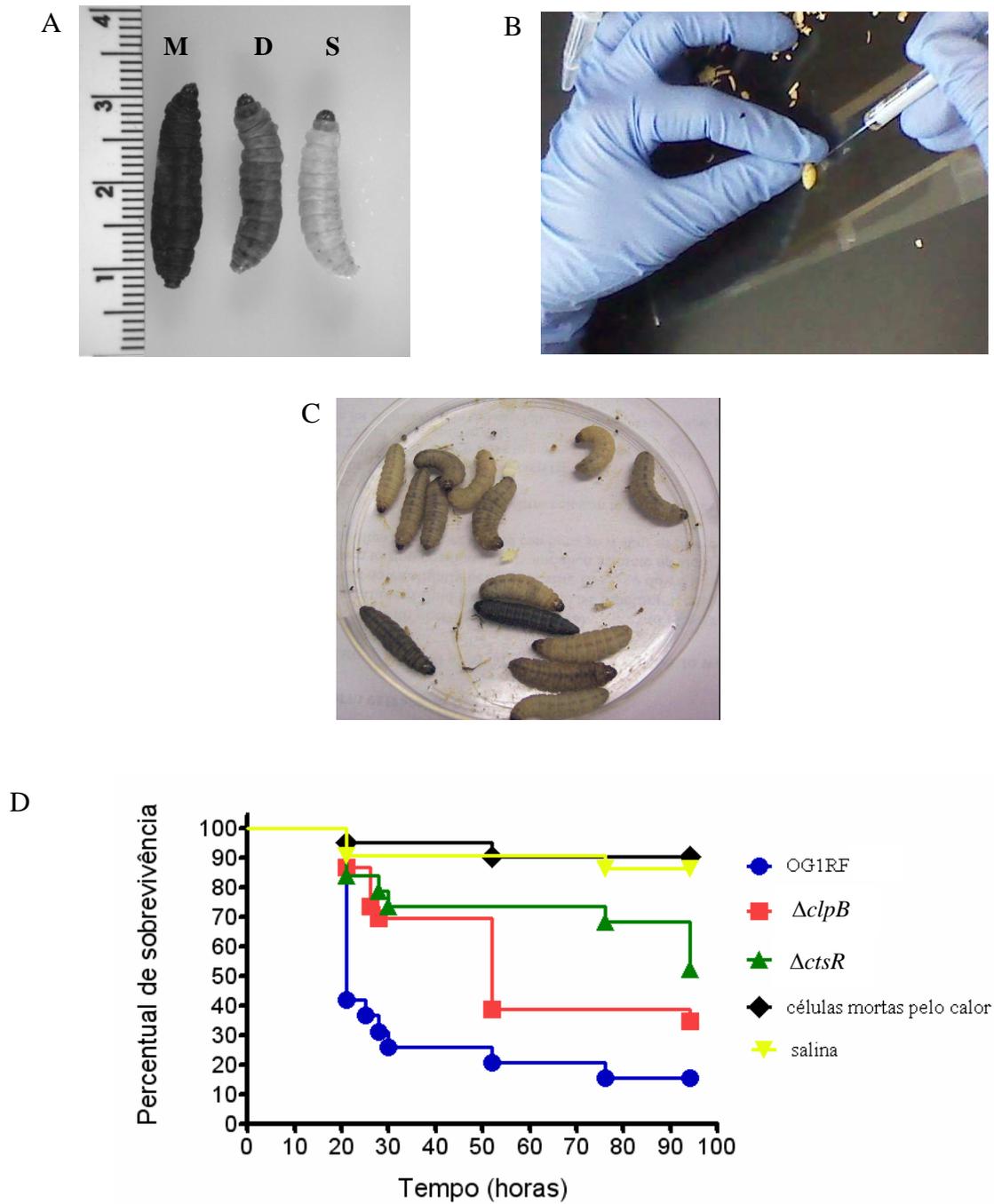


Figura 30 - Efeito da deleção nos genes *clpB* e *ctsR* na virulência de *E. faecalis*. (A) *Galleria mellonella* em três estados: mortas (M), doentes (D) e sadias (S). (B) Inoculação subcutânea. (C) Processo de melanização das larvas durante a infecção com *E. faecalis*. (D) Gráfico de sobrevivência das larvas após infecção com células selvagens OG1RF (azul) e mutantes $\Delta clpB$ (vermelho) e $\Delta ctsR$ (verde). Como controles não virulentos, foram testadas larvas infectadas somente com salina (amarelo) ou com a estirpe OG1RF (preto) submetida ao calor de 75°C por 20 min.

DISCUSSÃO

Nós últimos anos, o nosso grupo tem trabalhado na caracterização das principais proteínas de choque térmico dos complexos DnaK (família HSP70) e GroEL/S (família HSP60/ HSP10) e na organização e regulação dos respectivos genes *hrcA-grpE-dnaK-dnaJ* e *groEL/S*, em *E. faecalis* e em *E. faecium* (LAPORT *et al.*, 2001; 2003; 2004; 2006). Estes complexos estão envolvidos na viabilidade celular em condições normais e em condições de estresse, assegurando um enovelamento correto das proteínas celulares (HOURY, 2001). O intuito deste trabalho foi estender os estudos relacionados às proteínas de choque térmico, com ênfase na investigação das proteínas Clps. Estas proteínas fazem parte da família HSP100 e participam do enovelamento correto e da degradação de proteínas celulares (HOURY, 2001).

Os enterococos vêm recebendo destaque desde a década de 70, em especial, *E. faecalis*, que destacou-se como causa comum de infecções adquiridas em hospitais, devido à resistência a antibióticos e à resistência aos vários tipos de estresses ambientais (GIARD *et al.*, 2001; MURRAY *et al.*, 2003). Durante a realização deste trabalho, utilizou-se, principalmente, três estirpes de *E. faecalis*: OG1X, V583 e OG1RF. O genoma de *E. faecalis* V583 foi totalmente sequenciado e encontra-se disponível (www.tigr.org), possibilitando, assim, o uso desta estirpe para a realização de análises *in silico*. As estirpes OG1RF, com seu genoma sequenciado, mas com acesso não disponível, e a OG1X, ambas derivadas da estirpe OG1, foram utilizadas para o estudo dos genes *clp*, com ênfase especial para os genes *clpB* e *ctsR*, assim como seus produtos proteicos.

A manipulação genética de células de *E. faecalis* e a construção de estirpes mutantes vêm se mostrando como um processo difícil e trabalhoso. Em 2007, KRISTICH, CHANDLER & DUNNY construíram células mutantes de *E. faecalis* através de um sistema de entrega conjugativa para a introdução, com alta frequência, do DNA clonado em estirpes de *E. faecalis* e um sistema de troca genética sem a utilização de um marcador de seleção. A construção de células mutantes de *E. faecalis*, utilizando a metodologia apresentada acima, foi recentemente utilizada por Abranches e colaboradores no estudo da resposta a diferentes estresses, tolerância à vancomicina e virulência por células de *E. faecalis* (ABRANCHES *et al.*, 2009). Para a realização do presente estudo, o método de troca genética sem a utilização de um marcador de seleção também foi utilizado para a construção de duas estirpes mutantes, através da inativação dos genes *clpB* e *ctsR* ($\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$) em células de *E. faecalis* OG1RF e um dos objetivos deste trabalho consistiu na caracterização destes mutantes. Os resultados

obtidos aqui representam um estudo inicial do papel das proteínas de choque térmico Clp/ATPases e do repressor CtsR no gênero *Enterococcus*, mais especificamente em uma das principais espécies deste gênero, *E. faecalis*.

Trabalhos anteriores do nosso grupo com *E. faecalis* e *E. faecium* mostraram que os genes *dnaK* e *groE* são classificados dentro da classe I dos genes de choque térmico e que estes mesmos genes são regulados ao nível transcricional em resposta ao estresse térmico e a outros estresses. O operon *dnaK* desses micro-organismos é precedido por duas sequências CIRCE conservadas e por um promotor do tipo sigma A (σ^A), localizado a montante do gene *hrcA* (LAPORT *et al.*, 2004; 2006). Dois principais reguladores têm sido identificados como fazendo parte do sistema negativo de regulação dos genes de choque térmico. Enquanto HrcA controla a expressão das chaperonas moleculares, DnaK e GroEL (LAPORT *et al.*, 2004), o repressor CtsR regula, principalmente, a expressão dos genes que codificam as proteínas de choque térmico Clp/ATPases e da protease ClpP (DERRÉ *et al.*, 1999). O repressor CtsR reconhece uma repetição direta de sete pares de bases (GGTCAAAXXGGTCAAA), também chamada “CtsR-box” (DERRÉ, RAPOPORT & MSADEK, 1999).

Através dos nossos estudos, a provável região promotora dos genes *clp* de *E. faecalis* foi caracterizada através de análises *in silico* do genoma de *E. faecalis* V583. De forma similar a dos genes *clp* de outros micro-organismos Gram-positivo, como *B. subtilis* (SCHUMANN, 2003) encontramos a sequência-consenso do tipo σ^A no promotor de todos os genes *clp*.

A sequência “CtsR-box”, geralmente localizada nas regiões promotoras de genes de choque térmico de classe III, *clpC*, *clpE* e *clpP* (SCHUMANN, 2003), foi encontrada na região promotora dos genes *clpB*, *clpC*, *clpE* e *clpP*, mas não de *clpX*, em *E. faecalis*, sugerindo que o repressor CtsR também se encontra envolvido na regulação destes genes, mas não de *clpX* de *E. faecalis*.

Em um estudo sobre a regulação da expressão do operon *clpC* pelo repressor CtsR, KRÜGER & HECKER (1998) mostraram, através de uma análise por eletroforese bidimensional, que houve diferenças nas proteínas expressas por células selvagens e células mutantes para o gene *ctsR* de *B. subtilis*. Este trabalho relatou ainda a importância de CtsR na expressão de alguns genes *clp*, visto que as proteínas ClpC e ClpP tiveram uma maior expressão em células mutantes *ctsR* do que nas células selvagens. Durante uma análise transcricional comparativa entre células de *S. aureus* e seu derivado mutante no gene *ctsR*, três genes, *clpB*, *clpP* e *clpC*, foram fortemente induzidos pelo estresse térmico nas células mutantes (FREES *et al.*, 2004).

No presente estudo, experimentos realizados a partir de qRT-PCR mostraram que na estirpe selvagem de *E. faecalis*, houve um aumento na expressão dos genes *clpB*, *clpC*, *clpE* e *clpP* quando as células foram submetidas ao choque térmico a 48°C, entretanto o mesmo não ocorreu na expressão do gene *clpX*, onde nenhuma alteração foi observada nas células quando comparado células-controle a 37°C com àquelas expostas ao calor a 48°C. Em células mutantes para o gene *ctsR* de *E. faecalis*, os resultados obtidos através de PCR em tempo real mostraram um aumento no nível de expressão dos genes *clpB*, *clpC*, *clpE* e *clpP* de *E. faecalis* em células-controle a 37°C quando comparado as células selvagens de *E. faecalis* OG1RF. Contudo, assim como já observado em outras bactérias, por exemplo, *S. aureus* (FREES *et al.*, 2004), vale ressaltar que no nosso estudo, observamos que, provavelmente, o gene *clpX* não faz parte do regulon *ctsR*. Este fato foi observado visto que células mutantes Δ *ctsR* submetidos a 37°C não apresentaram diferenças na expressão do gene *clpX* quando comparado as células selvagens de *E. faecalis* OG1RF.

A proteína de choque térmico ClpB (HSP100) é um membro da família de polipeptídeos Clp que funcionam como chaperonas moleculares e que poderiam estar envolvidas em etapas do processo infeccioso de bactérias patogênicas (HENDERSON *et al.*, 2006). No presente trabalho, o gene *clpB* anotado no genoma de *E. faecalis* V583 (www.tigr.org) foi caracterizado através da construção da estirpe mutante Δ *clpB*. As pesquisas realizadas na sequência do gene *clpB* revelaram, ainda, a presença de um segundo códon de iniciação, GTG, que poderia indicar o início da síntese de uma segunda proteína ClpB (80 kDa), de menor tamanho.

Análise por “western blot”, utilizando-se anticorpo policlonal anti-ClpB, permitiu a identificação do produto do gene *clpB* em *E. faecalis* (OLIVEIRA, 2006). A proteína ClpB apresentou-se de duas formas neste micro-organismo, ambas com massa molecular maior do que 80 kDa. Interessantemente, este resultado já tem sido relatado para outros micro-organismos. Em *L. monocytogenes*, o códon de iniciação ATG, precedido por um sítio de ligação ribossômico (RBS), foi encontrado iniciando a ORF de uma proteína de massa molecular de 97,5 kDa. Mas, o mesmo estudo mostrou também a existência de um segundo códon de iniciação, GTG, localizado 151 códons a jusante do códon de iniciação ATG descrito. Este potencial sítio interno de tradução sugeriu a existência de uma forma menor da proteína ClpB, com uma massa molecular teórica de 80,6 kDa (CHASTANET *et al.*, 2004).

Em *E. coli*, um estudo realizado por SQUIRES e colaboradores, em 1991, relatou que a inativação do gene *clpB* não somente eliminou a síntese da proteína ClpB, como também levou à inativação de uma outra proteína de menor tamanho, derivada da mesma sequência

aberta de leitura correspondente à proteína ClpB, provavelmente pela tradução a partir de um segundo códon de iniciação. Assim como em nossos resultados em *E. faecalis*, onde detectamos duas formas proteicas (OLIVEIRA, 2006), viu-se que outros estudos também relataram que duas formas distintas da proteína ClpB existem em procariotos e eucariotos e, em cada caso, ambas formas são HSPs (PORANKIEWICZ & CLARKE, 1997).

Mediante as análises *in silico* do gene *clpB* e a detecção de duas formas da proteína em *E. faecalis*, com anticorpo policlonal direcionado para o domínio carboxi-terminal (OLIVEIRA, 2006) notou-se que assim como na cianobactéria *Synechococcus* spp. (PORANKIEWICZ & CLARKE, 1997) e em *L. monocytogenes* (CHASTANET *et al.*, 2004), um único gene codifica duas formas da proteína ClpB em *E. faecalis*.

Três funções da proteína ClpB foram relatadas em bactérias Gram-negativas e em eucariotos: (i) a resistência ao estresse a altas temperaturas em *Helicobacter pylori* (ALLAN, MULLANBY & TABAQCHALI, 1998), *Brucella suis* (EKAZA *et al.*, 2001) e *E. coli* (SQUIRES, *et al.*, 1991); (ii) a resistência ao choque frio em *Synechococcus* spp. e (iii) a indução da termotolerância na cianobactéria *Synechococcus* spp. (ERIKSSON & CLARKE, 1996; PORANKIEWICZ & CLARKE, 1997). Contudo, em bactérias Gram-positivas, há cerca de dez anos atrás, somente dois genes *clpB* tinham sido descritos, o gene *clpB* de *Streptomyces albus* (GRANDVALET, SERVANT & MAZODIER, 1999) e de *L. lactis* (INGMER *et al.*, 1999). Atualmente, o estudo com base na caracterização do gene *clpB* estendeu-se e alguns relatos têm descrito algumas das funções da proteína ClpB em bactérias Gram-positivas: a mutação do gene *clpB* não afetou a resistência de *L. lactis* a altas temperaturas, a condições de salinidade ou ao estresse com puromicina (INGMER *et al.*, 1999); a proteína ClpB foi necessária para a indução de termotolerância e virulência de *L. monocytogenes* (CHASTANET *et al.*, 2004); em *S. aureus*, a expressão do gene *clpB* está sob o controle do repressor CtsR e a proteína ClpB foi necessária para indução de termotolerância (FREES *et al.*, 2004). No entanto, mesmo diante da importância clínica dos *Enterococcus* spp., não existem atualmente trabalhos relatando e caracterizando um possível papel da proteína ClpB em resposta ao estresse na espécie *E. faecalis*.

Ao se investigar os fenótipos da célula mutante $\Delta clpB$ em *E. faecalis* OG1RF, nenhuma diferença significativa foi observada na formação de biofilme ou na resposta a outros estresses em geral, tais como estresse oxidativo, alcalino e ácido, quando comparadas às da estirpe selvagem, mostrando que a mutação no gene *clpB* não afetou a capacidade deste micro-organismo sob tais condições de estresse. Estes resultados foram concordantes com os estudos realizados por outros autores. Interessantemente, em *S. mutans*, KAJFASZ e

colaboradores (2009), testando a capacidade de mutantes *clp* crescerem sob condições de estresse térmico a 42°C ou em meio acidificado (pH 5,5) e quanto à capacidade de formar biofilme na presença de glicose e sacarose, mostraram que, quando comparados com a estirpe original, não houve diferenças no crescimento dos mutantes $\Delta clpB$, $\Delta clpC$, $\Delta clpE$ e $\Delta clpL$ sob as condições de estresse testadas e que a estirpe mutante $\Delta clpB$ não apresentou nenhuma diferença significativa quanto à formação de biofilme.

CAPESTANY e colaboradores (2008), estudando o papel do sistema das proteínas Clp na tolerância ao estresse, na formação do biofilme e na invasão intracelular de *Porphyromonas gingivalis*, relataram que mutantes no gene *clpC* e um duplo mutante para os genes *clpX* e *clpP* apresentaram uma maior produção de biofilme do que a estirpe parental, entretanto, nenhuma diferença significativa foi observada na formação de biofilme do mutante $\Delta clpB$. Além disso, a ausência da proteína ClpB prejudicou significativamente a capacidade invasiva da *P. gingivalis* e, embora esta proteína não pareça desempenhar nenhum papel na entrada desta bactéria em células epiteliais, a ClpB foi importante para a sobrevivência intracelular de *P. gingivalis*. Da mesma forma, as células de *S. aureus* mutantes para ClpB foram incapazes de replicar intracelularmente em células bovinas (FREES *et al.*, 2004).

Geralmente, acredita-se que a etapa de adaptação seja necessária para se induzir a síntese de proteínas de choque térmico, que posteriormente irão permitir que as células recuperem-se do tratamento severo com choque térmico (CRAIG, 1985). Assim como em outros micro-organismos, os estudos realizados através deste trabalho mostraram que, enquanto a proteína ClpB tem um papel essencial no processo de adaptação a temperaturas elevadas de *E. faecalis*, células mutantes para o gene *ctsR* induziram o fenômeno de termotolerância tão bem quanto a célula selvagem de *E. faecalis* OG1RF. Nossos estudos mostraram que uma pré-incubação ou uma adaptação à temperatura de 45°C por 30 min, em células selvagens ou mutantes para o gene *ctsR*, possibilitou a sobrevivência da bactéria por 60 min a 60°C. Contudo, este mesmo processo de adaptação, quando submetido à célula mutante para o gene *clpB*, mostrou que os mutantes $\Delta clpB$ não foram capazes de sobreviver após um subsequente choque térmico a 60°C.

ClpB tem se mostrado importante para a aquisição de termotolerância em diversos organismos, incluindo bactérias Gram-positivas, como *L. monocytogenes* e *S. aureus* (CHASTANET *et al.*, 2004; FREES *et al.*, 2004). Em *E. coli*, a exigência da proteína ClpB para indução de termotolerância diz respeito à sua capacidade de resgatar agregados proteicos formados durante o choque térmico (THOMAS & BANEYX, 1998). A proteína ClpB pode formar, com a proteína DnaK, um complexo de bichaperonas que reativa fortemente

agregados proteicos. A interação entre ClpB e DnaK sugere que uma das chaperonas pode recrutar seu parceiro durante a reativação do substrato e que esta interação ocorre através do domínio N-terminal e do domínio central da proteína ClpB (KEDZIERSKA *et al.*, 2005).

Através de experimentos por “microarray” em células de *P. gingivalis*, foi mostrado que outros genes envolvidos na recuperação de proteínas agregadas, especialmente *grpE* e *dnaJ*, foram reprimidos nas células mutantes $\Delta clpB$. Estes dados sugerem que a diminuição da termotolerância observado em mutantes para o gene *clpB* pode estar relacionado com a ausência ou o decréscimo destas chaperonas (YUAN *et al.*, 2007). Nossos estudos também mostraram que a proteína ClpB de *E. faecalis* está diretamente envolvida na aquisição de termotolerância nesta bactéria e este fato poderia estar contribuindo para o aumento da resistência da bactéria a temperaturas letais. Além disto, foi possível mostrar o papel da ClpB na virulência de *E. faecalis*, assim como observado em outras bactérias Gram-positivas, tais como *L. monocytogenes* (CHASTANET *et al.*, 2004) e *S. aureus* (FREES *et al.*, 2004).

As respostas de *E. faecalis* ao estresse também têm sido objeto de estudo aprofundado. Estudos demonstram que a pré-exposição a estresses subletais, condições oligotróficas ou a ausência de glicose levam a um aumento global da resistência ao estresse (FLAHAUT, 1996 (a); FLAHAUT *et al.*, 1997; GIARD *et al.*, 1997). Entretanto, com exceção da proteína de estresse geral Gls24 e as chaperonas moleculares GroEL e DnaK, a maioria das proteínas sintetizadas pelos micro-organismos, em decorrência de diferentes condições de estresse, permanece desconhecida (FLAHAUT, 1996 (b); FLAHAUT *et al.*, 1997; GIARD *et al.*, 2000; LAPORT *et al.*, 2006).

Quando investigando a expressão de genes *clp* por análises de “northern blot”, INGMER e colaboradores descreveram que a síntese do mRNA dos genes *clpB* e *clpE* foi fortemente induzida pelo choque térmico, enquanto o transcrito de *clpC* foi moderadamente induzido em células de *L. lactis* (INGMER *et al.*, 1999). Experimentos, através de “northern blot”, utilizando mRNA de *E. faecalis* indicaram que os genes *clpB* e *clpP* se expressam através de transcritos monocistrônicos, enquanto que os genes *clpC*, *clpE* e *clpX* parecem estar organizados em operons. Os resultados mostraram que com exceção apenas de *clpX*, estes genes parecem ser regulados ao nível de transcrição e serem induzidos pelo estresse térmico.

A análise do provável operon de *clpC* mostrou a presença de três transcritos; onde o de 2,8 kb representou provavelmente o operon *clpC-ctsR*; o de 1,4 kb poderia representar uma degradação do mRNA; e o de 9,0 kb poderia representar leituras “readthrough”, sob choque térmico, apesar de um sítio de terminação da transcrição ter sido encontrado a montante do

códon de terminação do gene *clpC*. Vale ressaltar que experimentos futuros necessitam ser realizados a fim de melhor se caracterizar os transcritos de 9,0 e 1,4 kb e a indução dos mesmos. Assim como o gene *clpC*, propomos que outros experimentos sejam realizados para completa caracterização dos genes *clpE* e *clpX* e, assim, confirmar ou não se estes encontram-se em um operon com ORF(s) que flanqueia(m) estes genes. Sugerimos que, futuramente, uma sonda para outra(s) ORF(s) localizadas a jusante ou a montante dos genes *clpC*, *clpE* e *clpX* poderia ser sintetizada e utilizada em novas análises de “northern blot”.

Semelhante a este trabalho, em *E. faecalis*, LAPORT e colaboradores (2004) destacaram que o operon *dnaK* mostrou um transcrito de maior tamanho sendo fortemente transcrito quando as células foram tratadas a 50°C por 10 min e este mesmo transcrito foi discretamente detectado após crescimento do micro-organismo em meio de cultura adicionado de NaCl. Os autores deste trabalho sugeriram que, durante condições de estresses extremas os genes do operon *dnaK* são fortemente induzidos. Como consequência, o término da transcrição não é totalmente eficiente e, em algumas condições, os genes que estão localizados a jusante do gene *dnaJ* são cotranscritos como parte do operon *dnaK*, resultando num transcrito de maior tamanho do que o esperado.

Análises de PCR em tempo real confirmaram a indução dos genes *clp* sob temperaturas elevadas. Em células da estirpe selvagem *E. faecalis* OG1RF submetidas ao calor de 48°C, constatou-se que a expressão dos genes *clp*, com exceção do gene *clpX*, foi induzida mediante o estresse térmico. Considerando-se o fato de que pode existir uma relação entre a resposta ao estresse oxidativo e a virulência de *E. faecalis* (RIBOULET *et al.*, 2007), foi avaliado o possível papel dos genes *clp*, em especial o da proteína ClpB, na resposta ao estresse oxidativo. Assim sendo, análises realizadas com a estirpe selvagem *E. faecalis* OG1RF, através de qRT-PCR, mostraram que, ao contrário do choque térmico, o estresse oxidativo provocou uma redução na expressão dos genes *clp* quando as células foram submetidas ao estresse com H₂O₂ 4 mM.

Além da resistência ao choque térmico e ao estresse oxidativo, a disseminação de estirpes de *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina (VRE) tornou-se alvo de diversos estudos, visto que as estirpes VRE constituem um problema clínico em ambientes hospitalares. A vancomicina é um glicopeptídeo que atua sobre bactérias Gram-positivas pela inibição da biossíntese da parede celular (SOOD *et al.*, 2008). Com base na relevância das estirpes com resistência à vancomicina, a expressão dos genes *clp* em células de *E. faecalis* tratadas com vancomicina também foi avaliada e, com exceção apenas do gene *clpX*, esta expressão foi induzida após 15 e 30 min de incubação.

Diante dos estresses analisados, pôde-se concluir que os genes *clp* de *E. faecalis* apresentam, provavelmente, um papel na resposta ao estresse térmico ou com adição de vancomicina, mas não parecem estar relacionados à resposta ao estresse oxidativo.

Estudos através de PCR em tempo real mostraram a expressão de três genes envolvidos na resposta ao estresse, *clpP*, *clpX* e *gls24*, em diferentes estirpes de *E. faecalis* isoladas de alimento, material clínico ou de origem animal, sob diferentes condições ambientais, tais como diferentes meios de cultura e mudanças no pH e na salinidade. Em geral, todos os três genes demonstraram um alto nível de expressão nas células em crescimento exponencial, quando comparadas com células na fase estacionária, para todas as condições testadas (HEW, KORAKLI & VOGEL, 2007).

Uma variedade de dados indica que a capacidade para sobreviver em condições de estresse, processo que frequentemente está relacionado com o aumento da expressão de genes de estresse, está altamente relacionada com a virulência em *S. aureus* (CLEMENTS & FOSTER, 1999) e outros patógenos, como *Leishmania* spp. e *L. monocytogenes* (HUBEL *et al.*, 1997; ROUQUETTE *et al.*, 1998). A invasão de patógenos bacterianos em células do hospedeiro leva a mudanças ambientais e o papel aparentemente conservado de proteínas Clp na virulência poderia ser uma consequência do seu envolvimento nos danos impostos pelo estresse bacteriano (FREES *et al.*, 2007).

Recentemente, simples invertebrados, tais como a mosca de fruta, *Drosophila melanogaster* (ERICKSON *et al.*, 2004), e dois insetos lepidópteros, *Bombyx mori* (KAITO *et al.*, 2002) e *Galleria mellonella* (CHOI *et al.*, 2002; REEVES *et al.*, 2004), têm atraído interesse por representarem um potencial sistema para seleção de fatores de virulência de bactérias patogênicas ou para a elucidação de suas ações no hospedeiro. Diante disto, a larva da mariposa *G. mellonella* tem sido empregada em estudos de virulência de vários patógenos humanos, incluindo *E. faecalis* (PARK *et al.*, 2007; GASPAR *et al.*, 2009), *Pseudomonas aeruginosa* (MIYATA *et al.*, 2003) e *Candida albicans* (BRENNAN *et al.*, 2002). Algumas limitações, que possam existir com outros modelos, podem ser resolvidas com o uso do modelo da *G. mellonella*. Primeiro, as larvas de *G. mellonella* podem ser mantidas à temperatura de 37°C e, portanto, são bem adaptadas ao estudo de patógenos humanos. Em segundo lugar, o inóculo do micro-organismo pode ser administrado com precisão através de uma microinjeção no corpo da larva. Terceiro, as larvas apresentam tanto vias de resposta imune humoral como celular mediada por peptídeos antimicrobianos e células fagocíticas, respectivamente, o que permite uma melhor resposta do hospedeiro (KAVANAGH & REEVES, 2004). Finalmente, o modelo de infecção da *G. mellonella* é favorável ao

tratamento com antibióticos, e, assim, a eficácia de agentes antimicrobianos pode ser avaliada (MYLONAKIS *et al.*, 2005; APERIS *et al.*, 2007). Em relação à eficiência do modelo de estudo com *G. mellonella*, BRENNAN e colaboradores (2002) observaram, durante um estudo correlacionando a virulência de estirpes mutantes de *C. albicans* em camundongos e em larvas de *G. mellonella*, que a virulência de estirpes mutantes mensurada no sistema de camundongos foi similar à observada em *G. mellonella*, sugerindo que as larvas de *Galleria* são um modelo prático de estudo *in vivo*.

Apesar do crescente reconhecimento da importância clínica de infecções por *Enterococcus* spp., os mecanismos de patogenicidade utilizados por estas bactérias ainda não foram esclarecidos (KRISTICH, CHANDLER & DUNNY, 2007). Diante de estudos realizados por KONKEL & TILLY (2000) mostrando que genes de virulência de alguns micro-organismos poderiam estar relacionados com a resposta ao choque térmico (KONKEL & TILLY, 2000), e uma vez que a *G. mellonella* tem sido usado com sucesso como um modelo simples para estudos com *E. faecalis* (PARK, *et al.*, 2007; GASPAR *et al.*, 2009; LEBRETON *et al.* 2009), foi investigado, no presente trabalho, se os genes *clpB* e *ctsR* de *E. faecalis* estão envolvidos no processo de virulência desta bactéria, utilizando-se as larvas de *G. mellonella* como hospedeiro. Através de estudos *in vivo*, realizados no presente trabalho e utilizando-se este modelo de infecção, pôde-se observar que células mutantes $\Delta clpB$ e $\Delta ctsR$ apresentaram uma virulência menor quando comparadas às células selvagens de *E. faecalis* OG1RF, concluindo-se que tanto ClpB como CtsR são proteínas que podem estar envolvidas na virulência de *E. faecalis*.

Estudos em outros modelos animais têm sido utilizados para demonstrar que ClpB é importante para a virulência de patógenos bacterianos, incluindo *P. gingivalis* (YUAN, *et al.*, 2007), *Salmonella typhimurium*, (TURNER *et al.*, 1998), *L. monocytogenes* (CHASTANET *et al.*, 2004) e *Yersinia enterocolitica* (BADGER *et al.*, 2000). Em concordância com os nossos resultados, CHASTANET e colaboradores (2004) mostraram, em *L. monocytogenes*, que a proteína ClpB também apresenta um papel significativo na patogênese deste micro-organismo. Este trabalho mostrou que camundongos infectados com células selvagens de *L. monocytogenes* começaram a morrer a partir de cinco dias da infecção, enquanto aqueles camundongos infectados com células mutantes de *L. monocytogenes* afetadas no gene *clpB* apresentaram morte apenas a partir de doze dias após a infecção (CHASTANET *et al.*, 2004).

Os resultados obtidos nesta tese e descritos acima representam um estudo inicial dos genes *clp* em *E. faecalis* e da importância da chaperona molecular ClpB na resposta ao estresse térmico, na indução de termotolerância e na virulência de *E. faecalis*, cocos Gram-

-positivos de importância clínica. Além disso, vale ressaltar que, atualmente, as pesquisas genéticas e moleculares avançadas nesta bactéria baseiam-se na obtenção de mutantes. Entretanto, tal obtenção é extremamente difícil quando não se dispõe das técnicas necessárias. Desejamos ainda salientar que a obtenção de mutantes por dupla recombinação em *E. faecalis* nos permitirá ampliar as nossas pesquisas sobre a regulação da resposta ao choque térmico em estirpes do gênero *Enterococcus*, assim como aprofundar nossos estudos sobre as proteínas de choque térmico Clp/ATPases.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRANCHES, J.; CANDELLA, M. M.; WEN, Z.T.; BAKER, H.V. & BURNE, R.A. **Different roles of EIIAB^{Man} and EII^{Glc} in regulation of energy metabolism, biofilm development, and competence in *Streptococcus mutans*.** J. Bacteriol., 188, 3748 – 3758, 2006.
- ABRANCHES, J.; MARTINEZ, A.R.; KAJFASZ, J.K.; CHÁVEZ, V.; GARSIN, D.A. & LEMOS, J.A. **The molecular alarmone (p) ppGpp mediates stress responses, vancomycin tolerance, and virulence in *Enterococcus faecalis*.** J. Bacteriol., 191, 2248-2256, 2009.
- AHN, S.J.; LEMOS, J.A. & BURNE, R.A. **Role of HtrA in growth and competence of *Streptococcus mutans* UA159.** J. Bacteriol., 187, 3028–3038, 2005.
- ALLAN, E.; MULLANBY, P. & TABAQCHALI, S. **Construction and characterization of a *Helicobacter pylori* clpB mutant and role of the gene in the stress response.** J. Bacteriol., 180, 426-429, 1998.
- APERIS, G. B. B.; FUCHS, C. A.; ANDERSON, J. E.; WARNER, S. B.; CALDERWOOD, E. MYLONAKIS. ***Galleria mellonella* as a model host to study infection by the *Francisella tularensis* live vaccine strain.** Microbes Infect., 9, 729–734, 2007.
- BADGER, J. L.; YOUNG, B. M.; DARWIN, A. J. & MILLER, V. L. ***Yersinia enterocolitica* ClpB affects levels of invasins and motility.** J. Bacteriol., 182, 5563 – 5571, 2000.
- BAE, T.; KOZLOWICZ, B. & DUNNY, G.M. **Two targets in pCF10 DNA for PrgX binding: Their role in production of Qa and prgX mRNA and in regulation of pheromone-inducible conjugation.** J. Mol. Biol., 315, 995-1007, 2002.
- BANEYX, F. **Chaperonins and protein folding.** An. New York Acad. Sci., 745, 383-394, 1994.
- BARNETT, M.E.; NAGY, M.; KEDZIERSKA, S. & ZOLKIEWSKI, M. **The amino-terminal domain of ClpB supports binding to strongly aggregated proteins.** J. Biol. Chem., 280, 34940 - 34945, 2005.
- BOURGOGNE, A.; GARSIN, D. A.; QIN, X.; SINGH, K.V.; SILLANPAA, J.; SHAILAJA YERRAPRAGADA, S.; DING, Y.; DUGAN-ROCHA, S.; BUHAY, C.; SHEN, H.; CHEN, G.; WILLIAMS, G.; MUZNY, D.; MAADANI, A.; FOX, A.K.; GIOIA, J.; CHEN, L.; SHANG, Y.; ARIAS, C.A.; NALLAPAREDDY, S.R.; ZHAO, M.; PRAKASH, V.P.; CHOWDHURY, S.; JIANG, H.; GIBBS, R.A.; MURRAY, B.E.; HIGHLANDER, S.K. & WEINSTOCK, G.M. **Large scale variation in *Enterococcus faecalis* illustrated by the genome analysis of strain OG1RF.** Genome Biol., 9, RI 10 1-16, 2008.
- BRENNAN, M.; THOMAS, D.Y.; WHITEWAY, M. & KAVANAGH, K. **Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae.** FEMS Immunol. Med. Microbiol., 34, 153-157, 2002.
- BUTLER, S.M.; FESTA, R.A.; PEARCE, M.J. & WIN, K.H. **Self-compartmentalized bacterial proteases and pathogenesis.** Mol. Microbiol., 60, 553-562, 2006.
- CAPESTANY, C.A.; TRIBBLE, G.D.; MAEDA, K.; DEMUTH, D.R. & LAMONT, R.J. **Role of the Clp system in stress tolerance, biofilm formation, and intracellular invasion in *Porphyromonas gingivalis*.** J. Bacteriol., 190, 1436-1446, 2008.
- CARPER, S.W.; DUFFY, J.J. & GERNER, E.W. **Heat shock proteins in thermotolerance and other cellular processes.** Cancer Res., 47, 5249-5255, 1987.

- CETINKAYA, Y.; FALK P. & MAYHALL, C.G. **Vancomycin-resistant enterococci**. Clin. Microbiol. Rev., 13, 686-707, 2000.
- CHANDLER, J.R.; HIRT, H. & DUNNY, G.M. **A paracrine peptide sex pheromone also acts as an autocrine signal to induce plasmid transfer and virulence factor expression *in vivo***. Proc. Natl. Acad. Sci., 102, 15617–15622, 2005.
- CHASTANET, A.; FERT, J. & MSADEK, T. **Comparative genomics reveal novel heat shock regulatory mechanisms in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria**. Mol. Microbiol., 47, 1061-1073, 2003.
- CHASTANET, A. & MSADEK, T. ***clpP* of *Streptococcus salivarius* is a novel member of the dually regulated class of stress response genes in Gram-positive bacteria**. J. Bacteriol., 185, 683-687, 2003.
- CHASTANET, A.; DERRE, I.; NAIR, S. & MSADEK, T. ***clpB*, a novel member of the *Listeria monocytogenes* CtsR regulon, is involved in virulence but not in general stress tolerance**. J. Bacteriol., 186, 1165-1174, 2004.
- CHOI J.Y.; SIFRI C.D.; GOUMNEROV B.C.; RAHME L.G.; AUSUBEL F.M. & CALDERWOOD S. B. **Identification of virulence genes in a pathogenic strain of *Pseudomonas aeruginosa* by representational difference analysis**. J. Bacteriol., 184, 952-961, 2002.
- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. **Single-step method of RNA isolation by acid-guanidinium-thiocyanate-phenol-chloroform extraction**. Anal. Biochem., 162, 156–159, 1987.
- CLARKE, A.K. & ERIKSSON, M.J. **The truncated form of the bacterial heat shock protein ClpB/HSP100 contributes to development of thermotolerance in the Cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942**. J Bacteriol., 182, 7092–7096, 2000.
- CLEMENTS, M.O. & FOSTER, S.J. **Stress resistance in *Staphylococcus aureus***. Trends Microbiol., 7, 458-462, 1999.
- CLOS, J.; KLAHOLZ, L.; HROEMER, M.; KROBITSCH, S. & LINDQUIST, S. **Heat shock protein 100 and the amastigote stage-specific A2 proteins of *Leishmania donovani***. Med. Microbiol. Immunol., 190, 47-50, 2001.
- CORTES-PEREZ, N.G.; POQUET, I.; OLIVEIRA, M.; GRATADOUX, J.J.; MADSEN, S.M.; MIYOSHI, A.; CORTHER, G.; AZEVEDO, V.; LANGELLA, P. & BERMÚDEZ-HUMARÁN, L.G. **Construction and characterization of a *Lactococcus lactis* strain deficient in intracellular ClpP and extracellular HtrA proteases**. Microbiology, 152, 2611–2618, 2006.
- CRAIG, E.A. **The heat shock response**. Crit. Rev. Biochem. Mol., 18, 239-280, 1985.
- CRAIG, E.A.; GAMBILL, B.D. & NELSON, R.J. **Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis**. Microbiol. Rev., 57, 402–414, 1993.
- D'AZEVEDO, P.A.; DIAS, C.A.G. & TEIXEIRA, L.M. **Genetic diversity and antimicrobial resistance of enterococcal isolates from Southern region of Brazil**. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo., 48, 11-16, 2006.
- DERRÉ, I.; RAPOPORT, G.; DEVINE, K.; ROSE, M. & MSADEK, T. **ClpE, a novel type of HSP100 ATPase, is part of the CtsR heat shock regulon of *Bacillus subtilis***. Mol. Microbiol., 32, 581-593, 1999.

- DERRÉ, I.; RAPOPORT, G. & MSADEK, T. **CtsR, a novel regulator of stress and heat shock response, controls *clp* and molecular chaperone gene expression in Gram-positive bacteria.** Mol. Microbiol., 31, 117-132, 1999.
- DOYLE, S.M. & WICKNER, S. **Hsp104 and ClpB: protein disaggregating machines.** Trends Biochem. Sci., 34, 40 – 48, 2009.
- DUNNY, G.M.; BROWN, B.L. & CLEWELL, D.B. **Induced cell aggregation and mating in *Streptococcus faecalis*: evidence for a bacterial sex pheromone.** Proc. Natl. Acad. Sci., 75, 3479-3483, 1978.
- EKAZA, E.; TEYSSIER, J.; QUAHRANI-BETTACHE, S.; LIAUTARD, J.P. & KOHLER, S. **Characterization of *Brucella suis clpB* and *clpAB* mutants and participation of the genes in stress responses.** J. Bacteriol., 183, 2677-2681, 2001.
- ERICKSON, D.L.; LINES, J.L.; PESCI, E.C.; VENTURI, V. & STOREY, D.G. ***Pseudomonas aeruginosa relA* contributes to virulence in *Drosophila melanogaster*.** Infect. Immun., 72, 5638-5645, 2004.
- ERIKSSON, M.J. & CLARKE, A.K. **The heat shock protein ClpB mediates the development of thermotolerance in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain PCC 7942.** J. Bacteriol., 178, 4839-4846, 1996.
- FACKLAM, R.R.; TEIXEIRA, L.M. ***Enterococcus*.** In: Leslie Collier, Albert Balows and Max Sussman (eds). Topley & Wilson's. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections: 9^a Ed. p. 669-682. 1998.
- FLAHAUT, S.; BENACHOUR, A.; GIARD, J.C.; BOUTIBONNES, P. & AUFRAY, Y. **Defense against lethal treatments and *de novo* protein synthesis induced by NaCl in *Enterococcus faecalis* ATCC 19433.** Arch. Microbiol., 165, 317-324, 1996(a).
- FLAHAUT, S.; HARTKE, A.; GIARD, J.C.; BENACHOUR, A.; BOUTIBONNES, P. & AUFRAY, Y. **Relationship between stress response toward bile salts, acid and heat treatment in *Enterococcus faecalis*.** FEMS Microbiol. Lett. 138, 49-54, 1996(b).
- FLAHAUT, S.; HARTKE, A.; GIARD, J.C. & AUFRAY, Y. **Alkaline stress response in *Enterococcus faecalis*: adaptation, cross-protection, and changes in protein synthesis.** Appl. Environ. Microbiol., 63, 812-814, 1997.
- FRACALANZZA, S.A.P.; SCHEIDEGGER, E.M.D.; SANTOS, P.F.S.; LEITE, P.C. & TEIXEIRA, L.M. **Antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from poultry meat and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz., 102, 853-859, 2007.
- FRANZ, C.M.A.P.; HOLZAPFEL, W.H. & STILES, M.E. ***Enterococci* at the crossroads of safety?** Int. J. Food Microbiol., 47, 1-24, 1999.
- FREES, D. & INGMER, H. **ClpP participates in the degradation of misfolded protein in *Lactococcus lactis*.** Mol. Microbiol., 31, 79-87, 1999.
- FREES, D.; QAZI, S.N.A.; HILL, P.J. & INGMER, H. **Alternative roles of ClpX and ClpP in *Staphylococcus aureus* stress tolerance and virulence.** Mol. Microbiol., 48, 1565-1578, 2003.
- FREES, D.; CHASTANET, A.; QAZI, S.N.A.; SORENSEN, K.; HILL, P.J.; MSADEK, T. & INGMER, H. **Clp ATPases are required for stress tolerance, intracellular replication and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*.** Mol. Microbiol., 54, 1445-1462, 2004.

- FREES, D.; SAVIJOKI, K.; VARMANEN, P. & INGMER, H. **Clp ATPases and ClpP proteolytic complexes regulate vital biological processes in low GC, Gram-positive bacteria.** Mol. Microbiol., 63, 1285-1295, 2007.
- FRÖHLICH, K-U. **An AAA family tree.** J. Cell Sci., 114, 1601- 1602, 2001.
- GAILLOT, O.; PELLEGRINI, E.; BREGENHOLT, S.; NAIR, S. & BERCHE, P. **The ClpP serine-protease is essential for the intracellular parasitism and virulence of *Listeria monocytogenes*.** Mol. Microbiol., 35, 1286-1294, 2000.
- GARSIN, D.A.; SIFRI, C.D.; MYLONAKIS, E.; QIN, X.; SINGH, K.V.; MURRAY, B.E.; CALDERWOOD, S.B. & AUSUBEL, F.M. **A simple model host for identifying Gram-positive virulence factors.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98, 10892-10897, 2001.
- GASPAR, F.; TEIXEIRA, N.; RIGOTTIER-GOIS, L.; MARUJO, P.; NIELSEN-LEROUX, C.; CRESPO, M.T.B.; LOPES, M.F.S. & SERROR, P. **Virulence of *Enterococcus faecalis* dairy strains in an insect model: Role of *fsrB* and *gelE* genes.** Microbiology. 155, 3564 -3571, 2009.
- GERTH, U.; WIPAT, A.; HARWOOD, C.R.; CARTER, N.; EMMERSON, P.T. & HECKER, M. **Sequence and transcriptional analysis of *clpX*, a class-III heat-shock gene of *Bacillus subtilis*.** Gene. 181, 77-83, 1996.
- GERTH, U.; KRÜGER, E.; DERRÉ, I.; MSADEK, T. & HECKER, M. **Stress induction of the *Bacillus subtilis* *clpP* gene encoding a homologue of the proteolytic component of the Clp protease and the involvement of ClpP and ClpX in stress tolerance.** Mol. Microbiol., 28, 787-802, 1998.
- GERTZ, S.; ENGELMANN, S.; SCHMID, R.; ZIEBANDT, A.K.; TISCHER, K.; SCHARF, C; HACKER, J. & HECKER, M. **Characterization of the sigma (B) regulon in *Staphylococcus aureus*.** J. Bacteriol., 182, 6983-6991, 2000.
- GIARD, J. C.; HARTKE, A.; FLAHAUT, S.; BENACHOUR, A.; BOUTIBONNES, P. & AUFFRAY, Y. **Glucose starvation response in *Enterococcus faecalis* JH2-2, survival and proteins analysis.** Res. Microbiol., 148, 27-35, 1997.
- GIARD, J-C.; RINCE, A.; CAPIAUX, H.; AUFFRAY, Y. & HARTKE, A. **Inactivation of the stress- and starvation-inducible *gls24* operon has a pleiotropic effect on cell morphology, stress sensitivity and gene expression in *Enterococcus faecalis*.** J. Bacteriol., 182, 4512-4520, 2000.
- GIARD, J-C.; LAPLACE., J-M. ; RINCÉ, A.; PICHEREAU, V.; BENACHOUR, A.; LEBOEUF, C.; FLAHAUT, S.; AUFFRAY, Y. & HARTKE, A. **The stress proteome of *Enterococcus faecalis*.** Electrophoresis. 22, 2947-2954, 2001.
- GILMORE, M.S. **The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance.** Washington, D.C: American Society for Microbiology Press., 2002.
- GIRAFFA, G. **Enterococci from foods.** FEMS Microbiol. Rev., 26, 163-171, 2002.
- GIRIDHARA UPADHYAYA, P.M.; RAVIKUMAR, K.L. & UMAPATHY, B.L. **Review of virulence factors of *Enterococcus*: an emerging nosocomial pathogen.** Ind. J. Med. Microbiol., 27, 301-305, 2009.
- GOTTESMAN, S. **Proteases and their targets in *Escherichia coli*.** Annu. Rev. Genet., 30, 465–506, 1996.
- GOTTESMAN, S.; WICKNER, S. & MAURIZI, M.R. **Protein quality control: triage by chaperones and proteases.** Genes Rev., 11, 815-823, 1997.

- GRANDVALET, C.; CRECY-LAGARD, V. & MAZODIER, P. **The ClpB ATPase of *Streptomyces albus* G belongs to the HspR heat shock regulon.** Mol. Microbiol., 31, 521-532, 1999.
- GRANT, S. G.; JESSEE, J.; BLOOM, F. R. & HANAHAN, D. **Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87,4645–4649, 1990.
- HECKER, M.; SCHUMANN, W. & VOLKER, U. **Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*.** Mol. Microbiol., 19, 417-428, 1996.
- HENDERSON, B.; ALLAN, E. & COATES, A.R.M. **Stress wars: the direct role of host and bacterial molecular chaperones in bacterial infection.** Infect. Immun., 74, 3693-3706, 2006.
- HEW, C.M.; KORAKLI, M. & VOGEL, R.F. **Expression of virulence-related genes by *Enterococcus faecalis* in response to different environments.** Syst. Appl. Microbiol., 30, 257 – 267, 2007.
- HOGUE, C.W.; ADAM J.; BUCHANAM B. & SEARS S.D. **Enterococcal bacteremia: to treat or not to treat, a reappraisal.** Infect. Dis. Rev., 13, 600-605, 1991.
- HOSKINS, J.R.; PAK, M.; MAURIZI, M.R. & WICKNER, S. **The role of the ClpA chaperone in proteolysis by ClpAP.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 12135-12140, 1998.
- HOSKINS, J.R.; SINGH, A.K.; MAURIZI, M.R. & WICKNER, S. **Protein binding and unfolding by the chaperone ClpA and degradation by the protease ClpAP.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 8892-8897, 2000.
- HOURY, W. A. **Chaperone-assisted protein folding in the cell cytoplasm.** Curr. Protein Pept. Sci., 2, 227-44, 2001.
- HÜBEL, A.; KROBITSCH, S.; HÖRAUF, A. & CLOS, J. ***Leishmania major* HSP100 is required chiefly in the mammalian stage of the parasite.** Mol. Cell Biol., 17, 5987-5995, 1997.
- IKE, Y.; CRAIG, R.A.; WHITE, B.A.; YAGI, Y. & CLEWELL, D.B. **Modification of *S. faecalis* sex pheromones after acquisition of plasmid DNA.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 5369-5373, 1983.
- INGMER, H.; VOGENSEN, F.K.; HAMMER, K. & KILSTRUP, M. **Disruption and analysis of the *clpB*, *clpC*, and *clpE* genes in *Lactococcus lactis*: ClpE, a new Clp family in Gram-positive bacteria.** J. Bacteriol., 181, 2075 –2083, 1999.
- IYER, L.M.; LEIPE, D.D.; KOONIN, E.V. & ARAVIND, L. **Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases.** J. Struct. Biol., 146, 11–31, 2004.
- JANG, H-C.; LEE, S.; SONG, K-H.; JEON, J.H.; PARK, W.B.; PARK, S-W.; KIM, H.B.; KIM, N.J.; KIM, E-C.; OH, M. & CHO, K.W. **Clinical features, risk factors and outcomes of bacteremia due to enterococci with high-level gentamicin resistance: comparison with bacteremia due to enterococci without high-level gentamicin resistance.** J. Korean Med. Sci., 25, 3-8, 2010.
- JOLLY, C. & MORIMOTO R.I. **Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death.** J. Natl. Cancer Inst. 92, 1564-1572, 2000.
- KAITO, C.; AKIMITSU, N.; WATANABE, H. & SEKIMIZU, K. **Silkworm larvae as an animal model of bacterial infection pathogenic to humans.** Microb. Pathog., 32, 183-190, 2002.

- KAJFASZ, J.K.; MARTINEZ, A.R.; RIVERA-RAMOS, I.; ABRANCHES, J.; KOO, H.; QUIVEY, R.G. & LEMOS, J.A. **Role of Clp proteins in expression of virulence properties of *Streptococcus mutans***. J. Bacteriol., 191, 2060-2068, 2009.
- KAK, V.; DONABEDIAN, S.M.; ZERVOS, M.J.; KARIYAMA, R.; KUMON, H. & CHOW, J.W. **Efficacy of ampicillin plus arbekacin in experimental rabbit endocarditis caused by an *Enterococcus faecalis* strain with high-level gentamicin resistance**. Antimicrob. Agents Chemother., 44, 2545-2546, 2002.
- KAVANAGH, K. & REEVES, E.P. **Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens**. FEMS Microbiol. Rev., 28,101–112, 2004.
- KEDZIERSKA, S.; CHESNOKOVA, L.S.; WITT, S.N. & ZOLKIEWSKI, M. **Interactions within the ClpB/DnaK bi-chaperone system from *Escherichia coli***. ABB., 444, 61-65, 2005.
- KIM, Y.I.; LEVCHENKO, I.; FRACZKOWSKA, K.; WOODRUFF, R.V.; SAUER, R.T. & BAKER, T.A. **Molecular determinants of complex formation between Clp/Hsp100 ATPases and the ClpP peptidase**. Nat. Struct. Biol., 8, 230-233, 2001.
- KIRSTEIN, J.; ZÜHLKE, D.; GERTH, U.; TURGAY, K. & HECKER, M. **A tyrosine kinase and its activator control the activity of the CtsR heat shock repressor in *B. subtilis***. EMBO J., 24, 3435–3445, 2005.
- KIRSTEIN, J.; MOLIÈRE, N.; DOUGAN, D.A. & TURGAY, K. **Adapting the machine: adaptor proteins for Hsp100/Clp and AAA+ proteases**. Microbiology, 7, 589-599, 2009.
- KONKEL, M.E & TILLY, K. **Temperature-regulated expression of bacterial virulence genes**. Microbes Infect. 2, 157- 166, 2000.
- KRISTICH, C.J.; CHANDLER, J.R. & DUNNY, G.M. **Development of a host-genotype-independent counterselectable marker and high-frequency conjugative delivery system and their use in genetic analysis of *Enterococcus faecalis***. Plasmid. 57, 131-144, 2007.
- KROH, H.E. & SIMON, L.D. **The ClpP component of Clp protease is the σ^{32} dependent heat shock protein F21.5**. J. Bacteriol., 172, 6026-6034, 1990.
- KRÜGER, E.; VOLKER, U. & HECKER, M. **Stress induction of *clpC* in *Bacillus subtilis* and its involvement in stress tolerance**. J. Bacteriol., 176, 3360-3367, 1994.
- KRÜGER, E. & HECKER, M. **The first gene of the *Bacillus subtilis clpC* operon, *ctsR*, encodes a negative regulator of its own operon and other class III heat shock genes**. J. Bacteriol., 180, 6681-6688, 1998.
- KRÜGER, E.; ZÜHLKE, D.; WITT, E.; LUDWIG, H. & HECKER, M. **Clp-mediated proteolysis in Gram-positive bacteria is autoregulated by the stability of a repressor**. EMBO J., 20, 852–863, 2001.
- KUHL, N. M. **Heat shock effects on cell cycle progression**. Cell Mol. Life Sci., 57, 450-463, 2000.
- KWON, H.Y.; KIM, S.W.; CHOI, M.H.; OGUNNIYI, A.D.; PATON, J.C.; PARK, S.H.; PYO, S.N. & RHEE, D.K. **Effect of heat shock and mutations in ClpL and ClpP on virulence gene expression in *Streptococcus pneumoniae***. Infect. Immun., 71, 3757-3765, 2003.
- KWON, H.Y.; OGUNNIYI, A.D.; CHOI, M.H.; PYO, S.N.; RHEE, D.K. & PATON, J.C. **The ClpP protease of *Streptococcus pneumoniae* modulates virulence gene expression and protects against fatal pneumococcal challenge**. Infect Immun., 72, 5646–5653, 2004.

- LAPORT, M.S.; DE CASTRO, A.C.; VILLARDO, A.; LEMOS, J.A.; BASTOS, M.C.F. & GIAMBIAGI-deMARVAL, M. **Expression of the major heat shock proteins DnaK and GroEL in *Streptococcus pyogenes*: a comparison to *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*.** *Curr. Microbiol.*, 42, 264-268, 2001.
- LAPORT, M.S.; SILVA, M.R.; SILVA, C.C.; BASTOS, M.C.F. & GIAMBIAGI-deMARVAL, M. **Heat-shock response in the nosocomial pathogen *Enterococcus faecium*.** *Curr. Microbiol.*, 46, 313-317, 2003.
- LAPORT, M.S.; LEMOS, J.A.C.; BASTOS, M.C.F.; BURNE, R.A. & GIAMBIAGI-deMARVAL, M. **Transcriptional analysis of the *groE* and *dnaK* heat-shock operons of *Enterococcus faecalis*.** *Res. Microbiol.*, 155, 252-258, 2004.
- LAPORT, M.S.; SANTOS, L.L.; LEMOS, J.A.C.; BASTOS, M.C.F.; BURNE, R.A. & GIAMBIAGI-deMARVAL, M. **Organization of the heat-shock *dnaK* and *groE* operons of the nosocomial pathogen *Enterococcus faecium*.** *Res. Microbiol.*, 157, 162-168, 2006.
- LEBRETON, F.; RIBOULET-BISSON, E.; SERROR, P.; SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; TORELLI, R.; HARTKE, A.; AUFRAY, Y. & GIARD, J.C. ***ace*, which encodes an adhesin in *Enterococcus faecalis*, is regulated by *Ers* and is involved in virulence.** *Infect. Immun.*, 77, 2832-2839, 2009.
- LEENHOUTS, K.; BUIST, G.; BOLHUIS, A.; TEN BERGE, A.; KIEL, J.; MIERAU, I.; DABROWSKA, M.; VENEMA, G. & KOK, J. **A general system for generating unlabelled gene replacements in bacterial chromosomes.** *Mol. Gen. Genet.*, 253, 217-224, 1996.
- LEMOS, J.A.C. & BURNE, R.A. **Regulation and physiological significance of ClpC and ClpP in *Streptococcus mutans*.** *J. Bacteriol.*, 184, 6357-6366, 2002.
- MANDELL, G.L.; DOUGLAS, R.G. & BENNETT, J.E. **Principles and Practice of Infectious Diseases.** Wiley Medic. 4th ed.; Vol. 2; chapters: 173, 176 and 179. 1995.
- MAURIZI, M.R.; CLARK, W.; KIM, S.H. & GOTTESMAN, S. **ClpP represents a unique family of serine-proteases.** *J. Biol. Chem.*, 265, 12546-12552, 1990.
- MIYATA, S.; CASEY, M.; FRANK, D. W.; AUSUBEL, F.M. & DRENKARD, E. **Use of the *Galleria mellonella* caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis.** *Infect. Immun.*, 71, 2404-2413, 2003.
- MOELLERING, R. C. **Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen.** *Clin. Infect. Dis.*, 14, 1173-1176, 1992.
- MOGK, A.; HOMUTH, G.; SCHOLZ, C.; KIM, L.; SCHMID, F.X. & SCHUMANN, W. **The GroE chaperonin machine is a major modulator of the CIRCE heat shock regulon of *Bacillus subtilis*.** *EMBO J.*, 16, 4579-90, 1997.
- MOGK, A.; TOMOYASU, T.; GOLOUBINOFF, P.; RÜDIGER, S.; RÖDER, D.; LANGEN, H. & BUKAU, B. **Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB.** *EMBO J.*, 18, 6934-6949, 1999.
- MORIMOTO, R. I. **Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators.** *Genes Dev.*, 12, 3788-3796, 1998.
- MOTOHASHI, K.; WATANABE, Y.; YOHDA, M. & YOSHIDA, M. **Heat-inactivated proteins are rescued by the DnaK. J-GrpE set and ClpB chaperones.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 7184-7189, 1999.

MSADEK, T.; KUNST, F. & RAPOPORT, G. **MecB of *Bacillus subtilis*, a member of the ClpC ATPase family, is a pleiotropic regulator controlling competence gene expression and growth at high temperature.** Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 13, 5788-5792, 1994.

MSADEK, T.; DARTOIS, V.; KUNST, F.; HERBAUD, M.L.; DENIZOT, F. & RAPOPORT, G. **ClpP of *Bacillus subtilis* is required for competence development, motility, degradative enzyme synthesis, growth at high temperature and sporulation.** Mol. Microbiol., 27, 899-914, 1998.

MURRAY, B. E. **The life and times of the *Enterococcus*.** Clin. Microbiol. Rev., 3, 818-824, 1990.

MURRAY, B.E.; SINGH, K.V.; ROSS, R.P.; HEATH, J.D.; DUNNY, G.M. & WEINSTOCK, G.M. **Generation of restriction map of *Enterococcus faecalis* OG1 and investigation of growth requirements and regions encoding biosynthetic function.** J. Bacteriol., 175, 5216-5223, 1993.

MURRAY, B. E. **Problems and perils of vancomycin resistant enterococci.** J. Infect. Dis., 4, 43-45, 2000.

MURRAY, P. R. *Enterococcus*. In: **Manual of Clinical Microbiology**, 8th ed., MURRAY, P. R., BARON, E. J., JORGENSEN, J. H., PFALLER, M. A.; YOLKEN R. H. Eds. ASM, Washington. p. 422-433. 2003.

MYLONAKIS, E.; MORENO, R.; EL KHOURY, J.B.; IDNURM, A.; HEITMAN, J. & CALDERWOOD, S. B.; AUSUBEL, F.M & DIENER, A. ***Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis.** Infect. Immun., 73, 3842-3850, 2005.

NAIR S.; FREHEL, C.; NGUYEN, L.; ESCUYER, V. & BERCHE, P. **ClpE, a novel member of the HSP100 family, is involved in cell division and virulence of *Listeria monocytogenes*.** Mol. Microbiol., 31, 185-196, 1999.

NAIR, S.; MILOHANIC, E. & BERCHE, P. **ClpC ATPase is required for cell adhesion and invasion of *Listeria monocytogenes*.** Infect. Immun., 68, 7061-7068, 2000.

NALLAPAREDDY, S.R.; SINGH, K.V. & MURRAY, B.E. **Construction of improved temperature-sensitive and mobilizable vectors and their use for constructing mutations in the adhesin-encoding *acm* gene of poorly transformable clinical *Enterococcus faecium* strains.** Appl. Environ. Microbiol., 72, 334-345, 2006.

NARBERHAUS, F. **Negative regulation of bacterial heat shock genes.** Mol. Microbiol., 31, 1-8, 1999.

NEWALD, A.F.; ARAVIND, L.; SPOUNGE, J.L. & KOONIN, E.V. **AAA+: a class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes.** Genome Res., 9, 27-43, 1999.

OLIVEIRA, N. E. M. **Caracterização da família de proteínas Clp/HSP100 e sua participação na formação de biofilme em *Enterococcus faecalis*.** 2006. 97f. Dissertação (mestrado em Microbiologia) – IMPPG, Centro de Ciências e Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

OLIVER, D.R.; BROWN, B.L. & CLEWELL, D.B. **Analysis of plasmid deoxyribonucleic acid in a cariogenic strain of *Streptococcus faecalis*: an approach to identifying genetic determinants on cryptic plasmids.** J Bacteriol., 130, 759-765, 1977.

PARK, S.Y.; KIM, K.M.; LEE, J.H.; SEO, S.J. & LEE, I.H. **Extracellular gelatinase of *Enterococcus faecalis* destroys a defense system in insect hemolymph and human serum.** Infect. Immun., 75, 1861-1869, 2007.

- PORANKIEWICZ, J. & CLARKE, A.K. **Induction of the heat shock protein ClpB affects cold acclimation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC7942.** J. Bacteriol., 179, 5111-5117, 1997.
- PORANKIEWICZ, J.; WANG, J. & CLARKE, A.K. **New insights into the ATP-dependent Clp protease: *Escherichia coli* and beyond.** Mol. Microbiol., 32, 449-58, 1999.
- REEVES, E.P.; MESSINA, C.G.; DOYLE, S. & KAVANAGH, K. **Correlation between gliotoxin production and virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*.** Mycopathologia. 158, 73-79, 2004.
- RIBOULET, E.; VERNEUIL, N.; CARBONA, S.L.; SAUVAGEOT, N., AUFRAY, Y., HARTKE, A. & GIARD, J.C. **Relationships between oxidative stress response and virulence in *Enterococcus faecalis*.** J. Mol. Microbiol. Biotechnol., 13, 140-146, 2007.
- RINCÉ, A.; UGUEN, M.; LE BRETON, Y.; GIARD, J-C.; FLAHAUT, S.; DUFOUR, A. & AUFRAY, Y. **The *Enterococcus faecalis* gene encoding the novel general stress protein Gsp62.** Microbiology, 148, 703-711, 2002.
- RITOSSA, F. **Discovery of the heat shock response.** Cell Stress Chaperones. 1, 97-98, 1996.
- ROBERTSON, G.T.; NG, W.L.; FOLEY, J.; GILMOUR, R. & WINKLER, M.E. **Global transcriptional analysis of *clpP* mutations of type 2 *Streptococcus pneumoniae* and their effects on physiology and virulence.** J. Bacteriol., 184, 3508 – 3520, 2002.
- ROBERTSON, G.T.; NG, W.L.; GILMOUR R. & WINKLER, M.E. **Essentiality of *clpX*, but not *clpP*, *clpL*, *clpC* or *clpE* in *Streptococcus pneumoniae* R6.** J. Bacteriol., 185, 2961-2966, 2003.
- ROUQUETTE, C.; RIPIO, M.T.; PELLEGRINI, E.; BOLLA, J.M.; TASCÓN R.I.; VAZQUEZ-BOLAND, J.A. & BERCHE P. **Identification of ClpC ATPase required for stress tolerance and *in vivo* survival of *Listeria monocytogenes*.** Mol. Microbiol., 21, 977-987, 1996.
- ROUQUETTE, C.; CHASTELLIER, C.; NAIR, S.; BERCHE, P. **The ClpC ATPase of *Listeria monocytogenes* is a general stress protein required for virulence and promoting early bacterial escape from the phagosome of macrophages.** Mol. Microbiol., 27, 1235-1246, 1998.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 3th ed. CSHL Press, New York. 2001.
- SANCHEZ, Y.; PARSELL, D.A.; TAULIEN, J.; VOGEL, J.L.; CRAIG, E.A. & LINDQUIST, S. **Genetic evidence for a functional relationship between HSP 104 and HSP 70.** J. Bacteriol., 175, 6484-6491, 1993.
- SCHIRMER, E.C.; GLOVER, J.R.; SINGER, M.A. & LINDQUIST, S. **HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions.** Trends Biochem. Sci., 21, 289-296, 1996.
- SCHLEIFER, K.H. & KILPPER-BÄLZ, R. **Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium*.** Int. J. Syst. Bacteriol., 34, 31-34, 1984.
- SCHUMANN, W. 2003. **The *Bacillus subtilis* heat shock stimulon.** Cell Stress Chaperones, 8, 207-217, 2003.
- SHINNICK, T. **Heat shock proteins as antigens of bacterial and parasitic pathogens.** Curr. Top. Microbiol. Immunol., 167, 145-160, 1991.
- SIKORA, A. & GRZESIUK, E. **Heat shock response in gastrointestinal tract.** J. Physiol. Pharmacol., 3, 43-62, 2007.

- SIMÃO, R.C.G.; SUSIN, M.F.; ALVAREZ-MARTINEZ, C.E. & GOMES, S.L. **Cells lacking ClpB display a prolonged shutoff phase of the heat shock response in *Caulobacter crescentus*.** Mol. Microbiol., 57, 592–603, 2005.
- SLACK, F.J.; SERROR, P.; JOYCE, E. & SONENSHEIN, A.L. **A gene required for nutritional repression of the *Bacillus subtilis* dipeptide permease operon.** Mol. Microbiol., 15, 689-702, 1995.
- SQUIRES, C.L.; PEDERSON, S.; HOSS, B.M. & SQUIRES, C. **ClpB is the *Escherichia coli* heat shock protein.** J. Bacteriol., 173, 4254-4262, 1991.
- SOOD, S.; MALHOTRA, M.; DAS, B.K. & KAPIL, A. **Enterococcal infections & antimicrobial resistance.** Indian J. Med. Res., 128, 111-121, 2008.
- TISSIÈRES, A.; MITCHELL, H.K. & TRACEY, U.M. **Protein synthesis in salivary glands of *D. melanogaster*: relation to chromosome puffs.** J. Mol. Biol., 84, 380-398, 1974.
- THOMAS, J.G. & BANEYX, F. **Roles of the *Escherichia coli* small heat shock proteins ibpA and ibpB in thermal stress management: comparison with ClpA, ClpB and HtpG in vivo.** J. Bacteriol., 180, 5165-5172, 1998.
- TURNER, A.K.; LOVELL, M.A.; HULME, S.D.; ZHANG-BARBER, L. & BARROW, P. **Identification of *Salmonella typhimurium* genes required for colonization of the chicken alimentary tract and for virulence in newly hatched chicks.** Infec. Immun., 66, 2099–2106, 1998.
- VARMANEN, P., INGMER, H. & VOGENSEN, F.K. ***ctsR* of *Lactococcus lactis* encodes a negative regulator of *clp* gene expression.** Microbiology, 146, 1447-1455, 2000.
- VEBØ, H.C.; SNIPEN, L.; NES, I.F. & BREDE, D.A. **The transcriptome of the nosocomial pathogen *Enterococcus faecalis* V583 reveals adaptive responses to growth in blood.** PLoS One, 4, e7660, 2009.
- WALKER, J.E.; SARASTE, M.; RUNSWICK, S. & GAY, N.S. **Distantly related sequences of the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold.** EMBO J., 1, 945-950, 1982.
- WOJTYRA, U.A.; THIBAUT, G.; TUIITE, A. & HOURY, W.A. **The N-terminal zinc binding domain of ClpX is a dimerization domain that modulates the chaperone function.** J. Biol. Chem., 278, 48981-48990, 2003.
- WOO, K.M.; CHUNG, W.J.; HA, D.B.; GOLDBERG, A.L. & CHUNG, C.H. **Protease Ti from *Escherichia coli* requires ATP hydrolysis for protein breakdown but not for hydrolysis of small peptides.** J. Biol. Chem., 264, 2088-2091, 1989.
- YUAN, L.; RODRIGUES, P.H.; BELANGER, M.; DUNN J.R.W. & PROGULSKE-FOX, A. **The *Porphyomonas gingivalis* *clpB* gene is involved in cellular invasion in vitro and virulence in vivo.** FEMS. Immunol. Med. Microbiol., 51, 388-398, 2007.
- ZEHNDER, M. & GUGGENHEIM, B. **The mysterious appearance of enterococci in filled root canals.** Internat. Endod. J., 42, 277–287, 2009.
- ZOLKIEWSKI, M. **A camel passes through the eye of a needle: protein unfolding activity of Clp ATPases.** Mol Microbiol., 61, 1094–1100, 2006.

ZUBER, U. & SCHUMANN, W. **CIRCE**, a novel heat shock element involved in regulation of the heat shock operon *dnaK* of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol., 176,1359-1363, 1994.

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](#)