

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

Gianluca Gonçalves Nicastro

**Busca por alvos de regulação pelo segundo
mensageiro**

c-diGMP em *Pseudomonas aeruginosa*

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr5890

O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

08/04/2013

GIANLUCCA GONÇALVES NICASTRO

**Busca por alvos de regulação pelo segundo mensageiro
c-diGMP em *Pseudomonas aeruginosa***

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)

Orientador a: Prof^a. Dr^a. Regina Lúcia Baldini

São Paulo

2013

Gianluca Gonçalves Nicastro

Busca por alvos de regulação pelo segundo mensageiro c-diGMP em *Pseudomonas aeruginosa*

Tese apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Doutor em Bioquímica

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

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

AGRADECIMENTOS

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

Aos meus irmãos Luigi e Giovanna, por fazerem parte da minha vida.

A minha namorada Eleonora que sempre, com muito carinho, me apoiou e muitas vezes me suportou durante todos os anos desse trabalho.

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

À Dr^a Regina Baldini, pela grande paciência, dedicação e disponibilidade, durante este trabalho.

Aos amigos do grupo da professora Regina: Ana Paula, Ana Laura, Diogo, Thays e Duílio por trabalharem sempre com alegria e descontração.

A todo o pessoal do Institut National de La Recherche Scientifique, principalmente Dr Éric Déziel e Marie-Christine, pela ótima recepção e apoio durante meus meses de estágio no Instituto.

Ao Msc Gilberto por todas as discussões, apoio técnico e amizade.

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

Ao pessoal do grupo da professora Suely: Gabriela, Juliana, André, César, Karina, Rogério, Christian e Anne pelo bom ambiente de trabalho.

Sandra, Doris, Luci, e Ivanilde pelo trabalho de base além da paciência.

Aos docentes que participaram da minha banca de qualificação, Dr^a Mari Cleide Sogayar, Dr^a Alicia Kowalski e Dr Frederico Gueiros Filho, pelas sugestões.

A todos os docentes do Instituto de Química que compartilharam equipamentos e reagentes que tornaram este trabalho possível.

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

Aos demais amigos e conhecidos do departamento de Bioquímica

À Dr^a Fernanda Manso Prado pelo apoio nos experimentos de HPLC/MS/MS e ao Msc Alexandre Wilson Bisson Filho pelo auxílio nos experimentos de microscopia.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Por fim, a Deus.

Resumo

Recentemente, o bis-(3',5')-di-guanosina monofosfato cíclico (c-di-GMP) surgiu como uma importante molécula sinalizadora nas bactérias. Essa molécula foi identificada como uma das responsáveis pelo controle do comportamento bacteriano e está relacionada com a patogenicidade e a adaptação de diversas bactérias, coordenando a expressão de genes envolvidos com virulência, motilidade e formação de biofilme. O mecanismo pelo qual c-diGMP atua vem sendo motivo de estudo de vários grupos de pesquisa nos últimos anos. Já foi demonstrado o papel dessa molécula em diferentes etapas do controle da expressão gênica. Acredita-se que a manipulação dos níveis de c-di-GMP pode ser uma nova abordagem terapêutica contra bactérias patogênicas.

Pseudomonas aeruginosa é uma proteobactéria do grupo gama, que atua como um patógeno oportunista, causando infecções em pacientes imunocomprometidos, sendo o maior causador de infecções crônicas em pacientes portadores de fibrose cística. O genoma de *P. aeruginosa* PA14 apresenta vários genes que codificam proteínas envolvidas no metabolismo e/ou ligação de c-di-GMP, o que pode indicar um amplo papel regulatório deste nucleotídeo nessa bactéria. Uma associação infundada entre níveis elevados de c-di-GMP e a resistência aos antibióticos é geralmente assumida, já que altos níveis de c-di-GMP levam à formação de biofilme, que é comprovadamente um modo de crescimento mais resistente.

Nesse trabalho, utilizando uma abordagem proteômica, mostramos que *Pseudomonas aeruginosa* PA14 regula a expressão de cinco porinas em resposta a variações nos níveis de c-di-GMP, independentemente dos níveis de mRNA. Uma

dessas porinas, OprD, é responsável pela entrada do antibiótico β -lactâmico imipenem na célula e é menos abundante em condições de alto c-di-GMP. Também demonstramos que linhagens com altos níveis de c-di-GMP apresentam uma vantagem competitiva de crescimento em relação a linhagens com níveis mais baixo de c-di-GMP quando crescidas em meio contendo imipenem. Em contraste, observamos que células planctônicas com elevados níveis c-di-GMP são mais sensíveis a tobramicina. Em conjunto, estes resultados mostram que c-di-GMP pode regular a resistência a antibióticos em sentidos opostos, e independentemente do crescimento em biofilme

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*, c-di-GMP, Porinas de membrana externa, Resistência a antibióticos

Abstract

Following the genomic era, a large number of genes coding for enzymes predicted to synthesize and degrade 3'-5'-cyclic diguanylic acid (c-di-GMP) was found in most bacterial genomes and this dinucleotide emerged as an important intracellular signal molecule controlling bacterial behavior. Diverse molecular mechanisms have been described as targets for c-di-GMP, but several questions remain to be addressed. An association between high c-di-GMP levels and antibiotic resistance is largely assumed, since high c-di-GMP upregulates biofilm formation and the biofilm mode of growth leads to enhanced antibiotic resistance; however, a clear understanding of this correlation is missing.

Pseudomonas aeruginosa is a versatile gamma-proteobacterium that behaves as an opportunistic pathogen to a broad range of hosts. The ability of *P. aeruginosa* to form biofilms contributes to its virulence and adaptation to different environments. The *P. aeruginosa* PA14 genome presents several genes encoding proteins involved in metabolism or binding to c-di-GMP, which may indicate a wide regulatory role of this nucleotide in this bacterium.

Here, using a proteomic approach, we show that *Pseudomonas aeruginosa* PA14 regulates the amount of five porins in response to c-di-GMP levels, irrespective of their mRNA levels. One of these porins is OprD, decreased in high c-di-GMP conditions, which is responsible for the uptake of the β -lactam antibiotic imipenem. We also demonstrate that this difference leads strains with high c-di-GMP to be more resistant to imipenem even when growing as planktonic cells, giving them a competitive advantage over cells with low c-di-GMP. Contrastingly, we found that planktonic cells with high c-di-GMP levels are more sensitive to aminoglycosides

antibiotics. Together, these findings show that c-di-GMP levels can regulate the antibiotic resistance to different drugs in opposite ways and irrespective of a biofilm mode of growth.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, c-di-GMP, Outer membrane porins, Antibiotic resistance.

.LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS: Síndrome da imunodeficiência adquirida	Min: Minutos
ATP: Trifosfato de <i>adenosina</i>	mL: Mililitro
Bcip: 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato	mRNA RNA mensageiro
c-di-GMP: bis (3'5') monofosfato de diguanosina cíclico	MS: Espectrometria de massa
c-AMP: Monofosfato cíclico de adenosina	NBT: <i>nitrobluetetrazolium</i>
cDNA: DNA complementar	Nm: Nanômetros
CFP: Proteína ciano fluorescente	ONPG: Orto-nitrofenol D-galactopiranosídeo
CHAPS: [3-[(3- colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propano sulfonato]	ORFs: <i>Open reading frame</i> (quadro aberto de leitura)
DGC: Diguanilato ciclase	PBS: Solução salina tamponada com fosfato
DNA: Ácido desoxirribonucleico	PCR: Reação de cadeia de polimerase
D.O: Densidade óptica	PDE: fosfodiesterase
DMSO: Dimetilsulfóxido	pGpG: <i>5'- Phosphoguananylyl- (3' → 5')- guanosine</i>
DTT: Ditioneitol	PMSF: <i>phenylmethanesulfonylfluoride</i>
eDNA: DNA extracelular	qRT-PCR: RT-PCR quantitativo
EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético	RCF: <i>Relative centrifugal force</i>
GEMM: do inglês "RNA element occurring in genes for the environment, membranes and motility"	RNA: Ácido ribonucleico
GTP: Guanosina trifosfato	RPM: Rotação por minuto
GMP: Guanosina monofosfato	RT-PCR: <i>reverse transcriptase - polimerase chain reaction</i>
Gm ^r : Gentamicina	SDS: Dodecil sulfato de sódio
HPLC: Cromatografia Líquida de alta eficiência	SDS-PAGE: <i>sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis</i>
HPLC/MS/MS: Cromatografia Líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa	SCV: Variante de colônia pequena
INRS: <i>Institut National De La Recherche Scientifique</i>	Sm: Espectinomomicina
IPTG: Isopropyl_β-D-1-thiogalactopyranoside	SRM: Selected Reaction Monitoring
IS: Elemento de inserção	TBE: tris-borato EDTA
kb: Kilo base	TBS: <i>tris-buffered saline</i>
Km: Canamicina	TBS-T: TBS adicionado de 0,05% de Tween 20
LB: Meio Luria-Bertani	Tc ^r : Tetraciclina
LPS: Lipopolissacarídeo	Tn: <i>Transposon</i>
Mb: Mega Bases	Tris: Tris (hydroxymetil) aminometano
M.I.C : Concentração inibitória mínima	µg: Micrograma
	X-gal: <i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside</i>

Sumário

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
1.2 O segundo mensageiro bis-(3',5')-di-guanosina monofosfato cíclico	17
1.2.1 c-di-GMP em <i>P. aeruginosa</i>	23
1.3 <i>P. aeruginosa</i> PA14, c-di-GMP e a resistência a antibióticos	27
2. OBJETIVOS	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1. Linhagens, plasmídeos e condições de cultivo	30
3.2. Técnicas básicas de Biologia Molecular.	32
3.3 Superexpressão dos genes relacionadas ao metabolismo de c-di-GMP	33
3.4 Integração dos fragmentos clonados no vetor mini-CTX2 no cromossomo de PA14:	34
3.4 Quantificação de c-di-GMP	35
3.5 Ensaio de motilidade	37
3.5.1 “swimming”	37
3.5.2 “swarming”,	37
3.6 Ensaio de iniciação de biofilmes	37
3.7 Construção da biblioteca de superexpressão e triagem dos clones de interesse.	38
3.8 Transcrição reversa e PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)	38
3.9 Análise da expressão gênica através de um gene repórter <i>lacZ</i>	39

3.10 Análise de proteínas totais por géis bidimensionais	40
3.10.1 Extração de proteínas.....	40
3.10.2. Focalização isoeétrica (1º dimensão) e SDS-PAGE (2º dimensão).....	40
3.10.3. Análise de imagem e identificação dos spots.....	41
3.11 Fracionamento de proteínas.....	41
3.11.1 Extração de proteínas de membrana externa.....	42
3.12 Produção do anticorpo anti OprD	43
3.12.1 Clonagem de <i>oprD</i> em vetor de expressão	43
3.12.1 Indução da expressão proteica por IPTG.....	44
3.12.2 Purificação de OprD recombinante	44
3.13.3 Produção de anticorpos em camundongos.....	44
3.12.4 Western blot:	45
3.13 Curvas de resistência a antibióticos	46
3.14 Ensaio de competição	46
3.14.1 Construção das linhagens.....	46
3.14.4 Microscopia de fluorescência.....	46
4 RESULTADOS	48
4.1 Superexpressão dos genes relacionadas ao metabolismo de c-di-GMP	48
4.1.1 Construção das linhagens.....	48
4.1.2 Caracterização fenotípica das linhagens RB210 e RB211.....	48
4.2 Construção e triagem das bibliotecas de fusões de tradução.....	52
4.2.1 Triagem das bibliotecas de transposon	53
4.2.2 Quantificação da atividade de β -galactosidase dos clones que apresentaram diferenças nas duas condições.	56
4.2.3 Caracterização do clone 19E12.	57
4.3. Análise Proteômica	58
4.3.1 Otimização da eletroforese em duas dimensões.	58

4.3.2 Proteínas diferencialmente expressas entre as linhagens RB210 e RB211.....	62
4.4. Perfil de expressão de porinas.....	67
4.4.1 Porinas não são reguladas via c-di-GMP em nível de transcrição.....	68
4.4.2 Validação da variação de OprD pelos níveis de c-di-GMP.....	70
4.4.3 A alteração nos níveis de OprF não influencia o crescimento na ausência de NaCl.	71
4.5 O papel de c-di-GMP na resistência a antibióticos.	72
4.5.1 O β -lactâmico Imipenem.....	72
4.5.2 Sensibilidade ao aminoglicosídeo tobramicina.....	75
4.5.3 Transcrição dos genes envolvidos em resistência a antibióticos.	78
4.6 Busca por proteases envolvidas na regulação de proteínas de membrana externa.....	79
5. DISCUSSÃO.....	83
6. CONCLUSÕES.....	91
7. REFERÊNCIAS.....	92

1. Introdução

1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

O gênero *Pseudomonas* foi primeiramente descrito em 1894 e é um dos gêneros bacterianos mais diversos e estudados (Figura 1) cujas espécies foram isoladas em todos os tipos de ambientes, entre eles: Antártida, amostras clínicas, plantas, animais, água, solo, mar e desertos (Silby, Winstanley et al. 2011). *Pseudomonas aeruginosa* é uma proteobactéria do grupo gama que apresenta grande versatilidade metabólica (Silby, Winstanley et al. 2011) e é capaz de persistir e crescer, mesmo em condições hostis e pobres em nutrientes (Frimmersdorf, Horatzek et al. 2010; Sonnleitner, Valentini et al. 2012). Essa extraordinária capacidade de adaptação requer um grande arsenal regulatório que permite alterações fisiológicas que, em condições de baixa concentração de nutrientes, fornece vantagens distintas para superar concorrentes (Kiewitz and Tummler 2000). Estudos realizados no ano 2000 demonstraram que genoma da linhagem de *P.aeruginosa* PAO1 apresentava o maior número de genes codificadores de proteínas dos sistemas de dois componentes, entre todos os genomas bacterianos sequenciados até a data (Kiewitz and Tummler 2000), (Stover, Pham et al. 2000), o que reforça a ideia de uma alta adaptabilidade desse micro-organismo.

P. aeruginosa vem sendo amplamente estudada devido ao fato dessa bactéria poder atuar como um patógeno oportunista sob diversas circunstâncias. Infecções por *P. aeruginosa* estão geralmente associadas a queimaduras severas, fibrose cística, infecções oculares, AIDS e câncer (Lyczak, Cannon et al. 2000), podendo também estar

presente em infecções hospitalares, devido a sua habilidade de se aderir e contaminar materiais como catéteres, ventiladores e próteses. A infecção por *P. aeruginosa* persiste apesar do uso prolongado de antibióticos (Hoiby 1993; Govan and Deretic 1996) e sua resistência pode ser explicada, em parte, pela presença de bombas de extrusão de drogas em suas membranas e também pelo crescimento em forma de biofilmes (Costerton, Stewart et al. 1999; Singh, Schaefer et al. 2000).

Biofilmes são caracterizados como complexos bacterianos altamente organizados, aderidos a uma superfície biótica ou abiótica (Costerton, Lewandowski et al. 1995). O início da formação de um biofilme ocorre com a adesão celular, seguida da multiplicação e formação de microcolônias e sua estabilização é normalmente acompanhada da produção de exopolissacarídeos. O biofilme maduro de *P. aeruginosa* apresenta uma organização complexa, com estruturas em forma de domo ou cogumelo rodeadas por canais de meio líquido, que permitem a circulação de nutrientes e de metabólitos a serem descartados (Costerton, Stewart et al. 1999). A capacidade de formar biofilmes confere à bactéria inúmeras características, incluindo o aumento da resistência tanto mecânica quanto a agentes desinfetantes e antibióticos (Costerton, Stewart et al. 1999).

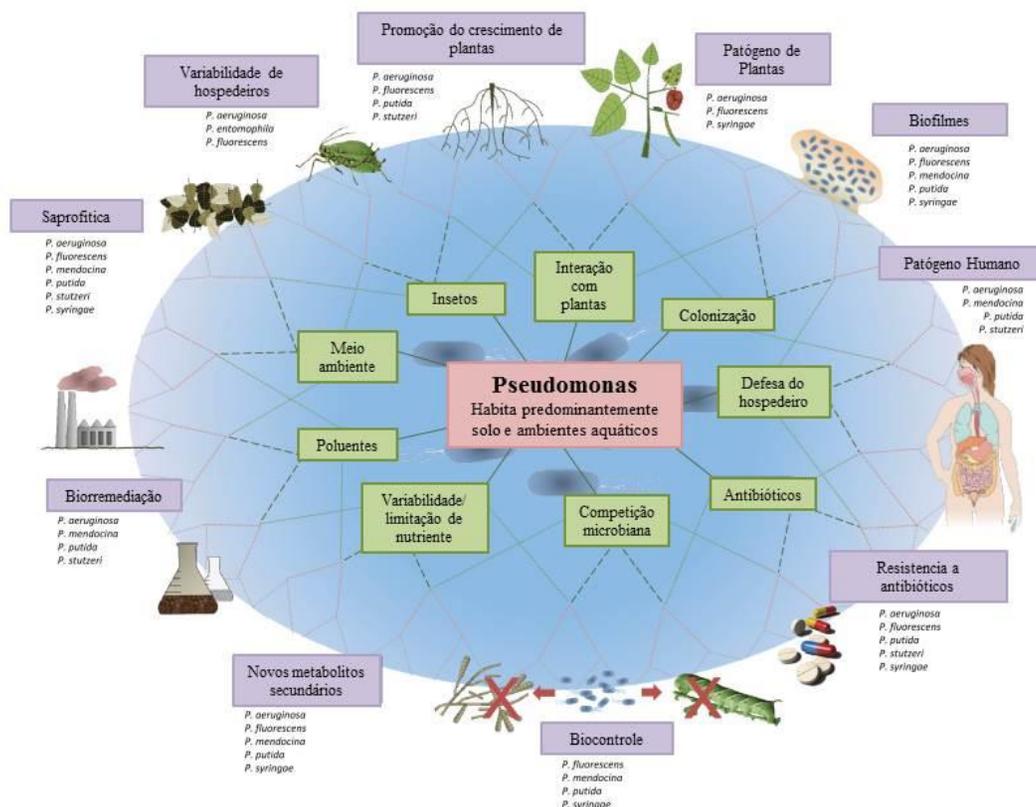


Figura 1 Amplitude ambiental e funcional de *Pseudomonas* spp. O gênero *Pseudomonas* é encontrado em diferentes ambientes e tem sido usado em diversos campos de pesquisa. Adaptado de (Silby, Winstanley et al. 2011).

PAO1 foi a primeira linhagem de *P. aeruginosa* a ter seu genoma completamente sequenciado (Stover, Pham et al. 2000) e apresenta um cromossomo de 6,3 Mb, com cerca de 5,570 ORFs (fases abertas de leitura, do inglês “open reading frames”) das quais grande parte ainda não tem função definida. A maioria das ORFs anotadas tem uma alta relação G+C (66%) característica do genoma. Entretanto, algumas regiões exibem significativa queda na relação G+C, possivelmente indicando uma recente transferência horizontal (Stover, Pham et al. 2000). Apesar de PAO1 ser uma das linhagens mais estudadas, o genoma da linhagem UCBPP-PA14 vem sendo usado

como molde na identificação do “core” do genoma das *Pseudomonas aeruginosa* (Mathee, Narasimhan et al. 2008). O conceito de um "core" do genoma foi usado para descrever as sequências conservadas em *P. aeruginosa*, com o restante dos genes sendo considerados como genoma acessório, que são o conjunto de genes que faltam em uma ou mais linhagens (Mathee, Narasimhan et al. 2008).

A linhagem PA14 é um isolado de queimadura capaz de causar morbidade ou mortalidade em vários hospedeiros filogeneticamente distintos, como invertebrados, camundongos e plantas (Rahme, Stevens et al. 1995). Genes homólogos aos genes envolvidos na patogenicidade de PA14 também estão presentes em outros patógenos de animais e plantas, sendo que em alguns casos o seu envolvimento com esses mecanismos foi comprovado (Cao, Baldini et al. 2001; Tan 2002). O genoma de PA14 consiste de 6,5 Mb e 5973 ORFs e inclui regiões variáveis entre linhagens de *P. aeruginosa* cujos genomas foram sequenciados (Lee, Urbach et al. 2006; Mathee, Narasimhan et al. 2008).

1.2 O segundo mensageiro bis-(3',5')-di-guanosina monofosfato cíclico

O bis-(3',5')-di-guanosina monofosfato cíclico (c-di-GMP, Figura 2) foi inicialmente caracterizado em 1987 por Benziman e colaboradores como um regulador alostérico da celulose sintase em *Gluconoacetobacter xylinus* (Ross, Weinhouse et al. 1987). Após a “era genômica”, onde inúmeros genomas foram sequenciados e proteínas envolvidas no metabolismo de c-di-GMP foram reveladas na maioria dos genomas de bactérias Gram negativas, o c-di-GMP ganhou uma notoriedade e

posteriormente foi caracterizado como um segundo mensageiro celular em bactérias. Já foi demonstrado que baixos níveis de c-di-GMP estão relacionados com mobilidade e virulência de bactérias e, inversamente, altos níveis deste nucleotídeo à adesão e à persistência de comunidades bacterianas multicelulares (Simm, Morr et al. 2004; Romling and Amikam 2006) (Figura 2).

P. aeruginosa apresenta três tipos diferentes de motilidade: “swimming”, “swarming” e “twitching”. O flagelo é responsável tanto pelo “swimming” (motilidade no interior de ambientes aquosos) quanto pelo “swarming” (motilidade na interface entre o meio semi-sólido e ar), sendo que este último também depende da produção de um surfactante pela bactéria. A fímbria tipo IV é responsável pela motilidade em superfícies sólidas denominada “twitching”, que ocorre independentemente do flagelo.

A correlação de altos níveis de c-di-GMP com biofilme e baixos níveis de c-di-GMP com motilidade foi demonstrada com a superexpressão de proteínas com função de ciclase ou fosfodiesterase deste dinucleotídeo nos patógenos *Vibrio cholerae*, *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* e *P. aeruginosa* e uma espécie comensal de *Escherichia coli*, por exemplo (Simm, Morr et al. 2004; Kovacikova, Lin et al. 2005).

O c-di-GMP é sintetizado a partir de GTP por uma classe de enzimas conhecidas como di-guanilato ciclases, que apresentam o domínio GGDEF conservado, e que apenas estão ativas quando formam dímeros. O sítio ativo dessas enzimas (sítio A) é localizado na interface das duas subunidades e o mecanismo catalítico é similar ao de adenilato ciclases e polimerases (Chan, Paul et al. 2004). A maioria das diguanilato ciclases apresenta inibição por seu produto, c-di-GMP, que se liga no sítio I,

bloqueando a função enzimática (Christen, Christen et al. 2006). A reação de hidrólise de c-di-GMP é realizada por fosfodiesterases com os domínios EAL ou HD-GYP, que clivam o c-di-GMP a pGpG ou GMP, respectivamente (Schmidt, Ryjenkov et al. 2005; Ryan, Fouhy et al. 2006). Os nomes dos domínios GGDEF, EAL e HD-GYP fazem alusão aos aminoácidos mais conservados nos sítios ativos das enzimas que os contêm.

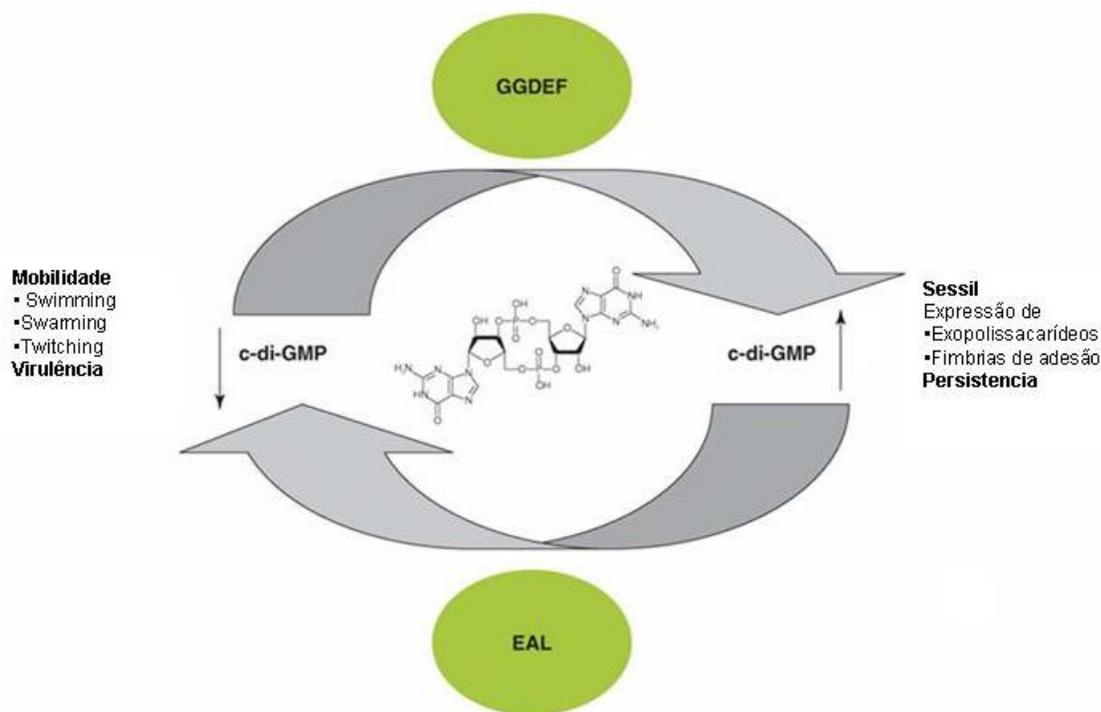


Figura 2. Metabolismo e sinalização por c-di-GMP. Proteínas que apresentam o domínio GGDEF sintetizam c-di-GMP a partir de duas moléculas de GTP. Proteínas com domínios EAL clivam c-di-GMP em pGpG e HD-GYP em duas moléculas de GMP. Altos níveis de c-di-GMP celular promovem o estado sésil da célula, associado ao aumento da produção de componentes extracelulares de adesão como polissacarídeos e fímbrias. Inversamente, baixos níveis de c-di-GMP promovem a motilidade celular (“swimming”, “swarming” e “twitching”) e virulência (Romling and Amikam 2006).

Homólogos das proteínas envolvidas com síntese e degradação de c-di-GMP são encontrados em bactérias, plantas (álamo e mamona) e eucariotos inferiores, tais como hidra, anêmonas do mar, *Dictyostelium* e *Trichoplax*. O número de genes codificando proteínas com domínios GGDEF, EAL e HD-GYP nos genomas bacterianos é muito variável. Algumas espécies não apresentam nenhuma dessas proteínas (*Helicobacter pylori*), a maioria apresenta números intermediários (*E. coli*, 29, *Vibrio cholerae*, 53 e *V. fischeri*, 48) e ainda há outras que codificam aproximadamente cem dessas proteínas (*Vibrio vulnificus*, 101 e *Shewanella oneidensis*, 98) (Wolfe and Visick 2008).

Os domínios GGDEF e EAL são frequentemente encontrados em proteínas de sistemas de dois componentes, fazendo parte, portanto, de redes regulatórias que alteram, percebem e/ou respondem à presença ou concentração de c-di-GMP na célula (Galperin 2006). Para exercer sua função, c-di-GMP tem que se ligar a uma macromolécula efetora, alterando a estrutura e função da mesma. Algumas classes de proteínas efetoras dependentes de c-di-GMP foram descritas (Tabela 1, Figura 3). A primeira e mais estudada classe de efetores é a família PilZ. A análise estrutural demonstrou que a ligação de c-di-GMP ao domínio PilZ faz com que a proteína tenha uma mudança conformacional que a coloca na forma ativa, permitindo sua interação com outras proteínas (Amikam and Galperin 2006; Merighi, Lee et al. 2007).

Outras duas classes de efetores protéicos são exemplificadas pelo fator de transcrição FleQ de *P. aeruginosa*, que na ausência de c-di-GMP está ligado ao promotor de *peIA*, reprimindo a transcrição deste gene (Hickman and Harwood 2008) e

PelD, um regulador de resposta que apresenta um sítio de ligação de c-di-GMP semelhante ao sítio I das diguanilatos ciclases e está envolvido na síntese de polissacarídeo apenas quando ligado a c-di-GMP (Lee, Matewish et al. 2007).

A quarta classe de efetores são proteínas que contêm o domínio GGDEF e são reguladas pelo sítio I, mas não apresentam atividade enzimática. Proteínas que apresentam domínios GGDEF e EAL vinham sendo consideradas, apenas pela sequência primária, como enzimas com atividade de di-guanilato ciclase e fosfodiesterase de c-di-GMP, respectivamente, sem que houvesse confirmação experimental para essas afirmações. Entretanto, recentemente tem se relatado que muitas proteínas que contêm esses domínios não possuem função enzimática e mesmo assim exercem diferentes funções celulares, como a proteína LapD de *P. fluorescens* (Newell, Monds et al. 2009). Nesse exemplo, apesar do domínio GGDEF estar presente, há variação dos aminoácidos mais conservados, levando à perda da função de ciclase. Um outro exemplo é a proteína PopA de *Caulobacter crescentus*. A ligação de c-di-GMP ao sítio I de PopA faz com que esta se ligue e sequestre o regulador global CtrA num dos pólos da célula predivisional, levando a sua degradação por ClpXP (Duerig, Abel et al. 2009).

Além dos efetores proteicos, c-di-GMP pode também se ligar a “riboswitches”. Estes são estruturas secundárias formadas na porção 5' não traduzida de RNAs mensageiros, cuja estabilização ou desestabilização é ditada pela ligação de uma molécula pequena, tendo assim papel na regulação pós-transcricional da expressão gênica. Os “riboswitches” conservados que ligam c-di-GMP foram denominados GEMM

(do inglês “RNA element occurring in genes for the environment, membranes and motility”) e são conservados em diferentes mRNA de bactérias como *V. cholerae* e *Geobacter sulfurreducens* (Sudarsan, Lee et al. 2008). Os “riboswitches” GEMM não foram observados em *Pseudomonas*, o que não exclui a possibilidade de que, nestas bactérias, existam “riboswitches” de c-di-GMP com estruturas distintas, ainda não detectados.

Tabela 1. Efetores que respondem à ligação de c-di-GMP.

Família*	Exemplo	Espécie	Função controlada	Referência
Efetores proteicos				
PilZ(+)	Alg44	<i>P. aeruginosa</i>	Síntese de alginato(+)	(Merighi, Lee et al. 2007)
	BcsA	Bactérias Gram negativas	Síntese de celulose(+)	(Weinhouse, Sapir et al. 1997; Amikam and Galperin 2006)
	DgrA	<i>C. crescentus</i>	Atividade do flagelo(-)	(Christen, Christen et al. 2007)
	PilZ	<i>P. aeruginosa</i>	“Twitching”(-)	(Alm, Boderó et al. 1996)
	Proteínas Plz	<i>Vibrio cholerae</i>	Genes de virulência	(Pratt, Tamayo et al. 2007)
	YcgR	<i>E. coli</i> e <i>Salmonella spp.</i>	Atividade do flagelo(+)	(Ryjenkov, Simm et al. 2006)
FleQ(-)	FleQ	<i>P. aeruginosa</i>	Expressão de flagelo(+)/ Síntese de Pel(-)	(Hickman and Harwood 2008)
PelD(+)	PelE	<i>P. aeruginosa</i>	Síntese de Pel (+)	(Lee, Mawehish et al. 2007)
Efetores do sitio I (+)	PopA	<i>C. crescentus</i>	Progressão no ciclo celular (+)	(Duerig, Abel et al. 2009)
Efetores de RNA				
GEMM(+/-)	Vc1	<i>V. cholerae</i>	Adesão intestinal	(Sudarsan, Lee et al. 2008)
GEMM(+/-)	Vc2	<i>V. cholerae</i>	Formação de biofilme	(Sudarsan, Lee et al. 2008)
GEMM(+/-)	Cd1	<i>Clostridium difficile</i>	Síntese de flagelo	(Sudarsan, Lee et al. 2008)

* (+) ou (-) indicam que o efector é ativado ou reprimido por c-di-GMP, respectivamente.

** (+) ou (-) indicam se a função é positivamente ou negativamente regulada pelo efector.

Adaptado de (Hengge 2009)

Alvos de regulação de c-di-GMP

Regulação Transcricional

Ligação de C-di-GMP a proteínas com domínios de ligação ao DNA .

Regulação pós Transcricional

Ligação de c-di-GMP em riboswitches de mRNA regulando a terminação da transcrição e tradução

Regulação pós Traducional

c-di-GMP pode controlar a atividade enzimática, proteólise e localização de proteínas, quando ligado a proteínas com domínios PilZ, GGDEF ou EAL sem função enzimática

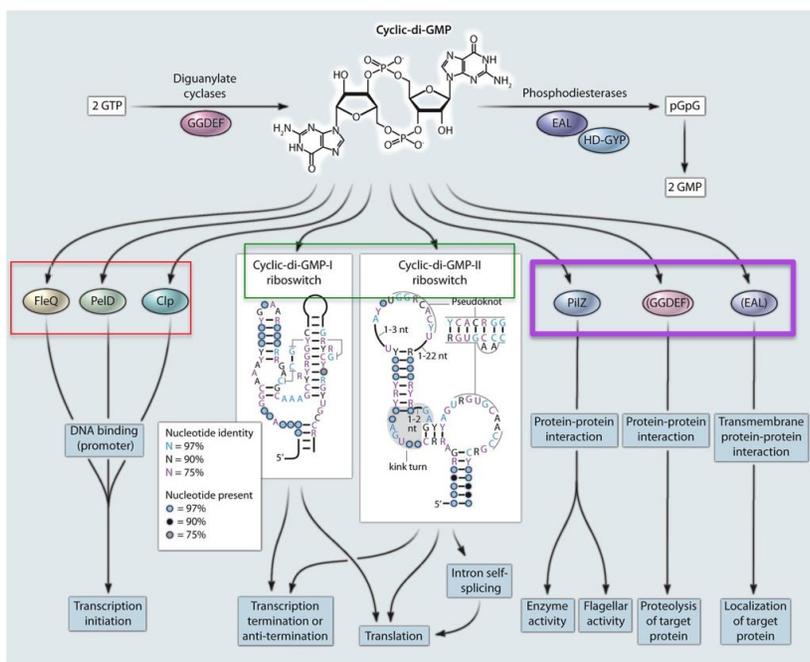


Figura 3. Alvos de regulação de c-di-GMP. Proteínas com domínios GGDEF e EAL/HD-GYP sintetizam ou degradam c-di-GMP respectivamente, controlando os níveis intracelulares desse nucleotídeo que pode atuar em diferentes estágios da regulação gênica (Hengge 2010).

1.2.1 c-di-GMP em *P. aeruginosa*

O genoma de *P. aeruginosa* PA14 contém dezessete genes que codificam proteínas com domínios GGDEF, seis com domínios EAL, dezesseis com ambos os domínios GGDEF e EAL, e três com HD-GYP (Lee, Urbach et al. 2006). A importância clínica e econômica de espécies de *Pseudomonas* faz com que a pesquisa sobre a sinalização por c-di-GMP seja um importante campo de estudos neste modelo. O fato da maioria dos eucariotos superiores não produzirem c-di-GMP permite que as vias das quais ele participa sejam alvos de possíveis fármacos para terapia. Alguns exemplos de efetores já estudados em *P. aeruginosa* estão listados na Tabela 1.

Amostras de *P. aeruginosa* isoladas de pulmões de pacientes com fibrose cística apresentam uma morfologia comum desta bactéria, a variante de colônia pequena (SCV, de “small colony variant”). As células SCV se caracterizam por formarem pequenas colônias agregativas, serem hiperpiliadas e produzirem maior quantidade de exopolissacarídeos, originando assim biofilmes mais compactos, estando associadas à persistência e resistência a antibióticos. Esses fenótipos estão ligados a níveis altos de c-di-GMP intracelular (Drenkard and Ausubel 2002; Meissner, Wild et al. 2007).

A proteína TpbA é uma tirosina fosfatase que regula negativamente a atividade da diguanilato ciclase TpbB. Mutações em *tpbA* levam ao aumento nas concentrações intracelulares de c-di-GMP e, conseqüentemente, a formação de SCV, o que resulta em um aumento de 140 vezes na formação de biofilme (Ueda and Wood 2009). Além disso, foi observado que o mutante *tpbA* apresenta uma menor quantidade de DNA extracelular (eDNA), que faz parte da matriz do biofilme. Mutações em genes que codificam proteínas com atividade de diguanilato ciclase e fosfodiesterase apresentaram aumento e diminuição de eDNA respectivamente, demonstrando o papel dos níveis de c-di-GMP na regulação de eDNA (Ueda and Wood 2009; Ueda and Wood 2010).

Foi proposto que, por meio de estímulos ambientais ainda desconhecidos, proteínas com domínios GGDEF ou EAL seriam ativadas e os níveis de c-di-GMP celulares alterados, levando ao aumento ou diminuição da expressão de fímbrias de adesão, favorecendo ou não o aparecimento de SCV. Como são muitas as proteínas com atividade de síntese e degradação de c-di-GMP na célula, acredita-se que a

concentração local deste mensageiro seja responsável pela ativação ou desativação de mecanismos específicos, pela interação entre essas proteínas e seus alvos. Por outro lado, o “pool” de c-di-GMP intracelular também pode ter um efeito mais generalizado sobre os efetores, como já demonstrado em análise de fenótipos de células com mutações ou superexpressando as enzimas com domínios GGDEF, EAL ou HD-GYP (Kulasakara, Lee et al. 2006; Ryan, Lucey et al. 2009), descritas abaixo.

Linhagens derivadas de *P. aeruginosa* PA14 carregando transposons em cada um dos genes contendo domínios GGDEF, EAL ou GGDEF+EAL foram analisados quanto à habilidade de formar biofilme e de serem citotóxicas para células de mamífero em cultura, características reguladas de maneira oposta (Kulasakara, Lee et al. 2006). Todos os genes mutados cujos produtos contêm domínios GGDEF sozinhos ou em combinação com EAL afetaram a formação de biofilme, enquanto mutações em genes de fosfodiesterase (com domínio EAL apenas) não causaram alteração na formação de biofilmes, com exceção de *pvrR*, cujo mutante por transposon formou um biofilme menos denso.

O gene *pvrR* (“phenotype variant regulator”) foi identificado em PA14 por codificar uma proteína reguladora que controla a conversão de SCV para a morfologia selvagem da bactéria (Drenkard and Ausubel 2002). A atividade de fosfodiesterase de c-di-GMP cíclico da proteína PvrR foi comprovada experimentalmente (Kulasakara, Lee et al. 2006), (Drenkard and Ausubel 2002). As SCV da linhagem 20265 apresentam a expressão da fímbria CupA aumentada em relação às células isoladas de colônias de morfologia selvagem. Nas SCV de 20265, a superexpressão de *pvrR* fez a expressão

de CupA retornar ao nível selvagem e suprimiu o fenótipo SCV (Meissner, Wild et al. 2007). Vale ressaltar que *pvrR* é codificado numa ilha de patogenicidade em PA14, estando ausente da maioria das linhagens cujos genomas foram sequenciados e a presença deste no genoma de 20265 não foi descrita. Assim, não se pode afirmar se o papel de PvrR sobre CupA é específico ou se a alteração na expressão dessas fímbrias se dá por um efeito mais geral de alteração no “pool” de c-di-GMP. Em outro relato, a expressão heteróloga de PvrR em *Xanthomonas campestris* mutante nos genes regulatórios *rfpGHC* suprimiu o fenótipo de ausência de produção de exopolissacarídeos nesses mutantes (Ryan, Fouhy et al. 2006). Portanto, nestes dois casos, a superexpressão de PvrR altera os níveis globais de c-di-GMP e seu alvo específico, se houver, ainda está para ser demonstrado.

Análises do transcriptoma de *P. aeruginosa* e outras bactérias com níveis alterados de c-di-GMP foram realizadas (Hickman, Tifrea et al. 2005; Mendez-Ortiz, Hyodo et al. 2006; Starkey, Hickman et al. 2009), porém estes trabalhos descreveram apenas genes cuja regulação por níveis alterados de c-diGMP se dá em nível de transcrição. Entretanto, existem evidências de que a regulação da expressão gênica por c-diGMP ocorre em níveis pós-transcricionais. Poucos exemplos de genes de *P. aeruginosa* cuja expressão seja regulada pós-transcricionalmente dependente dos níveis de c-diGMP são conhecidos (um exemplo é o sistema LapD/LApG, melhor descrito na seção 4.6), sendo que este trabalho pretendeu expandir o conhecimento neste campo de regulação via c-diGMP nesta bactéria.

1.3 *P. aeruginosa* PA14, c-di-GMP e a resistência a antibióticos

P. aeruginosa é intrinsecamente resistente a inúmeras drogas e isso se deve, principalmente, pela presença de diversas bombas de efluxo na membrana, persistência de formas tolerantes e aquisição de mecanismos de resistência a antibióticos (Van Delden and Iglewski 1998; Westbrock-Wadman S 1999 ; Cao, Baldini et al. 2001; Wolfgang, Kulasekara et al. 2003; Lee, Urbach et al. 2006; Mutlu and Wunderink 2006; Wiehlmann, Munder et al. 2007). Com isso, infecções por esse patógeno são geralmente de difícil tratamento utilizando-se de antibioticoterapias convencionais.

Recentemente, tem se buscado por novas drogas anti-infectivas, em contraponto a drogas bactericidas e bacteriostáticas, supondo-se que essas drogas não causem uma pressão seletiva que leve à aquisição de resistência do patógeno e tendo como alvo a inibição de fatores envolvidos com sua virulência, ao invés da sobrevivência (Lesic, Lepine et al. 2007; Wiehlmann, Munder et al. 2007). Para que essa busca tenha sucesso e novas drogas contra alvos específicos possam ser planejadas racionalmente, os mecanismos responsáveis pela patogenicidade precisam ser entendidos em detalhes. Assim, torna-se cada vez mais relevante a busca por estratégias alternativas de tratamento contra *P. aeruginosa*, com interesse crescente de vários grupos de pesquisa, tanto básica quanto aplicada, na compreensão de seus mecanismos de adaptação e de patogenicidade.

Células em biofilme apresentam uma maior resistência a antibióticos. Normalmente, células nesse estado apresentarem altos níveis de c-di-GMP, o que faz

com que uma associação entre altos níveis de c-di-GMP e resistência a antibióticos seja usualmente assumida. Entretanto, até o momento, poucos trabalhos demonstraram uma relação direta dos níveis desse nucleotídeo com resistência a antibiótico.

No presente trabalho, demonstramos que a expressão de algumas porinas de *P.aeruginosa* varia com os níveis intracelulares de c-di-GMP e isso leva as células com altos níveis de c-di-GMP a serem levemente mais resistentes a imipenem, o suficiente para que tenham uma vantagem competitiva numa população mista. Outro ponto importante foi a observação de que células com baixos níveis de c-di-GMP são mais resistente a tobramicina. O exato mecanismo de como c-di-GMP regula a resistência a antibiótico ainda está por ser desvendado, entretanto possíveis mecanismos foram abordados nesse trabalho.

2. Objetivos

Este trabalho teve como objetivo principal encontrar proteínas de *P. aeruginosa* com regulação dependente da concentração de c-di-GMP intracelular.

Objetivos específicos:

- Obtenção e caracterização de linhagens cujos níveis de c-di-GMP podem ser manipulados.
- Construção de bibliotecas de fusão de tradução nessas linhagens e triagem para encontrar regiões promotoras dependentes dos níveis de c-di-GMP.
- Análises proteômicas entre linhagens com níveis extremos de c-di-GMP e caracterização do papel dos alvos encontrados em relação a resistência a antibióticos.

3 Material e métodos

3.1. Linhagens, plasmídeos e condições de cultivo

As linhagens e plasmídeos utilizados no decorrer desse trabalho estão listados na **Tabela 2**. Culturas de *E. coli* e *P. aeruginosa* foram cultivadas rotineiramente em meio LB a 37°C acrescido de antibióticos, quando necessários, nas seguintes concentrações: ampicilina 100µg/mL, carbenicilina 350µg/mL, canamicina 50µg/mL (*E. coli*) e 250µg/mL (*P. aeruginosa*), gentamicina 10µg/mL (*E. coli*) e 30µg/mL (*P. aeruginosa*) exceto quando a resistência a antibióticos estava sendo avaliada (ver item 4.12).

Tabela 2. Linhagens e plasmídeos.

Linhagens	Características	Fonte ou referência
PA14	Isolado clínico UCBPP-PA14	(Rahme, Stevens et al. 1995)
RB210	PA14 com super expressão induzida por arabinose de PA12_72420	Este trabalho
RB211	PA14 com super expressão induzida por arabinose de <i>pvrR</i>	Este trabalho
PA14_72420::tn	PA14 com mutação por transposon no gene PA14_72420	(Liberati, Urbach et al. 2006)
<i>tpbA::tn</i>	PA14 com mutação por transposon no gene <i>tpbA</i>	(Liberati, Urbach et al. 2006)
<i>prc</i>	PA14 com mutação por transposon no gene <i>prc</i>	(Liberati, Urbach et al. 2006)
PA14_21870	PA14 com mutação por transposon no gene PA14_21870	(Liberati, Urbach et al. 2006)
<i>lapD</i>	PA14 com mutação por transposon no gene <i>lapD</i>	(Liberati, Urbach et al. 2006)
<i>lapG</i>	PA14 com mutação por transposon no gene <i>lapG</i>	(Liberati, Urbach et al. 2006)
RB212	<i>prc</i> com super expressão induzida por arabinose de PA12_72420	Este trabalho
RB213	<i>prc</i> com super expressão induzida por arabinose de <i>pvrR</i>	Este trabalho
RB214	PA14_21870 com super expressão induzida por arabinose de PA12_72420	Este trabalho
RB215	PA14_21870 com super expressão induzida por arabinose de <i>pvrR</i>	Este trabalho
RB216	<i>lapD</i> com super expressão induzida por arabinose de PA12_72420	Este trabalho
RB217	<i>lapD</i> com super expressão induzida por arabinose de <i>pvrR</i>	Este trabalho

Linhasgens	Características	Fonte ou referência
RB218	LapG::tn com super expressão induzida por arabinose de PA12_72420	Este trabalho
RB219	LapG::tn com super expressão induzida por arabinose de <i>pvrR</i>	Este trabalho
PA14 CFP	PA14 mini- Tn7 CFP	Este trabalho
RB210 CFP	RB210 mini- Tn7 CFP	Este trabalho
RB211 CFP	RB211 mini- Tn7 CFP	Este trabalho
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>supE44 lacU169</i> (80 <i>lacZ</i> M15) <i>hsdR17 recA1 endA11 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Invitrogen
S17-1	<i>prothirecA hsdR</i> ($r^- m^+$) $Tp^r Sm^r Km^s$ [Ω RP4-2-Tc::Um-Km::Tn7]	(Simon, Priefer et al. 1983)
BL21(DE3)	F- <i>ompTgaldcmlon hsdS_b(r_b⁻m_b⁺)</i> λ (DE3 [<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>])	(Studier and Moffatt 1986)
Plasmídeos		
pGEM-T easy	Vetor de clonagem para produtos de PCR, Ap ^R	Promega
pProEx HTa	Vetor de expressão. adiciona cauda de poli-histina na posição N-terminal do produto do gene clonado, Ap ^r	Invitrogen
pJN105	Vetor de expressão contendo o promotor araBAB induzível por arabinose e o regulador araC, GmR	(Newman and Fuqua 1999)
Mini-CTX2	Vetor de integração auto proficiente derivado do mini-CTX1, Tc ^R	(Hoang, Karkhoff-Schweizer et al. 1998)
pTNS3	Vetor suicida, expressando a transposase Tn7; usado como helper nas transformações com os vetores derivados do mini-Tn7T	(Choi, Gaynor et al. 2005)
pUC18T-mini-Tn7T-Gm-ecfp	Vetor derivado do mini-Tn7T para marcação de bactérias com a proteína ciano fluorescente	(Choi and Schweizer 2006)
pGGN01	Região codificadora de <i>pvrR</i> clonada no vetor pGEM-T easy	Este Trabalho
pGGN02	Região codificadora de PA14_72420 clonada no vetor pGEM-T easy	Este Trabalho
pGGN03	Região codificadora de <i>pvrR</i> clonada no vetor pJN105	Este Trabalho
pGGN04	Região codificadora de PA14_72420 clonada no vetor pJN105	Este Trabalho
pGGN05	Região codificadora de <i>pvrR</i> sob o controle do promotor pARA clonada no vetor Mini-CTX 2	Este Trabalho
pGGN06	Região codificadora de PA14_72420 sob o controle do promotor pARA clonada no vetor Mini-CTX 2	Este Trabalho
pGGN07	Região codificadora de <i>oprD</i> clonada no vetor pGEM	Este Trabalho
pGGN08	Região codificadora de <i>oprD</i> clonada no vetor pProEx-HTa	Este Trabalho

3.2. Técnicas básicas de Biologia Molecular.

Isolamento de DNA plasmidial, digestão, reações de polimerase em cadeia (PCR), ligações, transformações e outras técnicas básicas de biologia molecular foram realizadas de acordo com metodologia padrão, descritas em manuais de referência (Sambrook, Fritsch et al. 1989; Ausubel, Brent et al. 1996). DNA genômico de *P. aeruginosa* foi isolado pela técnica de Chen e Kuo (Chen and Kuo 1993) e os primers usados estão listados na tabela 3.

Tabela 3. Primers utilizados nesse trabalho

Oligonucleotídeo	Sequência ¹	Utilização
nadB up	CTACCTGGACATCAGCCACA	Normalizador qRT-pcr
nadB low	GGTAATGTTCGATGCCGAAGT	
OpdC-qrt L	ATGAGGGGGAAGCCAAAG	qRT-PCR
OpdC-qrt R	CCTTGTGCCATTCTTG	
oprD-qrt L	GATCAAGCCGAAGCGAAG	qRT-PCR
oprD-qrt R	GGAAGCCTTGGGTCCAGT	
oprE-qrt L	CACCGAGTTCGCTATGG	qRT-PCR
oprE-qrt R	TCCTTGAGGTTCGGTCGAG	
oprF-qrt L	ACAGCGTTCGCAACATGA	qRT-PCR
oprF-qrt R	TAGGTGCCACGAACGTCA	
oprG-qrt L	GAAGACCTCGCCAGCAAC	qRT-PCR
oprG-qrt R	CGTGCTCGTTGAGCATGT	
NdvB-qrt L	TTCCGCCTCAACCAGAAC	qRT-PCR
NdvB-qrt R	CGAATAGGTGCGGATGCT	
MexC LEFT	CCGCTGGTGAAGATCCAG	qRT-PCR
MexC RIGHT	GTGGCGGTATCGAAGTCC	
MexE LEFT	CCGCTGGTGAAGATCCAG	qRT-PCR
MexE RIGHT	GTGGCGGTATCGAAGTCC	
MexG LEFT	CCGCTGGTGAAGATCCAG	qRT-PCR
MexG RIGHT	GTGGCGGTATCGAAGTCC	
MexA LEFT	CCGCTGGTGAAGATCCAG	qRT-PCR
MexA RIGHT	GTGGCGGTATCGAAGTCC	
Mex PA14_18760 LEFT	CCGCTGGTGAAGATCCAG	qRT-PCR

Mex PA14_18760 RIGHT	GTGGCGGTATCGAAGTCC	
AmpC LEFT	CCGCTGGTGAAGATCCAG	qRT-PCR
AmpC RIGHT	GTGGCGGTATCGAAGTCC	
TpX qrt L	AAGCGCAAGGTGCTGAAC	qRT-PCR
TpX qrt R	ATGCACAGCACCACGGTA	
FliC qrt L	GCAACAGGCCGAACTGAC	qRT-PCR
FliC qrt R	GGTCTCGTAGGCGTTGGA	
PrE 37 RIGHT	AGC AGGCCT TGGGGATACTGCGTTAAACA	Amplificação de <i>pvrR</i>
PrE 37 LEFT	ACG GAATTCT CGATGAGCTGGAAATCCTATC	
72420up	GAATTC GGGGATGCCGGGAGT	Amplificação de PA14_72420
72420down	ACTAGT CGAGGGTGAGGAAGAGCA	
OprD exp L	GAATTC TCA CTG CGG CAC TGT GAT	Expressão de OprD
OprD exp R	AAGCTT CCTTTATAGGCGCGTTGC	
CEKG2A	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNNAGAG	Sequenciamento de mutantes da biblioteca
CEKG2B	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNNACGC	
CEKG2C	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNNGATAT	
lacZ-211	TGCGGGCCTCTTCGCTATTA	
lacZ-148	GGGTAACGCCAGGGTTTTCC	
lacZ-124L	CAGTCACGACGTTGTAAAACGACC	
Pser-up	CGAGTGGTTTTAAGGCAACGGTCTTGA	Confirmar integração sítio mini CTX
Pser-down	AGTTCGGCCTGGTGGAAACAACCTCG	

¹Os sítios de restrição inseridos nos produtos de PCR estão destacados em negrito.

3.3 Superexpressão dos genes relacionadas ao metabolismo de c-di-GMP

Oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados com sítios de restrição específicos e capazes de se parear com as extremidades da região codificadora de *pvrR* (EAL) e *PA14_72420* (GGDEF) (Tabela 3). Uma PCR foi realizada utilizando a High Fidelity Taq DNA Polimerase (Fermentas) e os produtos de reações foram analisados por eletroforese em gel de agarose, purificados com o kit Amicon Microcon PCR (Millipore) e ligados no vetor de clonagem pGEM-T (Promega). O produto dessa

ligação foi transferido por eletroporação para células de *E. coli* DH5 α eletrocompetentes, de onde os plasmídeos contendo os insertos de interesse foram extraídos, analisados por restrição e submetidos a reações de sequenciamento para confirmação

Após essa etapa, o inserto foi excisado do pGEM-T com as enzimas de restrição apropriadas, cujos sítios foram adicionados aos oligonucleotídeos e fizeram parte de uma reação de ligação com a T4 DNA polimerase e o vetor pJN105 (vetor de expressão indutível por arabinose, Gentamicina Resistente (Newman and Fuqua 1999)), previamente digerido com as mesmas enzimas. A região contendo o promotor indutível por arabinose e parte da porção codificadora de *PA14_72420* ou *pvrR* foi digerida com as enzimas KpnI e SpeI, clonada no vetor mini-CTX2 e transferidas por eletroporação para *E. coli* S17-1.

3.4 Integração dos fragmentos clonados no vetor mini-CTX2 no cromossomo de PA14:

Após o crescimento em meio sólido da linhagem receptora PA14 e da doadora S17-1, portadora das construções, a conjugação foi realizada, misturando-se as bactérias doadoras e receptoras no centro de uma placa contendo meio LB, incubada em estufa 37°C durante a noite. No dia seguinte, os transconjugantes, ou seja, somente as células de *Pseudomonas* que tiveram a cópia integrada no cromossomo, foram selecionadas em meio contendo LB+tetraciclina+ácido nalidíxico, para contra-selecionar S17-1. A integração foi confirmada por PCR.

A excisão mediada por Flp recombinase foi realizada para a retirada de

sequências não desejadas do mini-CTX2, como o gene de resistência a tetraciclina, que poderiam interferir nos ensaios futuros. Para isso, linhagens contendo a integração no sítio mini-CTX foram conjugadas com células de *E.coli* S17-1 portadora do plasmídeo pFLP2. Esse plasmídeo expressa a recombinase responsável pela excisão específica do mini-CTX2, mantendo apenas a região de interesse, e pode ser facilmente curado através da indução do gene *sacB* pela adição de sacarose no meio de cultura, após confirmação da sensibilidade a tetraciclina.

3.5 Quantificação de c-di-GMP

O isolamento e detecção de c-di-GMP foi realizado como descrito por Simm (Simm, Morr et al. 2004). Resumidamente, bactérias foram crescidas por 24 horas em 20 mL de LB, coletadas por centrifugação e suspensas em 300 µL de água e fervidas por 10 minutos. Os nucleotídeos foram extraídos com 1 mL de etanol 70% por duas vezes e liofilizados, sendo posteriormente suspensos em 300 µL de água milli Q.

A análise de c-di-GMP foi realizada no laboratório do Dr. Paolo di Mascio (IQ-USP), com o auxílio da Dra Fernanda Manso Prado, utilizando um protocolo pré estabelecido (Andrade 2011), através de cromatografia líquida de alta performance acoplada a espectrometria de massas em tandem (HPLC/MS/MS). O sistema HPLC/MS/MS é constituído de (i) um HPLC (Shimadzu) composto de duas bombas (LC-10ADvp), um detector UV-Vis (SPD-10AVvp), um injetor-automático (SIL-10ADvp), uma válvula (FCV-12AH), um controlador de sistema (SCL-10Avp) e (ii) um espectrômetro de massas Quattro II, modelo triplo quadrupolo (Micromass).

As amostras foram separadas em uma coluna cromatográfica Gemini C-18 Phenomenex (250 × 4,6 mm, 5 µm de tamanho de partícula). A fase móvel foi formiato de amônio 25 mM pH 7 (A) e metanol (B) com fluxo de 0,6 ml/min. Os componentes foram eluídos através de um gradiente linear de 2-47% de B por 15 min, 47-78% de B em 5 min, 78% de B até 30 min, 78-2% de B em 2 min e 2% de B até 45 min. Uma válvula (FCV-12AH, Shimadzu) foi usada com o objetivo de direcionar o fluxo da coluna cromatográfica para o espectrômetro de massas em determinado período da análise (10-16 min). Uma terceira bomba de HPLC (LC-AD, Shimadzu) também foi usada com o objetivo de bombear eluente para o espectrômetro de massas nos períodos de 0-9,9 min e 16,1-45 min com fluxo de 0,05ml/min (eluentes: água e metanol (1:1, v/v)).

A detecção de c-di-GMP por HPLC-MS/MS foi realizada utilizando uma fonte de ionização electrospray no modo negativo (ESI-). A quantificação de c-di-GMP por HPLC/MS/MS foi realizada no modo de detecção SRM (Selected Reaction Monitoring), utilizando c-AMP como padrão interno e uma curva padrão de c-di-GMP. No modo SRM, foram monitoradas as fragmentações específicas (transições de massa específicas) de c-diGMP (m/z 689 para 150) e c-AMP (m/z 328 para 134). As condições do espectrômetro de massas usadas foram voltagem do capilar: 3,5 kV, voltagem do cone de amostragem: 50 V (c-di-GMP), voltagem do cone de amostragem: 30 V (c-AMP), voltagem do cone extrator: 10 V, temperatura da fonte: 100 °C, temperatura de dessolvatação: 200 °C, energia de colisão: 45 eV (c-di-GMP) e energia de colisão: 50 eV (c-AMP).

3.6 Ensaios de motilidade

Os ensaios de motilidade foram realizados como descritos (Déziel, Comeau et al. 2001; Tremblay and Déziel 2008).

3.6.1 “swimming”

Placas com meio T contendo agar 0,3% foram inoculadas na superfície, com 5 μ L de uma cultura D.O600= 3 e em seguida incubadas por 16 horas a 30°C no interior de sacos plásticos. A motilidade foi analisada através da formação de um halo circular, formado pela migração celular.

3.6.2 “swarming”,

Células foram inoculadas em placas contendo meio M9 modificado com agar 0,3% com 5 μ L de uma cultura no final da fase de crescimento exponencial (DO600=3). As placas foram incubadas por 16 horas a 30°C no interior de sacos plásticos. A motilidade foi analisada através da análise da migração celular.

3.7 Ensaios de iniciação de biofilmes

Culturas em fase estacionária foram diluídas em meio LB a uma $DO_{600} = 0,01$ e os tubos incubados a 30°C por 18 horas, sem agitação. O meio foi então descartado, os tubos lavados com jatos de água para remover as células não aderidas, e o biofilme corado por uma solução de cristal violeta 1% por 5 minutos à temperatura ambiente. O corante foi descartado e os tubos lavados vigorosamente com água. As células foram lisadas e o corante solubilizado em DMSO. A solução foi coletada e teve sua absorbância medida a 530 nm, sendo esta medida proporcional a biomassa.

3.8 Construção da biblioteca de superexpressão e triagem dos clones de interesse.

A construção da biblioteca foi realizada através da conjugação das linhagens receptoras RB210 e RB211 com a linhagem doadora de *E. coli* SM10pir/pIT2. Resumidamente, 100 µl de cultura em fase estacionária de cada uma das linhagens (receptora/doadora) foram colocadas em 600 µl de LB pré aquecido à 37°C, centrifugadas por 3 minutos a 7000 g, em seguida o sobrenadante foi descartado e as células lavadas mais duas vezes sob as mesmas condições. Após as lavagens, as células foram suspensas em 50 µL de LB e incubadas a 37 °C sobre um filtro de 0,22 µm colocado numa placa de LB-agar, por 6 horas. Após esse período, o filtro foi imerso em 2 mL de LB e agitado para a recuperação das células, das quais os transconjugantes foram selecionados em placas LB contendo tetraciclina (100 µg/mL), ácido nalidíxico (20 µg/mL), para contra seleção da linhagem doadora, e 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (X-gal) (40 µg/mL) para detecção da atividade da β-galactosidase. As colônias isoladas dos transconjugantes, que apresentaram coloração azul, foram arranjadas em placas de 96 poços para estoque a -80°C e repicadas em placas contendo ou não arabinose. Foram selecionados os clones que apresentarem diferença na coloração azul na presença de arabinose e na ausência deste indutor.

3.9 Transcrição reversa e PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

Foram realizadas análises de expressão de genes através de RT-PCR quantitativo, que permitem estimar a quantidade de mRNA de um determinado gene

nas células em relação a um gene normalizador, cuja expressão não varia nas condições de ensaio. O RNA total das células foram extraído com o reagente Trizol (Invitrogen), tratado com DNase I (RQ-DNase I, Promega), conforme as instruções do fabricante. O RNA extraído foi utilizado como molde para a síntese de cDNA com a enzima Superscript III (Invitrogen) ou Improm II (Promega) e primers aleatórios. O cDNA será então amplificado com SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e oligonucleotídeos específicos (1,6 pmoles de cada, num volume final de 20 µl; Tabela 3) no equipamento 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando o seguinte programa: 60°C 2 minutos; 95°C 10 minutos e 40 ciclos de 95°C 15 segundos; 60 °C 1 minuto. As taxas de expressão relativas foi calculadas de acordo com o método de $2^{\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen 2001), utilizando *nadB* como um padrão de referência.

3.10 Análise da expressão gênica através de um gene repórter *lacZ*

Ensaio de atividade de β-galactosidase foram realizados com os clones que apresentaram diferenças na coloração azul durante a triagem.

Culturas foram incubadas 12-16 horas a 37° C, sob agitação (200 rpm), diluídas para $DO_{600nm} = 0,1$ e novamente incubadas até atingirem $DO_{600nm} = 1$. Em seguida, foram coletados 100 µL da cultura e adicionados 800 µL de tampão Z (Na_2HPO_4 8,51g/L, NaH_2PO_4 6,25g/L, KCl 0,75 g/L, $MgSO_4$ 0.25 g/L , β-mercaptoetanol 2,7 mL/L). As células foram rompidas com a adição de 50 µL de SDS 0,1% e 50 µL de clorofórmio e incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida foram adicionados 200 µL de orto-nitrofenol D-galactopiranosídeo (ONPG) (4 mg/mL). Após o aparecimento da

coloração amarela, foram adicionados 400 μL de Na_2CO_3 1M para parar a reação, os tubos foram então centrifugados a 13000 g por 3 min à temperatura ambiente. A $\text{DO}_{420\text{nm}}$ da fase aquosa foi medida em espectrofotômetro. Os níveis de expressão foram calculados em unidades Miller (U) de acordo com a equação : “U = (1000 x $\text{DO}_{420\text{nm}}$) / (tempo da reação em minutos x volume de cultura usado no ensaio em mL x $\text{DO}_{600\text{nm}}$).

3.11 Análise de proteínas totais por géis bidimensionais

3.11.1 Extração de proteínas.

Para a obtenção dos extratos proteicos totais, as culturas bacterianas foram crescidas até $\text{DO}_{600\text{nm}}=1$, as células foram separadas do sobrenadante por centrifugação a 7000 g por 10 minutos a 4 °C, lavadas duas vezes com Tris-HCl pH 8 (primeiramente 100mM e depois 10mM) e suspensas em um tampão de lise (8M ureia, 2M tiourea, 2% CHAPS[3-[(3- colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propano sulfonato], 40mM DTT [Ditiotreitol] e 2% pharmalyte 3-10). As células foram rompidas por sonicação em banho de gelo, no Branson Sonifier 450 e o lisado foi centrifugado 40 minutos a 12000 g a 4°C por duas vezes, para separar a fração solúvel dos restos celulares. A determinação da concentração proteica foi realizada através do reagente de Bradford (Sigma), utilizando o protocolo do fabricante e uma curva-padrão construída com soluções de albumina.

3.11.2. Focalização isoeétrica (1º dimensão) e SDS-PAGE (2º dimensão)

Amostras de proteínas (350 μg) foram ajustadas em 350 μL de tampão de

solubilização (8M ureia, 2M tiourea, 2% CHAPS, 40mM DTT, 2% pharmalyte 3-10 e 10% glicerol), centrifugadas por 10 minutos a 12000 g e aplicadas sobre tiras de gel (Immobiline dry strips GE Healthcare) com gradiente de pH imobilizado não linear, variando de 3 a 10, e incubadas por 16 horas. A focalização isoeétrica foi realizada no IPGphor III em um gradiente de voltagem: aumento linear de 0 para 500 V por 500V/h, seguido de um aumento para 1000 V por 1000 V/h, e uma fase final de 8000 V por 32000 V/h. Após a focalização, as fitas foram equilibradas por 15 minutos em solução de equilíbrio A (6 M ureia, 29,3% glicerol, 2% SDS, 65 mM DTT) e mais 15 minutos em solução de equilíbrio B (6 M ureia, 29,3% glicerol, 2% SDS, 135 mM iodoacetamida). Após essas etapas, a segunda corrida foi realizada em géis de 12,5% poliacrilamida com corrente de aproximadamente 2 W por gel, por 16 horas. Os géis foram fixados por uma hora (40% etanol 10% ácido acético), corados por 16 horas com azul de Coomassie coloidal e descorados por 16 horas em água.

3.11.3. Análise de imagem e identificação dos spots.

Os géis foram analisados pelo software Delta 2D (Decodon). As comparações foram feitas em triplicatas biológicas, comparando a linhagem de interesse com a linhagem selvagem. A identificação das proteínas diferencialmente expressas foram realizadas no serviço do Institut Armand-Frappier, INRS (Institut National de la Recherche Scientifique), Canadá, por HPLC/MS/MS.

3.12 Fracionamento de proteínas

Culturas em 50ml de LB foram incubadas sob agitação a 37°C até alcançarem uma $D_{600} = 1$. As células foram coletadas por centrifugação a 7000 rpm por 10 minutos

em rotor SS34 (Sorvall), suspensas e congeladas por 16 horas em 20 ml de tampão 10 mM Tris pH 8.0, 20% sacarose e 50 µg/ml DNase I. Em seguida, as células foram lisadas por duas vezes em French press a 15,000 psi e o fracionamento proteico foi realizado por ultracentrifugação a 40000 rpm em rotor SW 41 (Beckman Coulter) a 4°C por 4 horas em um gradiente de sacarose (4ml sacarose 70%, 4mL de sacarose 60% e 4mL da do lisado em sacarose 20%). As proteínas de membrana externa se localizaram entre o gradiente de 60% e 70%, enquanto as proteínas de membrana interna se localizaram entre 20% e 60% de sacarose. As frações de interesse foram então cuidadosamente retiradas e diluídas para uma concentração de sacarose menor do que 20%, ultra centrifugada 1 hora a 47000 rpm (rotor SW 60 Ti, Beckman Coulter). O sobrenadante foi descartado e as proteínas suspensas e separadas em géis de poliacrilamida 12%.

3.12.1 Extração de proteínas de membrana externa

Culturas em 3 mL de LB foram incubadas a 37°C sob agitação até atingir a D.O₆₀₀ desejada. As células foram coletadas por centrifugação, lavadas duas vezes com 1mL de PBS e suspensas em 750 µL de PBS. A lise celular foi realizada através de 3 pulsos de 30 segundos no sonicador. Após a lise celular 750 µL de N-lauril-sarcosil 4% foi adicionado e o extrato celular foi incubado por 1 hora a temperatura ambiente. Uma centrifugação de 10 minutos a 12000 g foi realizada para retirada de restos celulares e células não lisadas. O sobrenadante foi então ultracentrifugado a 40000 rpm (rotor SW 60 Ti, Beckman Coulter) por 1 hora a 4°C, o sobrenadante foi então descartado e o pellet proteico suspenso e analisado em géis de poliacilamida 12%.

3.13 Produção do anticorpo anti OprD

3.13.1 Clonagem de *oprD* em vetor de expressão

Uma PCR foi realizada com a enzima Taq DNA Polimerase (FERMENTAS), a fim de amplificar a região codificadora do gene *oprD* (1,458 kb) a partir do DNA genômico purificado de PA14, usando o programa 95°C/5min; 95°C/30s; 53,7°C/30s; 72°C/1min30s e 72°C/10min. O tamanho do produto do PCR foi verificado por eletroforese em gel de agarose. Após purificação com o kit NucleoSpin Extract II, o produto foi ligado ao vetor pGEM-T (PROMEGA), conforme as instruções do fabricante. A mistura de ligação foi transferida por eletroporação em células competentes (DH5 α). A seleção das colônias com o plasmídeo recombinante foi feita pela coloração branca em placa de LB contendo ampicilina (100 ug/mL) e 40 μ L de X-Gal 40 μ g/mL (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo).

O vetor com o fragmento (pGEM-*oprD*), assim como os vetores de expressão pPROEX-HTa e pET-28a, foram submetidos a tratamento com EcoRI e HindIII (FastDigest, Fermentas), separados por eletroforese em gel de agarose e, em seguida, o vetor de expressão linear e o fragmento correspondente a *oprD* foram purificados e ligados, sendo a mistura de ligação transferida para DH5 α por eletroporação. Dez colônias foram escolhidas ao acaso e tiveram o DNA plasmidial extraído, digerido com EcoRI e HindIII e analisado por eletroforese em gel de agarose. Após confirmação das clonagens, os plasmídeos foram obtidos por lise alcalina e inseridos em *E. coli* C43 por choque térmico.

3.13.2 Indução da expressão proteica por IPTG

Culturas inoculadas foram incubadas durante a noite a 200 rpm e 37°C. A densidade óptica (D.O) foi ajustada para 0,1 em 50 mL de meio LB contendo ampicilina e as culturas incubadas a 200 rpm, 37°C. Após 1h30min de crescimento, uma alíquota de 1mL foi retirada e IPTG foi adicionado ao restante de cada cultura para a concentração final de 0,6 mM. As culturas foram incubadas a 225 rpm por 3 horas e alíquotas foram separadas novamente. As alíquotas e as culturas foram centrifugadas a 12.000 g e as células das últimas foram congeladas a -20°C.

Aos pellets obtidos das alíquotas, foram adicionados 50 µL de solução O 2x (Tris-Base, SDS 10%, DTT, glicerol, azul de bromofenol 1% e H₂O Milli Q) e 50 µL de água. As alíquotas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE).

3.13.3 Purificação de OprD recombinante

A purificação da proteína de membrana externa foi realizada como o indicado no protocolo da Invitrogen, utilizando-se cromatografia de afinidade em coluna de níquel.

3.13.4 Produção de anticorpos em camundongos

100 µg da proteína recombinante OprD-His combinada com adjuvante de Freund (Sigma) foram inoculados no peritônio de três camundongos. A primeira sangria, realizada por uma incisão no término do rabo, foi realizada 14 dias após a inoculação

inicial de proteína, assim como a aplicação de uma segunda dose da proteína recombinante combinada com adjuvante incompleto. Sete dias após a segunda aplicação, uma segunda sangria foi realizada e o procedimento repetiu-se por mais uma semana, até a sangria final. Os protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética em Cuidados e Uso Animal (CECUA) do IQ-USP.

3.13.5 Western blot:

As proteínas totais das linhagens PA14, RB210, RB211, *PA14_72420::tn*, *tpbA::tn* e *oprD::tn* foram extraídas pelo método descrito na seção 3.11.1. A eletroforese foi efetuada por 50 min a 100V utilizando 10µg do extrato proteico de cada linhagem em gel de poliacrilamida 12%. Para normalizar a concentração de proteínas em cada canaleta, soro anti-Rnase HI (produzido em coelho) foi utilizado (Meireles 2011); é sabido que os níveis desta proteína não variam nas condições de ensaio. A transferência para membrana de nitrocelulose foi realizada em um transferidor eletroforético semi-seco (Amersham Biosciences, TE 77XP) por 1 hora, em voltagem de 1V por cm² da membrana. A membrana foi bloqueada em TBS (10mM Tris-HCl pH 8, 150mM NaCl) contendo 5% de leite em pó por, pelo menos, 1 hora. O soro anti-OprD foi adicionado na proporção de 1:10000 em TBS e a membrana incubada por 12 horas. Após duas lavagens com TBS-T (TBS contendo 0,05% Tween 20) por 5 min, a membrana foi lavada com TBS e anticorpos secundários IgG conjugado com fluorófilos (Cye 3 para anti-mouse e Cye 5, anti-rabbit), ECL Plex Western Blotting kit GE Life Sciences, na proporção de 1:2500 de cada conjugado e incubado por 1h. Após uma segunda lavagem, os fluoróforos presentes na membrana foram visualizados com o

auxílio do digitalizador Typhoon utilizando laser verde (532 nm) e filtro 580 BP 30 Cy3 TAMRA, para detecção do anticorpo conjugado com Cy3, e laser vermelho (633nm) e filtro 670 BP 30 para detecção de Cy5. A normalização das bandas de OprD foi feita pela comparação com a banda de Rnase HI, cuja quantidade não varia nas condições do ensaio.

3.14 Curvas de resistência a antibióticos

Culturas inoculadas foram incubadas durante a noite a 200 rpm e 37°C. A densidade óptica (D.O) foi ajustada para 0,1 em 3 mL de meio até atingirem uma $D.O_{600} = 1$, as células foram então diluídas para $D.O_{600} = 0,05$ em meio Mueller Hinton contendo o antibiótico a ser testado em diferentes concentrações. Em seguida, as células foram incubadas no aparelho Bioscreen a 37°C com agitação orbital mediana por 24 horas. Durante todo o tempo de incubação foram realizadas leituras de $D.O_{600}$ a cada 30 minutos.

3.15 Ensaio de competição

3.15.1 Construção das linhagens

As linhagens RB210*cfp* e RB211*cfp* foram construídas através da eletroporação do plasmídeo pUC18T-mini-Tn7T-Gm-ecfp, seguida da seleção por gentamicina. A resistência a gentamicina foi retirada através da conjugação do plasmídeo pFLP2 para promover a recombinação sítio específica que resulta na excisão das sequências plasmidiais indesejáveis.

3.15.2 Microscopia de fluorescência

Culturas isoladas foram incubadas durante a noite a 200 rpm e 37°C. A densidade óptica (D.O) foi ajustada para 0,1 em 3 mL de meio até atingirem uma $D.O_{600} = 1$, as células a serem analisadas a competição foram então diluídas para $D.O_{600} = 0,025$ cada e misturadas em meio Mueller Hinton contendo o antibiótico a ser testado. Em seguida as células foram incubadas a 37°C a 200 rpm por 16 horas.

A microscopia foi realizada com o auxílio do MSc Alexandre Bisson em um microscópio Nikon Eclipse TiE, com filtros para CFP(CFP BrightLine Filter Set). As imagens foram capturadas com uma câmera Andor EMCCD I-Xon e analisadas com os programas Nikon NIS Elements (versão 3.07) e ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

4 Resultados

4.1 Superexpressão dos genes relacionadas ao metabolismo de c-di-GMP

4.1.1 Construção das linhagens

Com o objetivo principal de buscar genes regulados pelos níveis de c-di-GMP, o primeiro passo deste trabalho foi construir linhagens de *P. aeruginosa* PA14 cujos níveis dessa molécula pudessem ser controlados. Para isso, genes envolvidos no metabolismo de c-di-GMP foram integrados no cromossomo de PA14 sob o controle de um promotor induzível por arabinose.

O gene *pvrR* (“*p*henotype *v*ariant *r*egulator”) foi identificado em PA14 por codificar uma proteína reguladora, que controla a conversão de SCV (do inglês variante de colônia pequena) para a morfologia selvagem da bactéria (Drenkard and Ausubel 2002) e sua atividade de fosfodiesterase de c-di-GMP cíclico foi comprovada experimentalmente (Kulasakara, Lee et al. 2006), (Drenkard and Ausubel 2002). Esse gene foi usado para a construção da linhagem RB211. Já o gene *PA14_72420*, que apresenta um domínio GGDEF e já teve sua atividade de diguanilato ciclase comprovada (Kulasakara, Lee et al. 2006), foi utilizado na criação da linhagem RB210.

4.1.2 Caracterização fenotípica das linhagens RB210 e RB211.

Testes fenotípicos nas linhagens RB210 e RB211 foram realizados com o objetivo de se verificar se essas linhagens apresentam os fenótipos relacionados a níveis alterados de c-diGMP.

4.1.2.1 Quantificação relativa de c-di-GMP

Análises da concentração de c-di-GMP foram realizadas na presença e ausência do indutor arabinose. A extração de c-di-GMP foi realizada com três protocolos diferentes (Hickman and Harwood 2008), (Spangler, Bohm et al. 2010) e (Simm, Morr et al. 2004). A extração segundo Simm foi a que gerou melhores resultados, apresentando níveis confiáveis de detecção (sinal/ruído maior que 7).

Através da quantificação de c-di-GMP, foi possível observar que as duas construções funcionaram de acordo com o esperado. A indução por arabinose da fosfodiesterase PvrR e da diguanilato ciclase PA14_72420 reduziu ou aumentou os níveis de c-di-GMP, respectivamente (Figura 4). Apesar de nos dois primeiros métodos de extração as amostras não apresentarem valores absolutamente confiáveis de detecção de c-di-GMP, todas apresentaram o mesmo perfil de valores relativos na concentração de c-di-GMP (dados não mostrados), confirmando assim os dados obtidos.

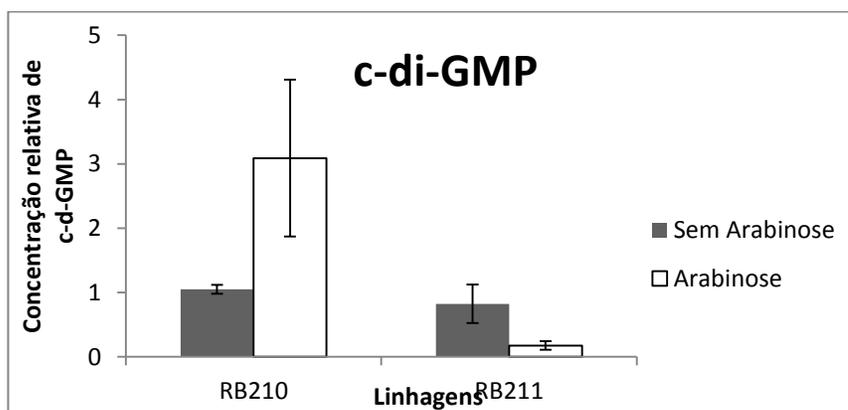


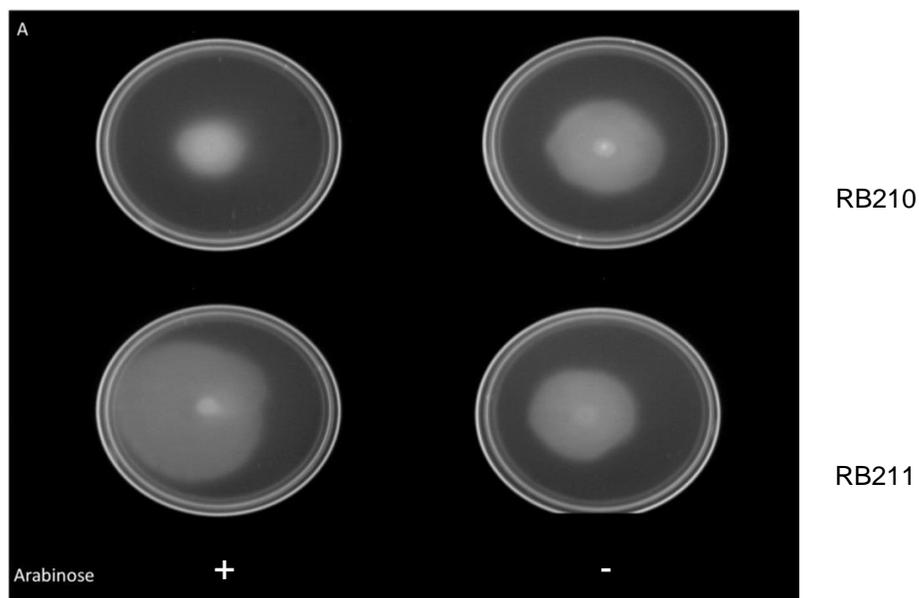
Figura 4 A linhagem RB210 em condições de indução apresenta até 8 vezes mais c-di-GMP que a linhagem RB211 nas mesmas condições. O nucleotídeo cíclico c-di-GMP foi extraído (Simm, Morr et al. 2009) e sua concentração determinada por HPLC/MS/MS. Experimentos realizados em três réplicas independentes, com as barras correspondendo à média dos valores e as barras, ao desvio padrão.

4.1.2.2 Ensaio de motilidade

Como esperado, a superexpressão dos genes *pvrR* e *PA14_72420* resultou em fenótipos de motilidade inversos. Enquanto a superexpressão do gene *pvrR* levou ao aumento das motilidades swimming e swarming, a superexpressão de *PA14_72420* acarretou na diminuição dessas motilidades (Figura 5). Essas mudanças provavelmente estão relacionadas com os níveis intracelulares de c-di-GMP, e não com o aumento das proteínas PvrR e PA14_72420 em si, pois estão de acordo com fenótipos descritos na literatura para alterações na concentração de c-di-GMP intracelular (Romling and Amikam 2006; Tamayo, Pratt et al. 2007).

A motilidade do tipo twitching não apresentou diferenças entre as linhagens estudadas. Ensaio com a linhagem selvagem na presença e ausência de arabinose foram realizados e não foram detectadas diferenças nas três modalidades de motilidade (dados não mostrados). Esse dado, aliado ao fato das linhagens RB210 e RB211 apresentarem fenótipos inversos de motilidade, demonstram que a arabinose não tem papel nos fenômenos observados e não influencia os resultados.

Swimming



Swarming

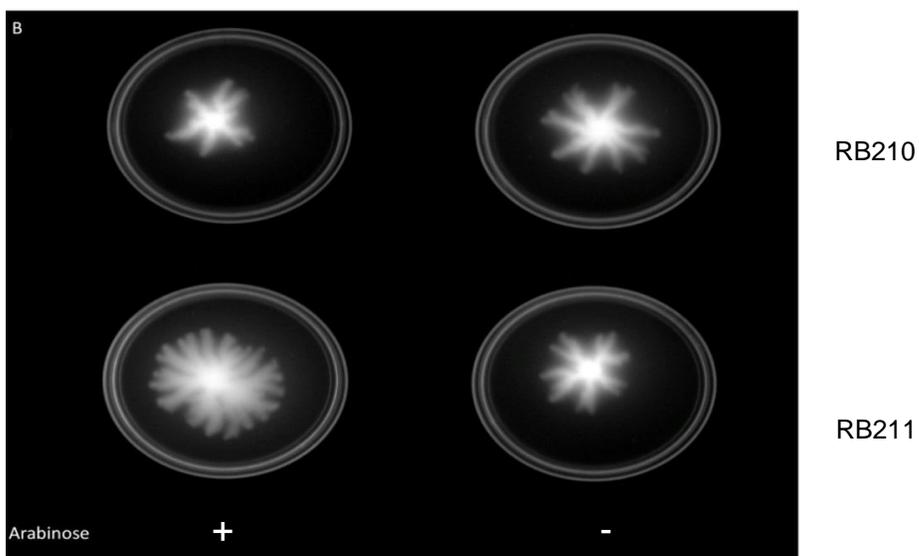


Figura 5 Níveis alterados de c-di-GMP nas linhagens RB210 e RB211 leva a fenótipos inversos nas motilidades swimming e swarming. **A** Placas com meio T 0,3% foram inoculadas na superfície, com 5 μL de uma cultura $\text{D.O}_{600} = 3$ e incubadas por 16 horas a 30°C no interior de sacos plásticos **B**. Placas com meio M9 0,5%, foram inoculadas com 5 μL de uma cultura no final da fase de crescimento exponencial ($\text{D.O}_{600}=3$) e incubadas por 16 horas a 30°C no interior de sacos plásticos.

4.1.2.3 Ensaios de iniciação de biofilmes

A superexpressão dos genes *pvrR* e *PA14_72420* também levou à alteração na formação de biofilme, com diminuição na linhagem RB211(*pvrR*) e aumento na RB210 (*PA14_72420*). Todos os fenótipos apresentados estão de acordo com alterações nos níveis de concentração de c-di-GMP (Figura 6).

Iniciação de Biofilme

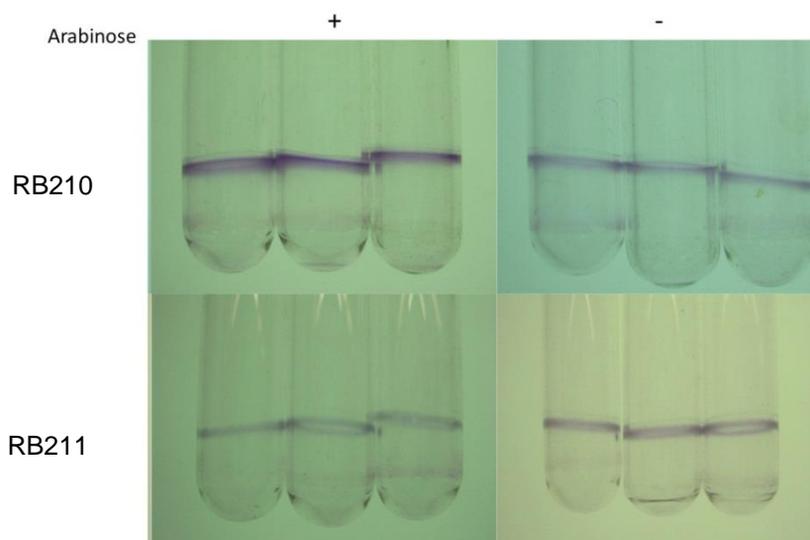


Figura 6 O Iniciação da formação de biofilme é proporcional aos níveis de c-di-GMP. Bactérias foram inoculadas em $DO_{600} = 0,01$ em LB e incubadas a $30^{\circ}C$ por 16 horas, sem agitação. O meio foi então descartado e o biofilme corado com solução de cristal violeta 1%.

4.2 Construção e triagem das bibliotecas de fusões de tradução.

Para a criação das bibliotecas, o transposon ISlacZ/hah foi utilizado (Jacobs, Alwood et al. 2003). Esse transposon contém a região codificadora do gene *lacZ* sem uma região promotora e sem sítio de ligação ao ribossomo (Figura 7). Deste modo, a expressão da β -galactosidase a partir dessas construções só ocorrerá se houver uma

região regulatória, a sequência Shine-Dalgarno e pelo menos alguns códons iniciais de genes de PA14 a montante do sítio de inserção do transposon e em fase de leitura com *lacZ*.



Figura 7 Esquema do transposon ISlacZ/hah (Jacobs, Alwood et al. 2003)

Duas bibliotecas foram construídas com as linhagens RB210 e RB211 como aceptoras. Na construção dessas bibliotecas, após a conjugação, as colônias foram plaqueadas em meios contendo X-gal e as colônias que apresentaram coloração azul foram isoladas em placas de 96 poços e congeladas. Ao todo, foram obtidas 95 placas de 96 poços (35 da linhagem RB210 e 60 placas da linhagem RB211), o que corresponde a 9120 clones expressando β -galactosidase isolados.

4.2.1 Triagem das bibliotecas de transposon

Para a realização da triagem, todos os clones foram repicados em duplicatas, em placas de LB agar 1,5% contendo ou não 0,2 % arabinose, mais 40 $\mu\text{g/mL}$ de X-gal como substrato para a β -galactosidase. Essas placas foram incubadas por 16 horas a 37°C. A expressão do gene repórter *lacZ* está sob o controle de regiões aleatórias do cromossomo, conforme descrito no item acima. A busca por regiões regulatórias dependentes dos níveis intracelulares de c-di-GMP foi realizada pela simples comparação visual entre colônias do mesmo clone nas placas contendo ou não

arabinose (Figura 8). Dos 9120 mutantes analisados, aproximadamente 50 apresentaram diferenças na tonalidade de azul em meio sólido.

Para aumentarmos o número de candidatos, uma nova triagem com todos os mutantes foi realizada em meio líquido. Células foram repicadas em placas de 96 poços contendo LB líquido e incubadas sob agitação por 16 horas a 37°C. 5 µL dessas culturas foram colocados em novas placas de 96 poços com LB líquido contendo ou não arabinose e incubadas mais uma vez sob agitação por 24 horas a 37°C. Após esse período, foi adicionado X-gal 1µg/µL e diferenças na coloração foram analisadas assim que as culturas começaram a se tornar azuis (variando de 30 minutos até 2 horas). Aproximadamente 220 clones apresentaram diferenças na expressão de β-gal e desses, apenas três coincidiram com as diferenças em meio sólido.

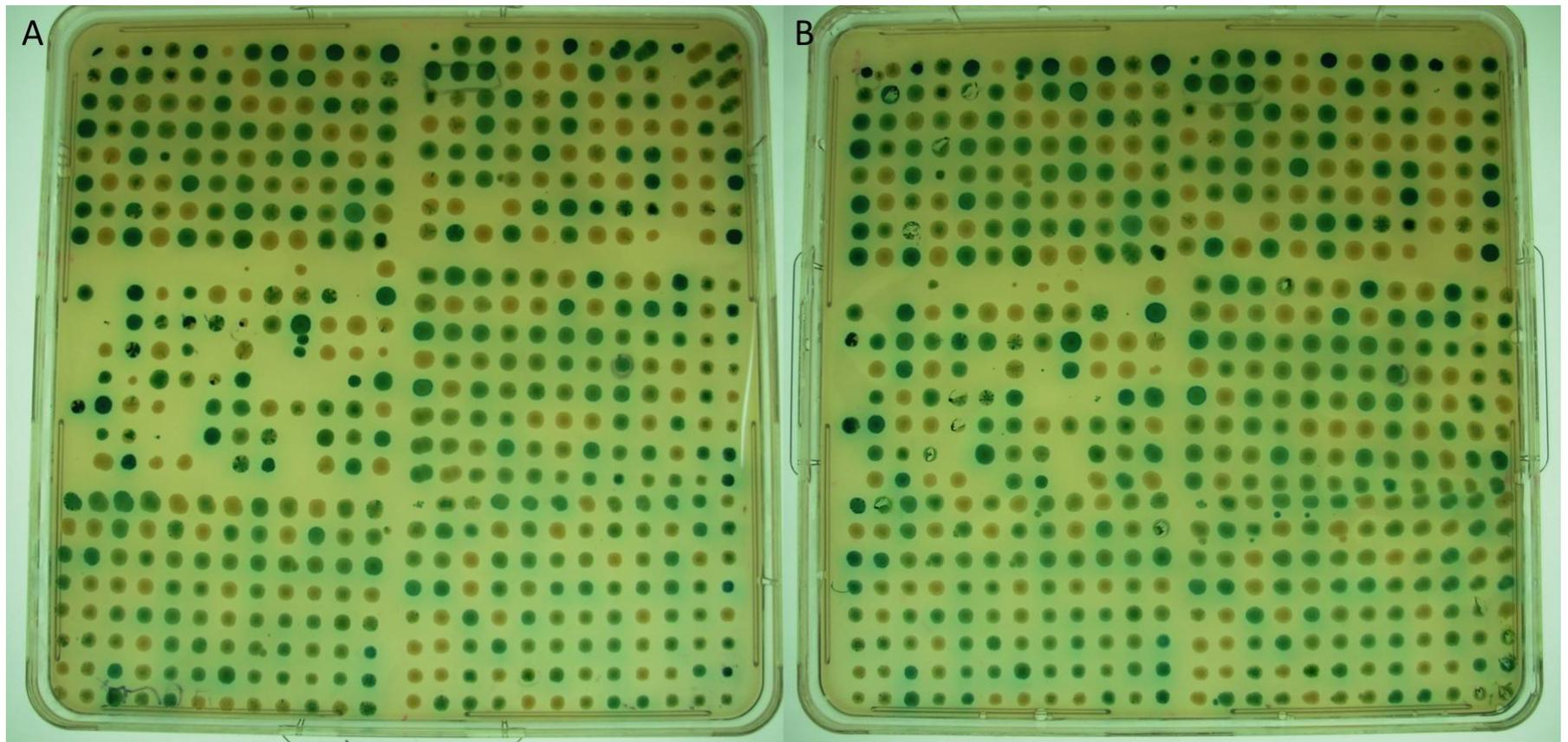


Figura 8. Triagem dos transconjugantes da linhagem RB211::ISlacZ/hah. Colônias isoladas que apresentaram coloração azul foram arranjadas em placas de 96 poços e repicadas em placas LB (A) e LB 0,2% arabinose (B).

4.2.2 Quantificação da atividade de β -galactosidase dos clones que apresentaram diferenças nas duas condições.

Ensaio de atividade de β -galactosidase segundo Miller (Miller 1972) foram realizados com os clones 8A3, 19E12 e 45D1, que apresentaram diferenças na tonalidade de azul nas duas condições empregadas.

Ensaio foram realizados em duas fases do crescimento celular, fase exponencial ($DO_{600}=1,0$) e início de fase estacionária ($DO_{600}=3,0$). Quando ensaios foram realizados em células em início de fase exponencial, uma pequena ou até mesmo ausência de atividade de foi obtida. Nos ensaios realizados em fase estacionária, todas as construções apresentaram uma boa atividade de β -galactosidase e foi possível observar que a linhagem 19E12 apresentou atividade sete vezes maior quando crescida em meio contendo arabinose, enquanto as outras duas linhagens testadas não apresentaram diferenças significativas (Figura 9). Além disso, ensaios de β -galactosidase foram realizados em todos os clones que apresentaram diferenças na triagem em meio sólido, entretanto nenhuma diferença nesses clones foi observada nas duas condições.

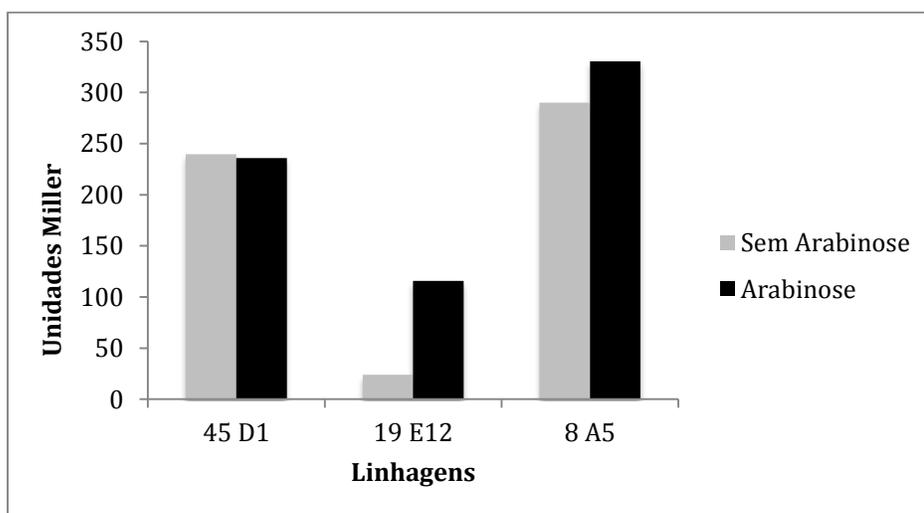


Figura 9. Atividade de β -galactosidase da linhagem 19E12 é cinco vezes maior na presença de arabinose. Culturas foram incubadas 12-16 horas a 37° C, sob agitação (200 rpm), diluídas para DO600nm= 0,1 e novamente incubadas até atingirem DO600nm = 3.

4.2.3 Caracterização do clone 19E12.

Após uma triagem de 9120 clones, apenas o clone 19E2 apresentou diferenças reprodutíveis da expressão diferencial de β -galactosidase. A identificação da região de inserção do transposon no cromossomo desse clone foi realizada através de dois estágios de PCR semi-degenerados, seguido do sequenciamento do produto do segundo estágio, conforme descrito na seção Materiais e Métodos (Jacobs, Alwood et al. 2003).

O resultado da sequência do clone 19E12 revelou que o transposon nessa linhagem estava inserido à jusante da construção do gene *PA14_72420* contendo o promotor de arabinose que foi inserida no sítio ctx para triagem modulação dos níveis de c-diGMP (Figura 10).

Portanto, nenhuma região regulatória dependente de c-di-GMP foi revelada,

apesar de inicialmente a estratégia de identificação de genes regulados por c-di-GMP através do uso de bibliotecas de fusões de tradução parecer uma boa alternativa. De maneira acidental, entretanto, foi possível verificar que o nível de indução por arabinose do gene *PA14_71420* no clone RB210 é de cerca de 7 vezes.

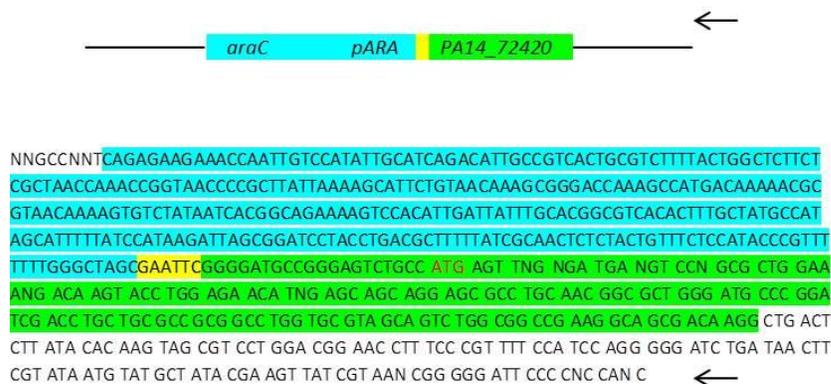


Figura 10 Sequência do sítio de inserção do transposon no clone 19E12. A seta representa o iniciador utilizado para reação de sequência. Em azul, a região da sequência com similaridade com o gene *araC* e o promotor *ara_{BAD}*. Amarelo, região com sítio de restrição *EcoRI* utilizado na clonagem. Verde, região com similaridade ao gene *PA14_72420*. Em vermelho está mostrado o códon de iniciação ATG da proteína *PA14_72420*

4.3. Análise Proteômica

4.3.1 Otimização da eletroforese em duas dimensões.

Após a tentativa frustrada de revelar genes regulados por c-di-GMP através de bibliotecas de fusão de tradução, ensaios de eletroforese bidimensionais foram planejados. Esse tipo de abordagem também pode revelar diferenças na expressão gênica que ocorrem desde o nível de transcrição até o nível de pós-tradução.

A otimização das condições de preparo das amostras e de eletroforese foi necessária, visto que a reprodutibilidade entre os géis é fundamental para este tipo de

análise. Nessa abordagem, foram comparadas diretamente as linhagens RB210 e RB211 em condições indutoras, com os extremos das concentrações de c-di-GMP (Figura 4). A fim de se obter dados confiáveis, que pudessem ser analisados estatisticamente com o programa Decodon, as culturas foram feitas em triplicatas biológicas e processadas separadamente. Vários protocolos foram empregados, na tentativa de solucionar problemas de reprodutibilidade iniciais. Para cada variação de protocolo, seis géis foram gerados e os resultados comparados, quando possível. Um resumo desses protocolos e dos resultados encontrados está listado na Tabela 4. A extração proteica foi realizada basicamente como descrita na seção de Material e Métodos em todos os protocolos; entretanto, diferenças nos tampões de lise e suspensão estão mostradas na tabela 4.

Inicialmente, os ensaios foram realizado com tampão de lise contendo 10mM Tris pH 8; 1mM PMSF e o tampão de suspensão contendo 8M ureia; 2M tioureia; 1% (3-[(3-Colamidopropil)-dimetil amônio]-propano- sulfonato) (CHAPS); 20 mM ditiotretol (DTT); 1% Pharmalite (solução de anfolitos). Essas condições não foram reprodutíveis, com alguns géis contendo arrastes horizontais. O uso de tioureia aumentou a solubilidade das proteínas, mas pode também aumentar esses arrastes (Rabilloud 1998; Simpson 2003). Uma nova condição foi testada retirando a tiouréia do tampão de suspensão. Com a retirada da tiouréia, os géis apresentaram uma maior quantidade de arrastes horizontais. Notamos que estes arrastes poderiam estar ocorrendo pela solubilização ineficiente das proteínas. Para contornar esse problema, a lise celular foi realizada com o mesmo tampão de suspensão, como descrito (Nigaud, Cosette et al.

2010). Quando as amostras foram tratadas dessa maneira, foi possível observar um aumento da reprodutibilidade e uma diminuição, mas não a total eliminação, dos arrastes.

O aumento da concentração de CHAPS, Pharmalite e DTT, além da adição de glicerol, favorece ainda mais a solubilidade das proteínas. Uma nova extração de proteínas foi realizada utilizando tampão de lise e suspensão com o dobro da concentração desses compostos da utilizada anteriormente. Dessa maneira, os resultados finalmente se tornaram reprodutivos e com qualidade adequada para a análise (Figura 12).

Além da otimização da extração proteica, foi realizada também a otimização da focalização isoeletrica. Inicialmente a eletroforese das “strips” foram feitas no aparelho Multiphor II (Pharmacia). Entretanto o uso desse aparelho não nos permitia o acompanhamento da corrente elétrica na corrida de nossas proteínas. Com a necessidade de otimização dos protocolos, a focalização começou a ser realizada no aparelho IPGphor que permite o acompanhamento dos parâmetros da corrida em tempo real. Como demonstrado na figura 11, após pequenas modificações nos parâmetros de focalizações (Tabela 5), o acúmulo da voltagem ocorreu da forma esperada e, dessa maneira, as proteínas focalizaram eficientemente.

Tabela 4 Otimização da extração das proteínas

Tampão de lise	Tampão de suspensão	Resultado
10mM Tris pH 8; 1mM PMSF	8M Ureia; 2M Tiourea; 1%CHAPS; 20mM DTT; 1% Pharnalite	Falta de reprodutibilidade entre os géis
10mM Tris pH 8; 1mM PMSF	8M Ureia; 1%CHAPS; 20mM DTT; 1% Pharnalite	Grande quantidade de arrastes horizontais
8M Ureia; 2M Tiourea; 1%CHAPS; 20mM DTT; 1% Pharnalite	8M Ureia; 2M Tiourea; 1%CHAPS; 20mM DTT; 1% Pharnalite	Melhora na reprodutibilidade, mas alguns arrastes horizontais
8M Ureia; 2M Tiourea; 1%CHAPS; 20mM DTT; 1% Pharnalite	Destreak solution (GE Healthcare)	Grande quantidade de arrastes horizontais
8M Ureia; 2M Tiourea; 2%CHAPS; 40mM DTT; 2% Pharnalite	8M Ureia; 2M Tiourea; 2% CHAPS; 40mM DTT; 2% Pharnalite; 10% Glicerol	Géis adequados para análise

Tabela 5. Parâmetros da focalização isoeétrica.

Aparelho	Fase	Voltagem	Volts /horas	Resultados
Multiphor II	1	500	1	Alguns géis bons, mas sem reprodutibilidade
	2	3500	3000	
	3	3500	17500	
	Total		20500	
Multiphor II	1	500	3000	Alguns géis bons, mas sem reprodutibilidade
	2	3500	3000	
	3	3500	30000	
	Total		36000	
IPGphor	1	500	500	Bons géis, com poucos arrastes nas bordas
	2	1000	1000	
	3	8000	32000	
	Total		33500	
IPGphor	1	500	500	Melhor definição nas bordas dos géis
	2	1000	800	
	3	8000	31500	
	Total		32800	



Figura 11. Demonstração do acúmulo de voltagem na focalização isoeétrica. A linha azul representa a voltagem configurada e a linha vermelha, a voltagem medida. É possível observar que a voltagem medida acompanhou a voltagem configurada, demonstrando assim que as amostras estavam puras e a focalização ocorreu como o previsto.

4.3.2 Proteínas diferencialmente expressas entre as linhagens RB210 e RB211

Em uma primeira análise, géis bidimensionais de 18 cm realizados com fitas (“strips”) de pH 3-10 não linear foram realizados. Três replicas biológicas de cada linhagem (RB210 e RB211) tiveram suas proteínas extraídas em uma $DO_{600nm} = 1$ e separadas em géis bidimensionais. A análise dos géis foi realizada com o auxílio do software Decodon Delta 2 e foi possível identificar aproximadamente 800 “spots”. O tratamento estatístico utilizando teste t ($p < 0,05$) permitiu identificar nove “spots” contendo quantidades diferentes de proteínas entre as amostras das linhagens RB210

e RB211 (Tabela 6).

Dos nove “spots” analisados, sete foram identificados com sucesso e os outros dois continham misturas de duas proteínas. Três “spots” foram identificados como sendo mais abundantes na linhagem RB210 (alta concentração de c-di-GMP), dois deles apresentaram mais de uma proteína (FliG/PA0486 e AcaA/PrpB). O terceiro “spot” com expressão aumentada em alto c-di-GMP foi identificado como sendo a proteína Tpx. Young Hoon Kim e colaboradores (Kim, Lee et al. 2006), demonstraram que a proteína Tpx de *E. coli* tem níveis aumentado em biofilme, enquanto seu mRNA é diminuído nessas condições, sendo importante na formação de biofilme.

Seis “spots” foram mais abundantes na superexpressão de PvrR (níveis baixos de c-di-GMP) OprD, OpdC, OprE, OprF, OprG e FliC. O que mais chamou a atenção foi que, dos seis spots identificados com sucesso, cinco são proteínas de membrana externa (Figura 12).

Tabela 6 Proteínas com a expressão dependente da concentração de c-di-GMP

Locus em PA14	Razão Alto/Baixo c-di-GMP	Proteína	Alto c-di-GMP	Função	Localização
PA14_02020	0,59	OpdC	Reprimido	Porina da Família OprD	Membrana Externa
PA14_41570	0,71	OprF	Reprimido	Principal porina estrutural	Membrana Externa
PA14_51880	0,51	OprD	Reprimido	Porina da Família OprD	Membrana Externa
PA14_11270	0,54	OprG	Reprimido	Porina OprG	Membrana Externa
PA14_03800	0,58	OprE	Reprimido	Porina induzida por anaerobiose da família OprD	Membrana Externa
PA14_50290	0,75	FliC	Reprimido	Flagelina	Extracelular
	1,8	FliG + PA0486	Ativado		
PA14_31810	1,4	Tpx	Ativado	thiol peroxidase	Periplasmática
	1,7	AccA + PrpB	Ativado		

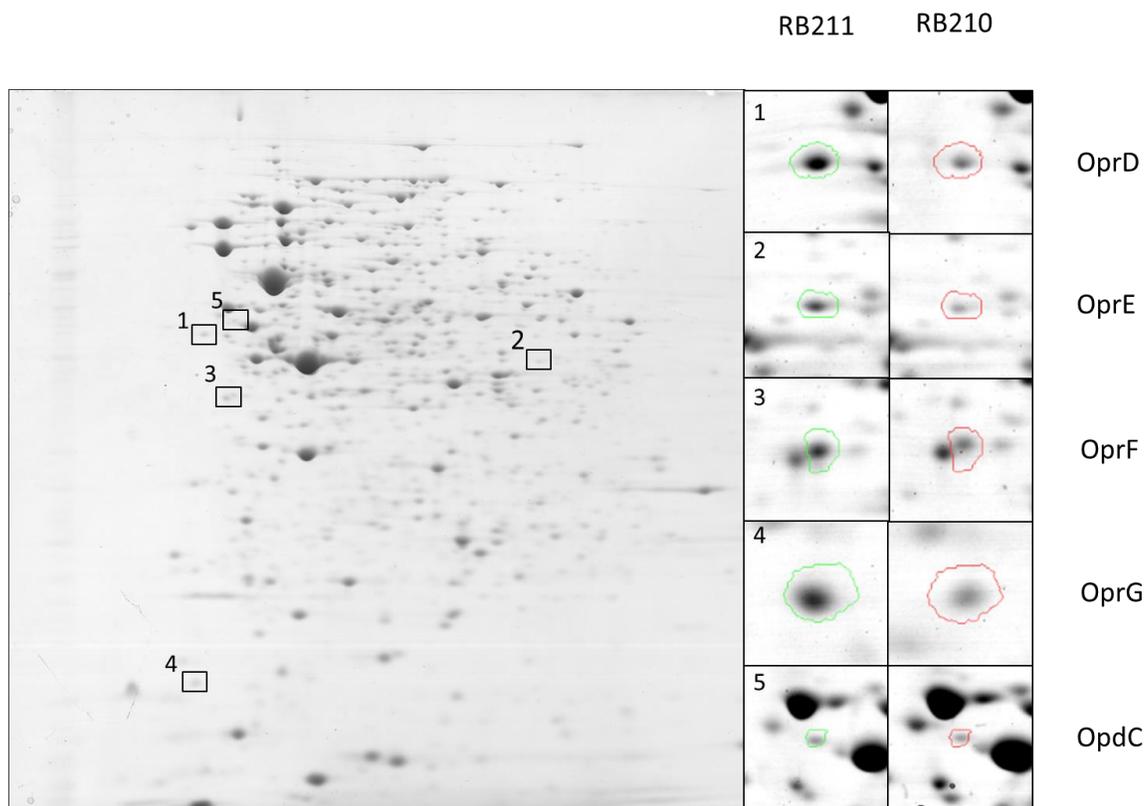


Figura 12 Variações nos níveis de c-di-GMP levam a alterações dos níveis de porinas. As proteínas celulares foram extraídas a partir de linhagens com alto (RB211) e baixa c-di-GMP (RB210) cultivadas em LB com 0,2% de arabinose até OD600 = 1. As corridas foram feitas em triplicatas biológicas em géis com gradiente não linear de pH 3-10 na primeira dimensão e acrilamida 12% na segunda. As imagens dos géis foram analisadas utilizando o software Delta 2D (Decodon). Quadrados numerados mostram seções selecionadas dos géis 2D com proteínas de membrana externa nas linhagens RB210 e RB211.

Essa primeira análise por eletroforese bidimensional apresentou uma grande quantidade de proteínas que se localizaram próximo ao pH neutro na fita de focalização isoelétrica, dificultando a análise desta região. Portanto, uma segunda análise com géis bidimensionais foi realizada com as mesmas condições de crescimento, utilizando fitas com uma faixa de pH mais restrita (pH 4-7) para a focalização, melhorando a resolução dos “spots” que se apresentaram centralizados na primeira análise.

Nesta segunda análise, 26 spots foram identificados por estarem diferencialmente expressos em condições de alto e baixo c-di-GMP (Tabelas 7 e 8). As

proteínas OprD, OprF e OpdC foram novamente identificadas nesta análise, confirmando assim os dados da primeira série de géis 2D. (Figura 12).

Tabela 7 Proteínas mais expressas na linhagem com baixo c-di-GMP (RB211)

Proteína	Razão Alto/Baixo c-di-GMP	Função	Localização
	0,60	Proteína hipotética	Periplasmática
HepA	0,62	Helicase dependente de ATP	Citoplasmática
OprF*	0,7	OprF	Membrana externa
OpdC*	0,56	Porina da Família OprD	Membrana externa
OprD*	0,65	Porina da Família OprD	Membrana externa
Dxs	0,63	1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato sintase	Citoplasmática
GlnS	0,79	glutaminyl-tRNA sintetase	Citoplasmática
	0,73	putativo fator de liberação da cadeia peptídica 2	Citoplasmática
CysS	0,73	cysteinyI-tRNA sintetase	Citoplasmática
ThrC	0,65	treonina sintase	Citoplasmática

* Proteínas também identificadas nas análises com géis com pH 3-10

Tabela 8 Proteínas mais expressas na linhagem com alto c-di-GMP (RB210)

Proteína	Razão Alto/Baixo c-di-GMP	Função	Localização
SahH	1,86	S-adenosil-L-homocisteína hidrolase	Citoplasmática
MurA	1,44	UDP-N-acetilglucosamina 1-carboxiviniltransferase	Citoplasmática
IscS	1,63	cisteína desulfurase	Citoplasmática
FabF1	1,31	3-oxoacil-(acil carrier protein) sintase II	Membrana Citoplasmática
Fbp	1,20	frutose-1,6-bisfosfatase	Citoplasmática
Tsf	1,61	Fator de alongação Ts	Citoplasmática
SpeE	1,81	Espermidina sintase	Citoplasmática
PA14_57890	2,65	Proteína hipotética envolvida na formação de capsula	Citoplasmática
PA14_65190	1,65	TrmH RNA metiltransferase, grupo 3	Citoplasmática
Ppa	1,64	Fosfatase inorgânica	Citoplasmática
Pnp	1,33	Poli nucleotídeo fosforilase	Citoplasmática
HslU	1,57	Protease dependente de ATP subunidade de ligação ao ATP chaperona	Citoplasmática
CysN	1,55	bifuncional sulfato adenililtransferase	Citoplasmática
ClpA	1,82	Protease dependente de ATP subunidade de ligação ao ATP chaperona	Citoplasmática
AccC	1,67	acetil-CoA carboxilase biotina carboxilase	Citoplasmática
PrIC	1,52	oligopeptidase A	Citoplasmática

No final dessas duas análises foi possível identificar 31 proteínas que têm sua expressão dependente dos níveis de c-di-GMP em PA14. Dessas trinta e uma proteínas, onze tiveram seu gene codificador ou genes vizinhos identificados como diferencialmente expressos em condições semelhantes, de acordo com análises de transcriptoma por microarranjos de DNA (Hickman, Tifrea et al. 2005; Starkey, Hickman et al. 2009), sugerindo que sejam reguladas em nível de transcrição e confirmando também nossos resultados.

Dezoito proteínas são mais expressas em altos níveis de c-di-GMP. A maioria dessas dezoito proteínas são proteínas envolvidas no metabolismo primário. Entretanto, três delas (HslU, ClpA e PrlC) são envolvidas na degradação de proteínas: HslU e ClpA são subunidades das proteases HslV e ClpB, respectivamente e PrlC é uma protease periplasmática (Conlin, Trun et al. 1992; Sauer and Baker 2011). Essas proteínas normalmente têm sua expressão aumentada em resposta a estresses (Sauer and Baker 2011), indicando que c-di-GMP pode estar envolvido nessas respostas de alguma maneira, ou, alternativamente, que a superexpressão da diguanilato ciclase PA14_72420 seja por si só uma fonte de estresse. Curiosamente, as enzimas superexpressas pela adição de arabinose no meio não foram detectadas como diferencialmente expressas nas análises de gel 2D e não são observadas como bandas mais intensas em géis unidimensionais de SDS-PAGE. Isso pode indicar que a adição de arabinose, apesar de causar mudanças extremas no fenótipo das linhagens, não acarreta um grande acúmulo de proteínas superexpressas. Entretanto, não se pode descartar ainda que a indução das chaperonas envolvidas com proteólise seja apenas

uma resposta da célula para impedir o aumento exagerado da concentração da proteína PA14_72420.

Treze proteínas são mais expressas em baixos níveis de c-di-GMP. Um dado que nos chamou a atenção foi que, das treze proteínas que tiveram a expressão aumentada em baixos níveis de c-di-GMP, cinco são porinas de membrana externa (OprF, OprD, OprC, OprG, OprE). Além disso, as proteínas OprF, OprD e OprC foram identificadas nas duas diferentes análises proteômicas (focalização isoeétrica com fitas de pH 3-10NL e 4-7).

4.4. Perfil de expressão de porinas

Buscando um método simples para analisar os níveis de expressão de proteínas de membrana externa, o fracionamento de proteínas celulares foi realizado no laboratório do professor Éric Déziel, durante estágio no INRS, Canadá. Com esse método, a proposta era utilizar mutantes já caracterizados da biblioteca de PA14NR com concentrações alteradas de c-di-GMP e com isso verificar se os níveis intracelulares de c-di-GMP regulam o perfil de proteínas de membrana externa em *P. aeruginosa*.

Dois diferentes métodos foram utilizados para a extração de proteínas de membrana externa. Apesar de ambos apresentarem um bom rendimento de proteínas de membrana externa, não foi possível observar diferenças a olho nu na quantidade das proteínas OprD e OprF, como observadas em géis bidimensionais (Figura 13). Diferentes condições de crescimento, como variações no pH da cultura, velocidade de

agitação, densidade ótica, crescimento na presença de luz e variações dos meios de culturas foram testados, mas em nenhuma delas foi possível observar uma variação de expressão dessas porinas nas linhagens RB210 e RB211. Provavelmente, variações na concentração de c-di-GMP resultam em uma pequena diferença nos níveis de OprF e OprD que não é facilmente observada nos géis de uma dimensão devido a baixa resolução e sensibilidade do método.

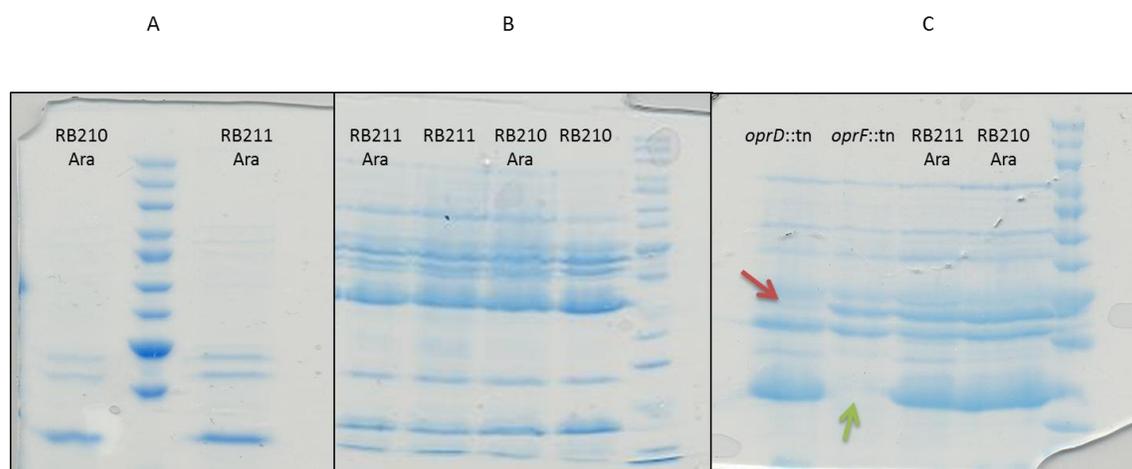


Figura 13 SDS Page corados com azul de comassie não apresentam sensibilidade suficiente para detectar variações na expressão das porinas OprD e OprF. Dois diferentes métodos foram realizados, o método de extração através de gradiente de sacarose (A) apresentou um menor rendimento nas proteínas de membrana, comparado com o método de solubilização por N-LAURIL-SARCOSIL (B). Um gel controle com extração de proteínas de membrana de linhagens mutantes nos genes *oprF* seta verde e *oprD* seta vermelha é apresentado na figura (C)

4.4.1 Porinas não são reguladas via c-di-GMP em nível de transcrição

Ensaio de proteômica revelaram diferenças na expressão de cinco proteínas de membrana externa. Análises de expressão dos genes através de RT-PCR quantitativo foram realizadas, buscando validar as diferenças observadas nos ensaios de eletroforese bidimensionais. Esse tipo de ensaio permite estimar a quantidade de um mRNA específico nas células em relação a um gene normalizador, cuja expressão não

varia nas mesmas condições .

Como demonstrado na figura 14, é possível observar que a variação dos níveis de c-di-GMP não alterou significativamente a transcrição dos genes *oprD*, *oprE*, *oprF*, *oprG* e *oprC*, que codificam as respectivas proteínas diferencialmente expressas nos ensaios de eletroforese bidimensionais.

Apesar dos resultados aparentemente não validarem a análise proteômica, os ensaios medem apenas os níveis relativos de mRNA e diferenças pós-transcricionais e/ou pós-traducionais que seriam refletidas nos níveis de proteína podem ser responsáveis pela variação observada na análise proteômica. A abordagem escolhida neste trabalho se baseou na possibilidade de se encontrar novos alvos regulados por c-di-GMP em todos os níveis de regulação, portanto os resultados de qRT-PCR não invalidam os achados de proteômica.

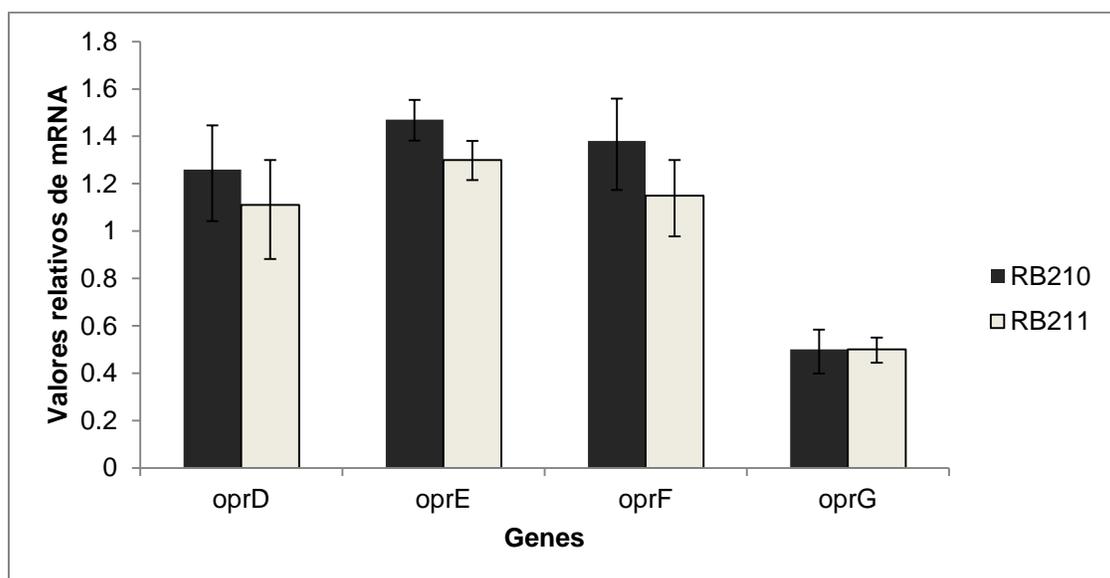


Figura 14 Diferenças nos níveis de c-di-GMP não alteraram a expressão dos genes *oprD*, *oprE*, *oprF*, *oprG*, *tpx* e *fliC*. O ensaio de qRT-PCR foi realizado em triplicatas técnicas, a partir de RNA total extraído de culturas com $DO_{600nm}=1$ em LB 0,2% arabinose a 37°C e 240 rpm.

4.4.2 Validação da variação de OprD pelos níveis de c-di-GMP

Para confirmar as variações observadas nas análises de géis bidimensionais ensaios de “Western Blot” foram realizados utilizando anticorpo policlonal contra OprD e as linhagens RB210 e RB211. Através desse ensaio confirmamos que o aumento dos níveis intracelulares de c-di-GMP leva a uma diminuição dos níveis de OprD, corroborando a análise em gel 2D (Figura 15). Além disso, o mutante do gene *tpbA*, que apresenta altos níveis de c-di-GMP (Ueda and Wood 2009; Ueda and Wood 2010), também apresentou uma diminuição da quantidade de OprD (Figura 15). O mutante no gene *PA14_72420*, que apresenta uma menor concentração dos níveis de c-di-GMP, não apresentou diferenças significativas na concentração de OprD. Provavelmente a diminuição dos níveis de c-di-GMP nessa linhagem não são suficiente para alterar a expressão de OprD. Juntos, esses dados comprovam que altos níveis de c-di-GMP e não apenas a superexpressão do gene *PA14_72420* levam a uma diminuição da porina OprD nas células.

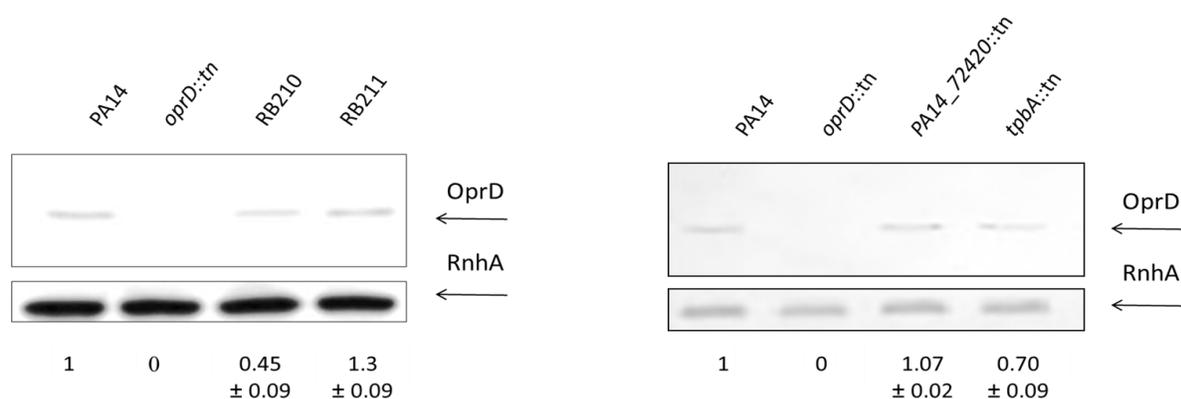


Figura. 15 c-di-GMP regula a expressão de OprD. Proteínas celulares foram extraídas a partir de células cultivadas em meio TSB com 0,2% de arabinose a OD600 = 1. Anti-RNase HI (RnhA) foi utilizado como normalizador. Os números abaixo da figura representa a relação entre OprD/RnhA, realizada com o software ImageJ. Os painéis mostrados são representativos de três experimentos independentes.

4.4.3 A alteração nos níveis de OprF não influencia o crescimento na ausência de NaCl.

OprF é responsável pela difusão inespecífica de pequenos nutrientes, incluindo polissacarídeos com tamanhos abaixo de 1519 Da e é considerada a principal porina de *P. aeruginosa*, por ser a mais abundante (Nestorovich, Sugawara et al. 2006).

Foi demonstrado também que OprF está envolvida em vários processos, como a interação patógeno-hospedeiro, a adesão às células eucarióticas, a formação de biofilme em condições anaeróbias e é essencial para o crescimento em meio com baixa osmolaridade, como LB sem a adição de NaCl (Brinkman, Schoofs et al. 1999) (Fito-Boncompte, Chapalain et al. 2010).

Como o aumento dos níveis de c-di-GMP levou a uma diminuição nos níveis de OprF, curvas de crescimento foram realizadas em condições de alto e baixo c-di-GMP, em meio LB (com 5g/L de NaCl) e LB sem sal, esperando-se que a linhagem com alto c-di-GMP tivesse um crescimento pior comparado com a linhagem de baixo c-di-GMP na ausência de NaCl. Entretanto, a linhagem com baixos níveis de c-di-GMP mostrou uma menor densidade celular durante a fase estacionária em LB sem sal, se comparada com a linhagem com alto c-di-GMP nas mesmas condições (Figura 16). Apesar de este resultado representar o inverso do esperado, não se pode ainda tirar conclusões sobre o papel de c-di-GMP no crescimento em meio sem sal, já que diversas outras proteínas de membrana estão também alteradas e poderiam compensar os níveis menores de OprF

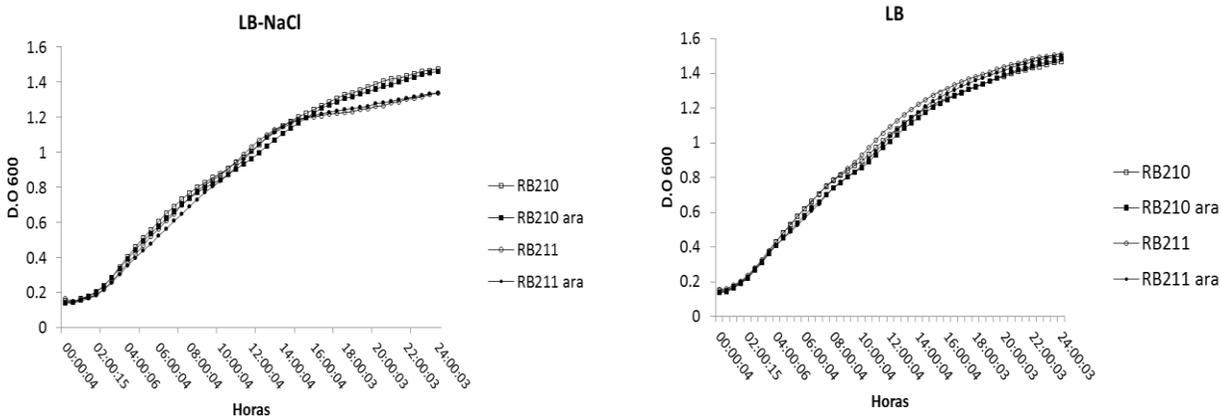


Figura 16 A superexpressão de *pvrR* e consequente diminuição dos níveis de c-di-GMP levou a uma pequena deficiência de crescimento quando as células foram crescidas em LB sem sal contendo 0,2% de arabinose. O crescimento das culturas foi medido durante 24 horas pelo aparelho Bioscreen, que fez medidas de DO_{600nm} a cada 30 minutos.

4.5 O papel de c-di-GMP na resistência a antibióticos.

4.5.1 O β -lactâmico Imipenem

As proteínas OprD, OpdC e OprE fazem parte da família das porinas OprD e pelo menos dezenove proteínas dessa família são codificadas no genoma de *P. aeruginosa*. Porinas dessa família estão relacionadas com o transporte específico de certas moléculas, como aminoácidos básicos por OprD e histidina por OpdC. Foi demonstrado também que OprD é importante na captação do antibiótico imipenem (Ochs, McCusker et al. 1999). Imipenem é um antibiótico β -lactâmico que tem como mecanismo de ação a inibição da síntese de parede celular em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Linhagens mutantes no gene *oprD* são até dez vezes mais resistentes a esse antibiótico (Epp, Kohler et al. 2001). Como a quantidade de OprD

varia de acordo com os níveis de c-di-GMP, foi verificado se esta variação se refletiria na resistência a imipenem.

A concentração inibitória mínima (M.I.C) desse antibiótico foi determinada na linhagem selvagem e nas linhagens com níveis opostos de c-di-GMP (superior ou inferior ao do tipo selvagem). Todas as linhagens apresentaram a mesma sensibilidade (M.I.C. = 1 µg/mL). Para revelar pequenas diferenças no limiar de resistência, o crescimento em uma concentração inibitória mínima de imipenem (0,5 µg/mL) foi monitorado durante 24 horas nessas linhagens. A linhagem RB210 (alto c-di-GMP) apresentou uma ligeira melhora no crescimento, enquanto que a linhagem RB211 (baixo c-di-GMP) mostrou uma taxa de crescimento mais lento, em comparação com tipo selvagem PA14 (Figura. 17).

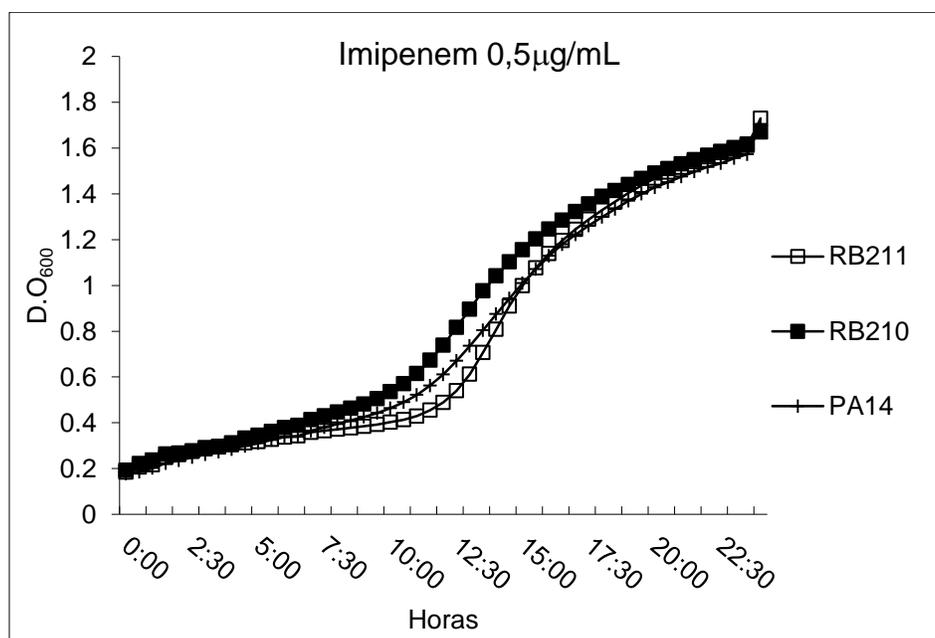


Figura 17 A diminuição dos níveis de c-di-GMP intracelulares leva a uma maior sensibilidade ao antibiótico imipenem, provavelmente devido ao aumento na expressão da proteína OprD. Culturas foram incubadas na presença de 1 µg/ml de imipenem e o crescimento foi medido durante 24 horas através do aparelho Bioscreen que fez medidas de DO600nm a cada 30 minutos.

Embora pequena esta diferença foi consistentemente reprodutível e pode proporcionar uma vantagem para as células com alto níveis de c-di-GMP quando cultivadas em conjunto com células que apresentam menor concentração dessa molécula. Para testar esta hipótese, células com alto nível de c-di-GMP foram marcadas com uma proteína azul fluorescente (CFP) e ensaios de competição com PA14 foram realizados. Após 24 horas de crescimento em 0,5 µg/mL imipenem, a linhagem RB210*cfp* correspondeu a cerca de 87% das células na cultura. No controle sem antibiótico, a porcentagem das linhagens PA14 e RB210*cfp* foram muito próximas (Figura 18). Portanto, concluímos que a diferença aparentemente pequena na taxa de crescimento das bactérias em cultura pura podem refletir em uma vantagem considerável da linhagem RB210*cfp* sobre PA14 em culturas mistas na presença de uma pressão seletiva.

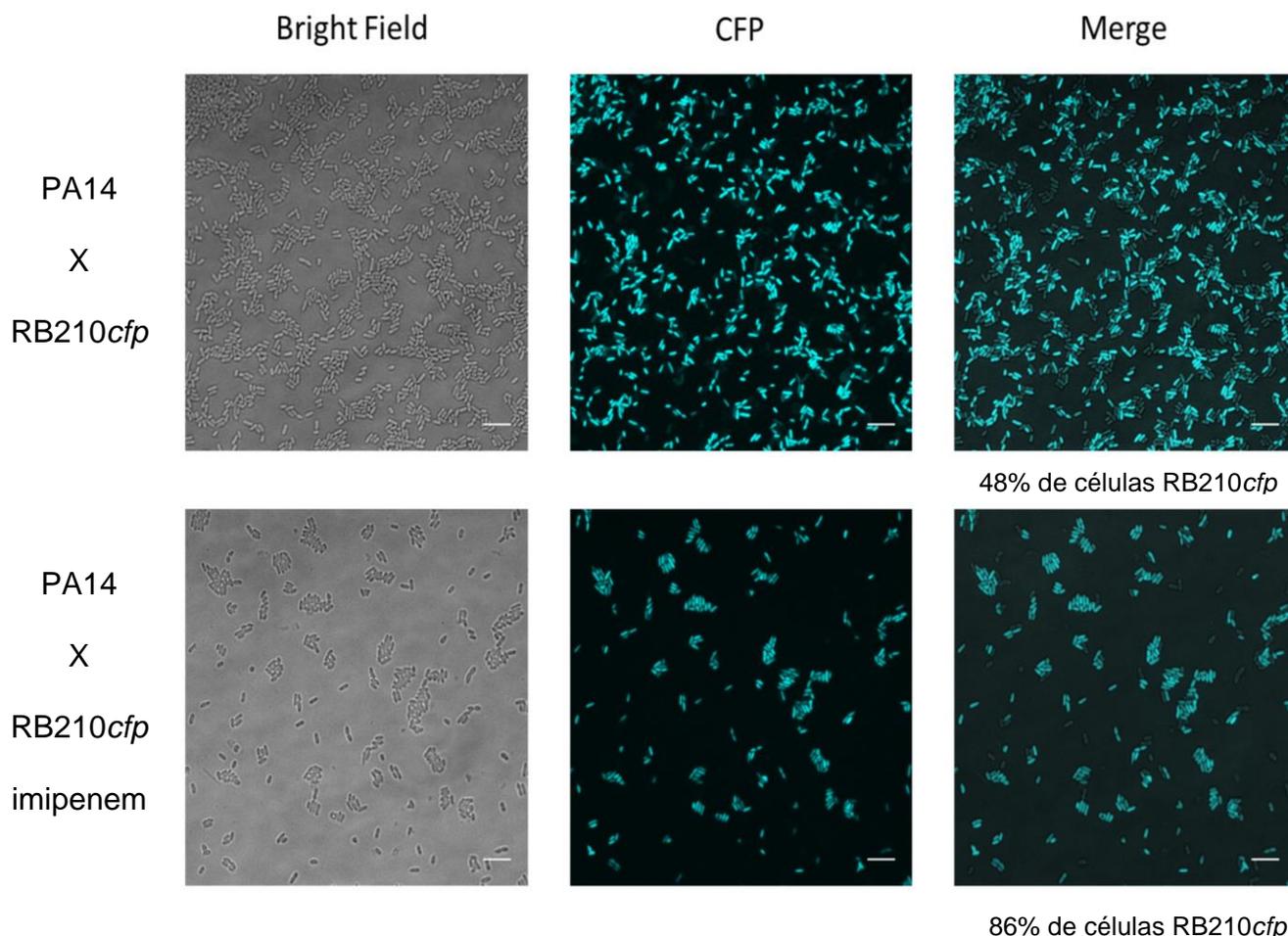


Figura 18 Altos níveis de c-di-GMP favorecem a competição na presença de concentrações subinibitórias de imipenem. As linhagens PA14 e RB210*cfp* (alto c-di-GMP) foram crescidas durante 24 horas em meio Mueller-Hinton 0,2% arabinose contendo ou não imipenem (0,5 µg/mL). No total 2000 células foram contadas por microscopia de campo brilhante e as células marcadas com CFP foram observadas sob um conjunto de filtro BrightLine CFP. A porcentagem de células fluorescentes é mostrada sob os painéis.

4.5.2 Sensibilidade ao aminoglicosídeo tobramicina

P. aeruginosa apresenta diferentes mecanismos de resistência aos antibióticos aminoglicosídeos, sendo um destes a diminuição da captação desses antibióticos através da diminuição da permeabilidade da membrana (Hancock 1998; Hancock and

Brinkman 2002). Foi relatado que mudanças no perfil de proteínas de membrana externa estão relacionadas com resistência a esta classe de antibióticos (Hancock and Brinkman 2002). Além disso, concentrações subinibitórias de aminoglicosídeos (tobramicina, gentamicina e amicacina) induzem o aumento da formação de biofilme através da atividade da fosfodiesterase de c-di-GMP Arr em PAO1 (Hoffman, D'Argenio et al. 2005). Buscando encontrar uma correlação entre os níveis de proteínas de membrana externa, níveis intracelulares de c-di-GMP e resistência a aminoglicosídeos, curvas de crescimento foram realizadas na presença de 0,625 µg/mL de tobramicina, após a determinação do MIC para PA14 de 0,625 µg/mL.

A linhagem RB210, com alto nível de c-di-GMP, apresentou uma maior sensibilidade a tobramicina em comparação com a linhagem RB11 (Figura 19). Além disso, mutantes em genes que codificam para proteínas com domínios GGDEF enzimaticamente ativos (SiaD e PA14_72420), e, portanto, com os níveis de c-di-GMP diminuídos, apresentaram um crescimento melhor quando cultivados nessa concentração de tobramicina em relação à linhagem selvagem. Já a linhagem com mutação no gene *tpbA* e uma maior concentração de c-di-GMP apresentou crescimento similar o da linhagem selvagem (Figura 19).

Diferente do que ocorre com a proteína OprD, cujo papel na captação de imipenem já está bem caracterizado, o mecanismo de resistência a antibióticos aminoglicosídeos não está claro. Os dados aqui apresentados não permitem afirmar se a razão da variação da sensibilidade aos aminoglicosídeos é a mudança mais geral do perfil de proteínas de membrana externa observado nas análises proteômicas, ou se

essa variação se deve especificamente a uma proteína em particular. Entretanto, o conjunto de dados mostra que as concentrações de c-di-GMP podem influenciar tanto na resistência ou na sensibilidade a diferentes antibióticos.

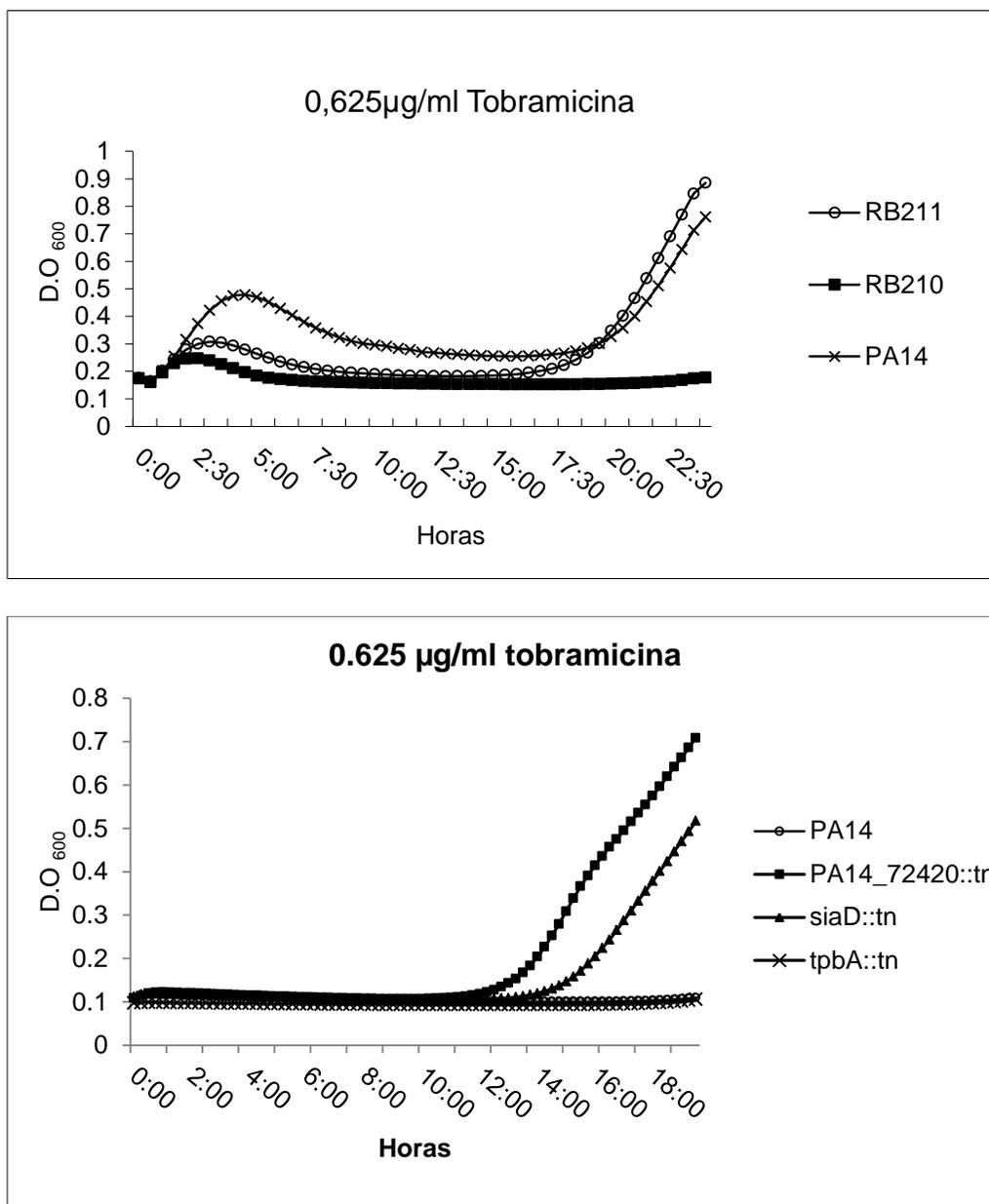


Figura 19 O aumento dos níveis intracelulares de c-di-GMP leva a um aumento na sensibilidade ao antibiótico tobramicina. Células foram crescidas na presença de 0,625 µg/ml tobramicina e o crescimento celular foi medido durante 24 horas através do aparelho Bioscreen, que fez medidas de DO_{600nm} a cada 30 minutos.

4.5.3 Transcrição dos genes envolvidos em resistência a antibióticos.

P. aeruginosa apresenta uma elevada resistência intrínseca a antibióticos, que resulta da alta seletividade da entrada de substrato através da membrana e principalmente pela presença de diversas bombas de efluxo dependentes de energia (Hancock and Speert 2000; Breidenstein, de la Fuente-Nunez et al. 2011).

Análise dos níveis de mRNA das principais bombas de efluxo de PA14, assim como do gene *ampC*, que codifica uma β -lactamase, foi realizada nas linhagens com diferentes níveis de c-di-GMP, buscando compreender um possível mecanismo de resistência dessas linhagens. A variação dos níveis de c-di-GMP não levou a variações significativas nos níveis de mRNA desses genes (Figura 20), o que reforça a hipótese de que a resistência e sensibilidade a antibióticos resultante de variações de c-di-GMP pode ser um efeito de variações do perfil das proteínas de membrana externa.

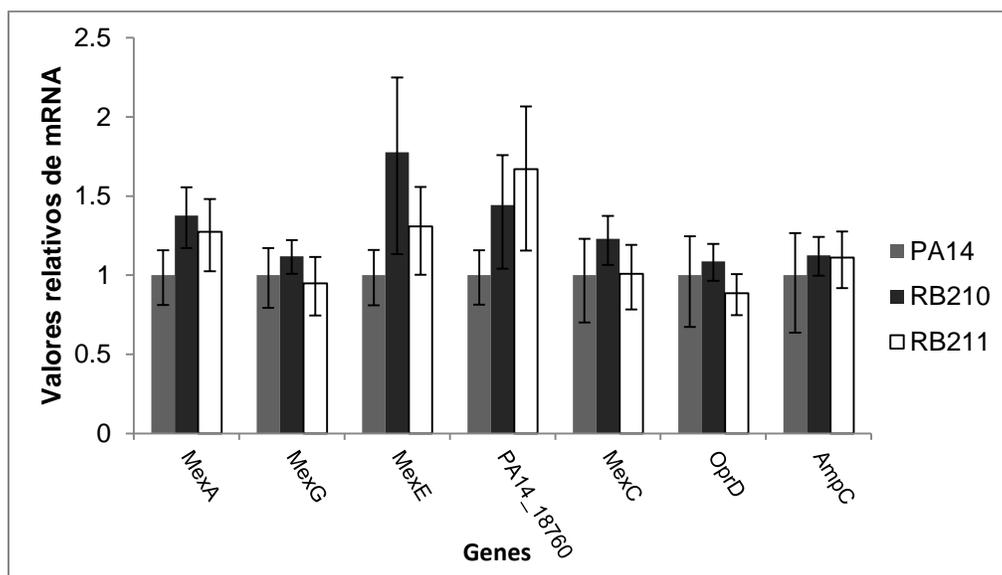


Figura 20 Diferenças nos níveis de c-di-GMP não alteraram a expressão dos genes relacionados a resistência a antibióticos. O ensaio de qRT-PCR foi realizado em triplicatas técnicas, a partir de RNA total extraído de culturas com $DO_{600nm} = 1$ em LB 0,2% arabinose a 37°C e 240 rpm.

4.6 Busca por proteases envolvidas na regulação de proteínas de membrana externa

As análises de qRT-PCR demonstraram que, apesar dos níveis de suas proteínas variarem, os níveis de mRNA dos genes *oprD*, *oprE*, *oprF*, *oprG* e *opdC* não variam em diferentes concentrações de c-di-GMP. Recentemente, foi caracterizado em *P. fluorescens* o sistema LapD/LapG, que atua na degradação da adesina LapA. LapD é uma proteína integral de membrana interna com domínios GGDEF e EAL sem função enzimática, que responde aos níveis intracelulares de c-di-GMP, regulando a atividade da protease periplasmática LapG, por mantê-la sequestrada quando c-di-GMP se liga ao domínio GGDEF de LapD (Newell, Monds et al. 2009; Navarro, Newell et al. 2011). *P. aeruginosa* não possui o gene que codifica LapA, mas apresenta os genes *lapG* (protease) e *lapD* (sensora de c-di-GMP) em um provável operon.

Uma análise do banco de dados disponível em www.pseudomonas.com (Winsor, Lo et al. 2005; Winsor, Van Rossum et al. 2009) foi realizada, buscando encontrar genes que codificam proteínas com domínios GGDEF e/ou EAL sem função enzimática em operon com genes codificando possíveis proteases (Tabela 7). Foi possível encontrar um segundo par de genes que codificam uma proteína com domínio GGDEF/EAL sem função enzimática (PA14_21870 ou PA3258) e uma protease periplasmática (Prc).

Uma hipótese levantada é de que as proteínas OprD, OprE, OprF, OprG e OpdC, poderiam sofrer uma maior degradação em células com altos níveis de c-di-GMP e essa degradação poderia ser regulada por algum dos dois sistemas encontrados nessa

análise (LapD/LapG ou PA14_21870/PRC).

Tabela 7 Genes que codificam proteínas com domínios GGDEF/EAL e predição da função do operon dos quais fazem parte. Em destaque, possíveis candidatos a sensor e a protease periplasmática.

Gene	Domínios	Atividade enzimática (Kulasakara, Lee et al. 2006)	Predita de estar em operon com	Localização da proteína GGDEF/EAL
PA14_45930	GGDEF/EAL	-	Predicted transglutaminase-like cysteine proteinase	Membrana Citoplasmática
PA14_57140	GGDEF	-	pantothenate biosynthetic process, putative two-component sensor, cobalamin biosynthetic process	Citoplasma
PA14_65540	EAL/GGDEF	-	hypothetical protein	Membrana Citoplasmática
PA14_04420	GGDEF	-	phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase PtsP, dinucleoside polyphosphate hydrolase	Citoplasma
PA14_53140	GGDEF/EAL	-	Pyrrroloquinoline quinone (Coenzyme PQQ) biosynthesis protein C	Membrana Citoplasmática
PA14_71850	GGDEF/EAL	-	Hypothetical, unclassified, unknown Outer Membrane e hypothetical protein	Membrana Citoplasmática
PA14_56280	GGDEF	-	putative 2-polyprenylphenol hydroxylase, putative enoyl-CoA hydratase/isomerase	Membrana Citoplasmática
PA14_21870	EAL/GGDEF	-	periplasmic tail-specific protease (Prc)	Membrana Citoplasmática
PA14_66320	GGDEF/EAL	-	peptide methionine sulfoxide reductase Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	Membrana Citoplasmática
PA14_26970	GGDEF	DGC	Hipotética Oxidoreductase molybdopterin binding domain	Membrana Citoplasmática
PA14_72420	GGDEF	DGC	Endonuclease/Exonuclease/phosphatase family	Citoplasma
PA14_53310	GGDEF	DGC	putative sulfate transport protein CysZ	Membrana Citoplasmática
PA14_49890	GGDEF	DGC	hypothetical protein periplasmic e type VI secretion system OmpA/MotB family protein	Membrana Citoplasmática
PA14_59790	EAL	PDE	pvrS.PvrR,RcsC, RcsB	Membrana Citoplasmática
PA14_36990	EAL	PDE	CupA1-5	Membrana Citoplasmática
PA14_36260	EAL	PDE	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase and related beta-hydroxyacid dehydrogenases, Putative NADP-dependent oxidoreductases... Antibiotic biosynthesis monooxygenase	Membrana Citoplasmática

Primeiramente, para testar a hipótese de que esses prováveis sistemas sensor/protease estariam envolvidos com a resistência a antibióticos, curvas de crescimento em concentrações subinibitórias de imipenem foram realizadas com os mutantes da protease PRC e do possível sensor PA14_21870. Foi possível observar que a linhagem mutante em *prc* apresentou uma sensibilidade maior ao antibiótico imipenem (Figura 21), enquanto o mutante no sensor demonstrou a mesma

sensibilidade que a linhagem PA14. Uma hipótese que foi levantada é que c-di-GMP estaria de certa forma regulando a atividade de Prc e que esta protease estaria envolvida na degradação de OprD.

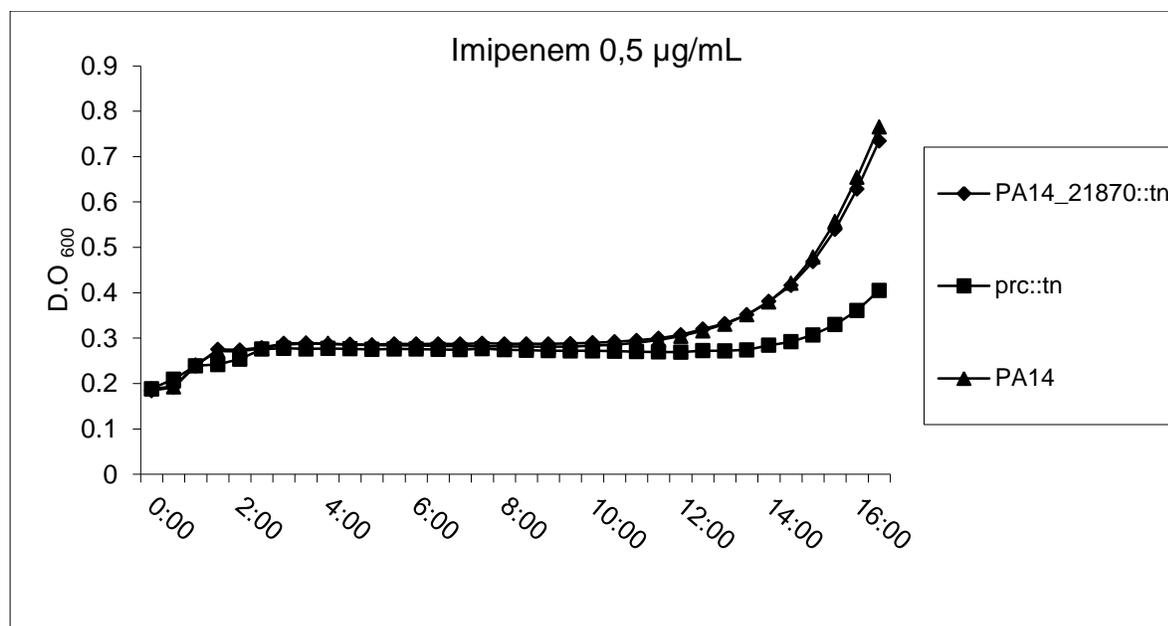


Figura 21 A mutação de PRC leva a uma maior sensibilidade ao antibiótico imipenem. Culturas foram incubadas na presença de 0,5 µg/ml de imipenem e o crescimento foi medido durante 24 horas, a cada 30 minutos.

Para testar essa hipótese, ensaios com mutantes no gene *prc* e no gene adjacente *PA14_21870* foram realizados em linhagens com altos e baixos níveis de c-di-GMP. A mutação do gene *prc* levou a um aumento na sensibilidade ao imipenem, como verificado anteriormente, mas a variação de c-di-GMP nessa linhagem causou nenhum efeito aparente. Já a mutação no gene *PA14_21870* tornou as células insensíveis a variações de c-di-GMP (Figura 22), sugerindo que este sensor tem um papel na resposta a c-di-GMP em concentrações subinibitórias de imipenem.

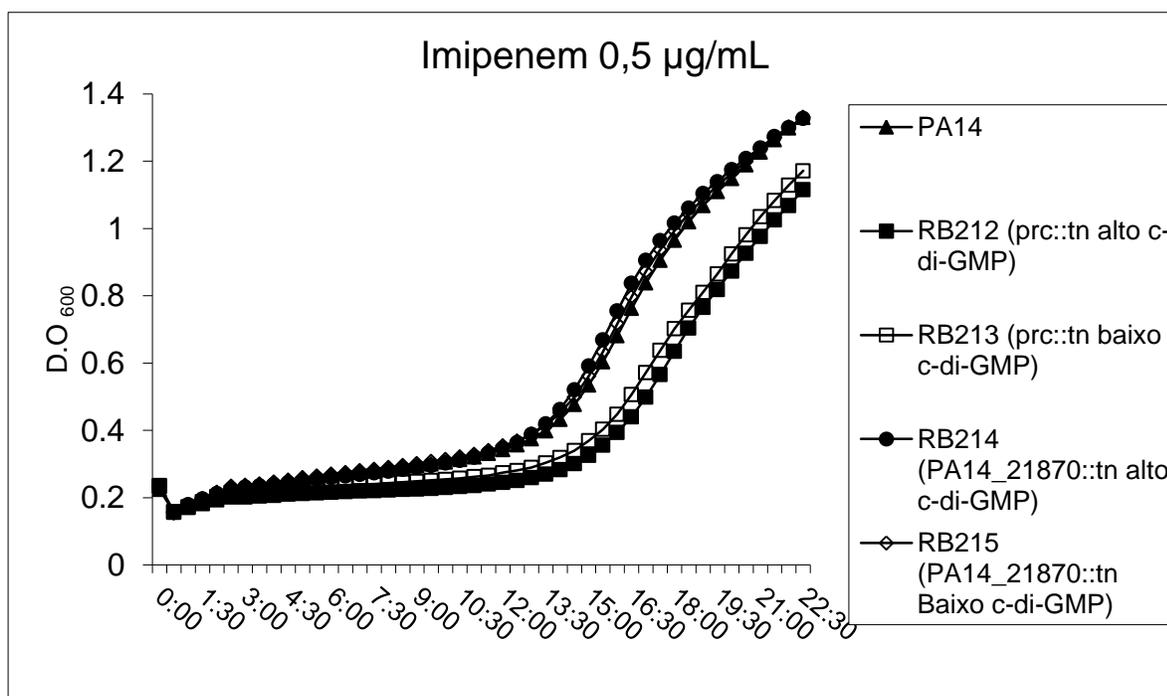


Figura 22 O envolvimento do sistema PRC/PA3258 na resposta a c-di-GMP. Culturas foram incubadas na presença de 0,5 µg/ml de imipenem e o crescimento foi medido durante 24 h, a cada 30 minutos.

O mesmo tipo de experimento foi repetido com linhagens mutantes em *lapD* ou *lapG*, porém estas se comportaram como a linhagem selvagem em condições de alto ou baixo c-di-GMP, sugerindo que estes genes não estão relacionados com a resistência a imipenem.

5. Discussão

Com o objetivo de encontrar genes regulados por c-di-GMP em todos os níveis de regulação, duas bibliotecas de fusão de tradução foram construídas e triadas. Ao todo mais de 9000 clones foram triados em duas condições diferentes e nenhuma região regulatória dependente de c-di-GMP foi encontrada.

Duas diferentes análises de transcriptoma de *P. aeruginosa* em alta concentração de c-di-GMP foram relatadas na literatura. Em uma delas, a linhagem selvagem PAO1 foi comparada com o mutante no gene *wspF* (Hickman, Tifrea et al. 2005). A proteína WspF é um regulador negativo da atividade de diguanilato ciclase de WspR e, portanto, quando o gene *wspF* está ausente, WspR se torna hiperativa, aumentando os níveis intracelulares de c-di-GMP. Nesse trabalho, mais de 400 genes foram diferencialmente expressos em alta concentração de c-di-GMP, dentre eles os genes *oprD* e *oprG* (identificados no presente trabalho através de géis bidimensionais como mais expressos em linhagens com baixo c-di-GMP), que tiveram expressão diminuída. Os autores desse trabalho questionaram o quanto a expressão dos genes é alterada especificamente por concentrações de c-di-GMP ou se é seria uma consequência do fenótipo auto-agregativo que linhagens com altos níveis de c-di-GMP apresentam. Em outro trabalho, uma análise foi realizada comparando a linhagem selvagem PAO1 com uma linhagem mutante nos genes *wspF*, *pslBCD* e *pelA*. As mutações nos genes de produção de exopolissacarídeo Pel e Psl fazem que as células não apresentem o fenótipo auto-agregativo em alta concentração de c-di-GMP, podendo assim se evidenciar diferenças relativas apenas às concentrações

intracelulares de c-di-GMP, independentemente da auto-agregação. Nesse trabalho foram revelados 48 genes regulados por c-di-GMP. Portanto, era esperado encontrar, através da triagem das bibliotecas realizada neste trabalho, pelo menos alguns genes regulados por c-di-GMP.

Durante a execução do trabalho, algumas hipóteses foram levantadas para justificar o motivo de não ter sido encontrado nenhum candidato de regulação de c-di-GMP pela triagem da biblioteca de fusão de tradução. Na biblioteca utilizada, o gene repórter de β -galactosidase está integrado em cópia única no cromossomo de *P. aeruginosa* e talvez o método utilizado não foi sensível o suficiente para se diferenciar as diferenças na expressão entre as duas condições, visto que pode haver um acúmulo de β -galactosidase nas células ao longo do tempo. Para que os níveis de atividade de β -gal sejam suficientes para sua dosagem, a região onde o transposon está inserida deve apresentar uma forte atividade promotora, ou as células precisam estar em uma fase de crescimento mais tardia, onde já houve acúmulo da enzima. Dosagens dos níveis intracelulares de c-di-GMP com células de *E. coli* mostraram que o momento com maior concentração dessa molécula dentro da célula é no início da fase estacionária (Spangler, Bohm et al. 2010), justamente o momento onde há o maior nível da expressão induzida pelo promotor de arabinose.

Durante a triagem, só foi possível detectar atividade de β -galactosidase quando as células estão em fase de crescimento celular tardio, o que pode não ter sido o ideal, pois é quando a concentração intracelular endógena de c-di-GMP está mais alta, independente da indução por arabinose. O aumento de c-di-GMP celular ocasionado

pela indução de PA14_72420 por arabinose poderia não estar influenciando os níveis de expressão de nenhum gene, pois nesta condição todos os genes que são regulados por níveis de c-di-GMP já estariam com sua expressão alterada, pois a célula já estaria no momento em que apresenta a maior concentração endógena de c-di-GMP e o aumento pela superexpressão de PA14_72420 não seria relevante.

Outra hipótese é que as proteínas reguladas por c-di-GMP são proteínas relacionadas com motilidade e fimbrias de adesão, sendo a maioria delas localizadas nas membranas ou no espaço periplasmático. Como a β -galactosidase só é ativa no citossol, as proteínas de fusão que fossem direcionadas ao envelope celular ou exportadas com os prováveis alvos não apresentariam atividade enzimática.

A fim de contornar essa dificuldade, uma nova biblioteca utilizando um transposon que integra o gene *phoA* em vez do gene *lacZ* foi construída pela aluna de iniciação científica Thays Pereira. O produto de *phoA* é a enzima fosfatase alcalina, que só é ativa quando presente no periplasma ou no meio extracelular. Entretanto, apesar de novas bibliotecas terem sido construídas, e três candidatos terem sido selecionados, a atividade de fosfatase alcalina não variou de maneira reprodutível nas duas condições, sendo que não foi possível encontrar genes regulados por c-di-GMP por essa estratégia.

Como alternativa, análises proteômicas através de géis bidimensionais foram realizadas para encontrar genes regulados por c-di-GMP. Após diversas etapas de otimização, condições ideais para esse experimentos foram encontradas. Trinta e uma proteínas cuja concentração varia de acordo com os níveis intracelulares de c-di-GMP

foram identificadas. Uma observação digna atenção é que algumas dessas proteínas já tiveram o seu papel caracterizado na resistência a determinados tipos de antibióticos.

Apesar de existir uma associação entre formação de biofilme, c-di-GMP e resistência a antibióticos, poucos estudos relacionam esses eventos de forma direta. Dois estudos apontaram uma correlação entre c-di-GMP e resistência aos aminoglicosídeos em *P. aeruginosa*. Drenkard e Ausubel (Drenkard and Ausubel 2002) mostraram que colônias de *P. aeruginosa* PA14, quando plaqueadas em concentrações subinibitórias de canamicina, crescem em dois tipos diferentes de morfologia, as colônias lisas do tipo selvagem, e uma variante de colônias pequenas e rugosas frequentemente encontradas em células derivadas de biofilme, as SCV. A superexpressão da fosfodiesterase PvrR em PA14 aumenta a frequência de colônias de tipo selvagem nessas condições. Em outro relato, Hoffman e colaboradores (Hoffman, D'Argenio et al. 2005) mostraram que a linhagem PAO1 é induzida a formar biofilmes quando incubada em concentrações subinibitórias dos antibióticos aminoglicosídeos tobramicina (tobramicina, gentamicina e amicacina) e que uma mutação na fosfodiesterase Arr aboliu essa indução.

Neste trabalho, nós demonstramos que os níveis de c-di-GMP regulam a produção de pelo menos cinco porinas de membrana externa (Figura 12), incluindo a proteína OprD (Figura 15). Imipenem é um antibiótico β -lactâmico comumente utilizado na suspeita de infecção por *P. aeruginosa* (Torres, 2006). OprD é a proteína responsável pela absorção de imipenem e a falta de OprD torna as células altamente resistentes a este antibiótico (Kohler et al, 1999, Ochs et al, 1999). Linhagens com altos

níveis de c-di-GMP apresentaram uma diminuição na expressão da proteína OprD e, conseqüentemente, um aumento na resistência a imipenem.

Nossas análises também demonstraram que, além dessas porinas, três proteínas envolvidas na degradação proteica (ClpA, HslU e PrlC) são reguladas por c-di-GMP (concentração aumentada em alto c-di-GMP). Proteases de membrana e citoplasmáticas têm sido associadas com resistência a antibióticos aminoglicosídeos (Hinz, Lee et al. 2011) e o papel de c-di-GMP no controle de proteases foi descrito recentemente (Kumagai, Matsuo et al. 2011; Navarro, Newell et al. 2011). A importância da impermeabilidade a aminoglicosídeos em isolados clínicos já foi evidenciada (Poole 2005) e a mudança no ambiente da membrana externa é provavelmente o responsável por este efeito. Embora o mecanismo exato da resistência a aminoglicosídeos ainda esteja por ser elucidado, é evidente que proteínas de membrana externa (Irvin, Govan et al. 1981; Nikaido 1989; Masuda, Sakagawa et al. 1995; Breidenstein, de la Fuente-Nunez et al. 2011) e proteases estão relacionadas com esse mecanismo (Hinz, Lee et al. 2011; Fernandez, Breidenstein et al. 2012). Ensaios de resistência demonstraram que a linhagem com baixos níveis de c-di-GMP analisada neste trabalho é mais resistente ao antibiótico tobramicina.

Interessantemente, apesar de observamos diferenças na expressão das porinas OprD, OprE, OprF, OprG e OpdC através de análises proteômicas, não observamos as mesmas diferenças nas análises transcricionais desses genes. Esses dados nos indicam que essas porinas podem estar sendo reguladas pós transcricionalmente por c-di-GMP. Recentemente, Newell e colaboradores demonstraram o papel de c-di-GMP na

regulação de uma protease citoplasmática (Newell, Monds et al. 2009) (discutido na seção 4.6). Através de análises do contexto genômico, nós identificamos uma par de genes transcritos em operon (*PA14_21870/prc*) que codifica uma proteína com domínio GGDEF sem função enzimática e uma protease periplasmática. Nós observamos que o mutações no gene *prc* torna as células mais sensíveis ao antibiótico imipenem e mutações no gene *PA14_21870* faz com que as células não apresentem variações na sensibilidade ao imipenem dependentes dos níveis de c-di-GMP, como a linhagem selvagem. Um possível modelo, análogo ao sistema LapADG, foi proposto, utilizando esses dados como base (Figura 23). A proteína *PA14_21870*, que apresenta um domínio GGDEF sem função enzimática, estaria atuando como um sensor de c-di-GMP: quando em altas concentrações desse nucleotídeo, ela estaria regulando positivamente a atividade de PRC, que regularia por sua vez a degradação de OprD.

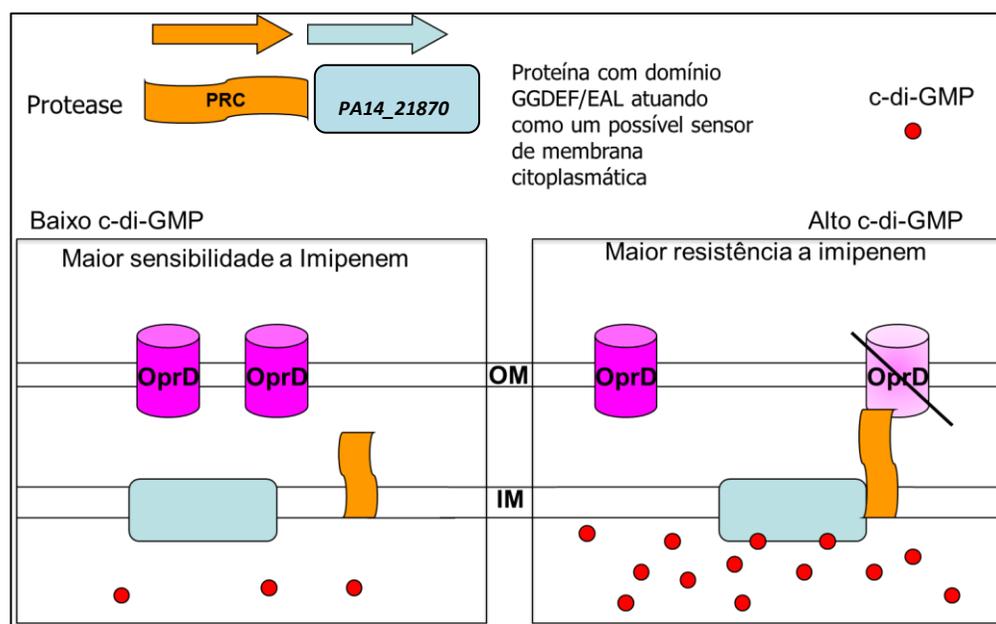


Figura 23 Modelo proposto da regulação pós-transcricional de OprD. A proteína *PA14_21870* atua como um sensor de c-di-GMP, regulando a atividade da protease PRC, que degradaria OprD.

Corroborando com os dados apresentados neste trabalho, células de *P. aeruginosa* na sua fase móvel do tipo “swarming” apresentam uma maior resistência a diversos antibióticos, incluindo tobramicina (Lai et al., 2009). Essas células apresentam baixas concentrações intracelulares de c-di-GMP comparadas com as células planctônicas. Esse aumento de resistência em células com baixos níveis de c-di-GMP explicaria por que a superexpressão de PvrR diminui os números de SCV na presença de concentrações sub inibitórias de canamicina (Drenkard, 2003): uma vez que as células superexpressando a fosfodiesterase PvrR estariam mais resistentes à exposição aos antibióticos, elas poderiam crescer como colônias do tipo selvagem, já que não estariam sob pressão para crescer como biofilmes. Esta hipótese também está de acordo com o fato de que os mutantes de *arr* não são capazes de formar biofilmes na presença de concentrações inibitórias de aminoglicosídeos (Hoffman et al., 2005). Uma explicação alternativa para o evento observado por Hoffman é que as células do tipo selvagem, na presença de aminoglicósidos, são capazes de modular a concentração c-di-GMP intracelular em resposta ao stress imposto por drogas, sobrevivendo na fase planctônica pelo menos até que elas se diferenciam em células de formação de biofilme. Já as células mutantes no gene *arr* não estariam crescendo em meio líquido com tobramicina na mesma taxa como o tipo selvagem, e deste modo não conseguindo iniciar a formação de biofilme.

O início da formação de biofilme depende de motilidade, que é favorecido por baixos níveis de c-di-GMP, para sobrepujar as forças de repulsão eletrostática com o substrato. Depois do contato inicial, as células precisam se aderir à superfície e iniciar o

biofilme, uma condição que é favorecida pela alta concentração de c-di-GMP. Uma vez no biofilme, as células se tornam mais resistentes a altas concentrações de antibióticos, seja por barreiras físicas ou por um processo de expressão diferencial.

Uma ação sinérgica dos antibióticos tobramicina e imipenem foi observada para *P. aeruginosa* apenas em suspensões bacterianas, mas não em uma estrutura semelhante a do biofilme (Coquet et al., 1998). Esse dado demonstra que diferenças nos estados fisiológicos de células planctônicas podem refletir na sensibilidade a antibióticos provavelmente devido a variações dos níveis intracelulares de c-di-GMP. Com isso, resistência a antibióticos, formação de biofilme e níveis intracelulares de c-di-GMP têm que ser considerados como várias etapas de regulação durante a adaptação e não podem ser vistos como partes indistinguíveis de um único evento.

6. Conclusões

- A estratégia de identificação de genes regulados por c-di-GMP através de bibliotecas de fusão de tradução não demonstrou sensibilidade suficiente.
- A concentração intracelular de c-di-GMP está relacionada com a expressão de pelo menos 31 proteínas.
- Cinco porinas de membrana (OprD, OprE, OprG, OprF e OpdC) são mais expressas em baixos níveis de c-di-GMP, entretanto c-di-GMP não está envolvido no controle transcricional desses genes.
- Células com altos níveis de c-di-GMP apresentam uma maior resistência ao antibiótico imipenem, o que confere a elas uma vantagem competitiva frente à linhagem selvagem.
- Células com altos níveis de c-di-GMP apresentam uma maior sensibilidade ao antibiótico tobramicina.
- O gene *prc* está envolvido na resistência a imipenem dependente dos níveis de c-di-GMP.
- Mutações no gene *PA14_21870* tornam as células insensíveis a variações de c-di-GMP quando testados fenótipos de resistência a imipenem.

7. Referências

- Alm, R. A., A. J. Boder, et al. (1996). "Identification of a novel gene, pilZ, essential for type 4 fimbrial biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*." J Bacteriol **178**(1): 46-53.
- Amikam, D. and M. Y. Galperin (2006). "PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein." Bioinformatics **22**(1): 3-6.
- Andrade, M. d. O. (2011). Estudo da sinalização celular envolvendo a via do quorum-sensing e os segundos mensageiros c-di-GMP e (p)ppGpp no fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv citi. Doutorado, Universidade de São Paulo.
- Ausubel, F. M., R. Brent, et al., Eds. (1996). Current Protocols in Molecular Biology. New York, John Wiley and Sons.
- Breidenstein, E. B., C. de la Fuente-Nunez, et al. (2011). "*Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance." Trends Microbiol **19**(8): 419-426.
- Brinkman, F. S., G. Schoofs, et al. (1999). "Influence of a putative ECF sigma factor on expression of the major outer membrane protein, OprF, in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens*." J Bacteriol **181**(16): 4746-4754.
- Cao, H., R. L. Baldini, et al. (2001). "Common mechanisms for pathogens of plants and animals." Annu Rev Phytopathol **39**: 259-284.
- Chan, C., R. Paul, et al. (2004). "Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(49): 17084-17089.
- Chen, W. P. and T. T. Kuo (1993). "A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA." Nucleic Acids Res **21**(9): 2260.
- Choi, K. H., J. B. Gaynor, et al. (2005). "A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system." Nat Methods **2**(6): 443-448.
- Choi, K. H. and H. P. Schweizer (2006). "mini-Tn7 insertion in bacteria with single *attTn7* sites: example *Pseudomonas aeruginosa*." Nat Protoc **1**(1): 153-161.
- Christen, B., M. Christen, et al. (2006). "Allosteric control of cyclic di-GMP signaling." J Biol Chem **281**(42): 32015-32024.
- Christen, M., B. Christen, et al. (2007). "DgrA is a member of a new family of cyclic diguanosine monophosphate receptors and controls flagellar motor function in *Caulobacter crescentus*." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(10): 4112-4117.
- Conlin, C. A., N. J. Trun, et al. (1992). "Escherichia coli prlC encodes an endopeptidase and is homologous to the Salmonella typhimurium opdA gene." Journal of Bacteriology **174**(18): 5881-5887.
- Costerton, J. W., Z. Lewandowski, et al. (1995). "Microbial biofilms." Annu Rev Microbiol **49**: 711-745.
- Costerton, J. W., P. S. Stewart, et al. (1999). "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections." Science **284**(5418): 1318-1322.
- Déziel, E., Y. Comeau, et al. (2001). "Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities." J Bacteriol **183**(4): 1195-1204.

- Drenkard, E. and F. M. Ausubel (2002). "*Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation." Nature **416**(6882): 740-743.
- Duerig, A., S. Abel, et al. (2009). "Second messenger-mediated spatiotemporal control of protein degradation regulates bacterial cell cycle progression." Genes Dev **23**(1): 93-104.
- Epp, S. F., T. Kohler, et al. (2001). "C-terminal region of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD modulates susceptibility to meropenem." Antimicrob Agents Chemother **45**(6): 1780-1787.
- Fernandez, L., E. B. Breidenstein, et al. (2012). "Role of intracellular proteases in the antibiotic resistance, motility, and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*." Antimicrob Agents Chemother **56**(2): 1128-1132.
- Fito-Boncompte, L., A. Chapalain, et al. (2010). "Full virulence of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprF." Infect Immun **79**(3): 1176-1186.
- Frimmersdorf, E., S. Horatzek, et al. (2010). "How *Pseudomonas aeruginosa* adapts to various environments: a metabolomic approach." Environmental microbiology **12**(6): 1734-1747.
- Galperin, M. Y. (2006). "Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations." J Bacteriol **188**(12): 4169-4182.
- Govan, J. R. and V. Deretic (1996). "Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*." Microbiol Rev **60**(3): 539-574.
- Hancock, R. E. (1998). "Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria." Clin Infect Dis **27 Suppl 1**: S93-99.
- Hancock, R. E. and F. S. Brinkman (2002). "Function of *pseudomonas* porins in uptake and efflux." Annu Rev Microbiol **56**: 17-38.
- Hancock, R. E. and D. P. Speert (2000). "Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment." Drug Resist Update **3**(4): 247-255.
- Hengge, R. (2009). "Principles of c-di-GMP signalling in bacteria." Nat Rev Micro **7**(4): 263-273.
- Hengge, R. (2010). "Cyclic-di-GMP reaches out into the bacterial RNA world." Sci Signal **3**(149): pe44.
- Hickman, J. W. and C. S. Harwood (2008). "Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor." Mol Microbiol **69**(2): 376-389.
- Hickman, J. W., D. F. Tifrea, et al. (2005). "A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(40): 14422-14427.
- Hinz, A., S. Lee, et al. (2011). "Membrane proteases and aminoglycoside antibiotic resistance." J Bacteriol **193**(18): 4790-4797.
- Hoang, T. T., R. R. Karkhoff-Schweizer, et al. (1998). "A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa*

- mutants." Gene **212**(1): 77-86.
- Hoffman, L. R., D. A. D'Argenio, et al. (2005). "Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation." Nature **436**(7054): 1171-1175.
- Hoiby, N. (1993). "Antibiotic therapy for chronic infection of *Pseudomonas* in the lung." Annu Rev Med **44**: 1-10.
- Irvin, R. T., J. W. Govan, et al. (1981). "Heterogeneity of antibiotic resistance in mucoid isolates of *Pseudomonas aeruginosa* obtained from cystic fibrosis patients: role of outer membrane proteins." Antimicrob Agents Chemother **19**(6): 1056-1063.
- Jacobs, M. A., A. Alwood, et al. (2003). "Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(24): 14339-14344.
- Kiewitz, C. and B. Tummler (2000). "Sequence diversity of *Pseudomonas aeruginosa*: impact on population structure and genome evolution." Journal of bacteriology **182**(11): 3125-3135.
- Kim, Y. H., Y. Lee, et al. (2006). "The role of periplasmic antioxidant enzymes (superoxide dismutase and thiol peroxidase) of the Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in the formation of biofilms." Proteomics **6**(23): 6181-6193.
- Kovacikova, G., W. Lin, et al. (2005). "Dual regulation of genes involved in acetoin biosynthesis and motility/biofilm formation by the virulence activator AphA and the acetate-responsive LysR-type regulator AlsR in *Vibrio cholerae*." Mol Microbiol **57**(2): 420-433.
- Kulasakara, H., V. Lee, et al. (2006). "Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3'-5')-cyclic-GMP in virulence." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(8): 2839-2844.
- Kumagai, Y., J. Matsuo, et al. (2011). "Cyclic dimeric GMP signaling regulates intracellular aggregation, sessility, and growth of *Ehrlichia chaffeensis*." Infect Immun **79**(10): 3905-3912.
- Lee, D. G., J. M. Urbach, et al. (2006). "Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial." Genome Biol **7**(10): R90.
- Lee, V. T., J. M. Matewish, et al. (2007). "A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production." Mol Microbiol **65**(6): 1474-1484.
- Lesic, B., F. Lepine, et al. (2007). "Inhibitors of pathogen intercellular signals as selective anti-infective compounds." PLoS Pathog **3**(9): 1229-1239.
- Liberati, N. T., J. M. Urbach, et al. (2006). "An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(8): 2833-2838.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $-2^{\Delta\Delta Ct}$ Method." Methods **25**(4): 402-408.
- Lyczak, J. B., C. L. Cannon, et al. (2000). "Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist." Microbes Infect **2**(9): 1051-1060.
- Masuda, N., E. Sakagawa, et al. (1995). "Outer membrane proteins responsible for multiple drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*." Antimicrob Agents Chemother **39**(3): 645-649.

- Mathee, K., G. Narasimhan, et al. (2008). "Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **105**(8): 3100-3105.
- Mathee, K., G. Narasimhan, et al. (2008). "Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(8): 3100-3105.
- Meireles, D. A. (2011). Estudo da função do gene *kerV* de *Pseudomonas aeruginosa*. PhD, Universidade de São Paulo.
- Meissner, A., V. Wild, et al. (2007). "*Pseudomonas aeruginosa* *cupA*-encoded fimbriae expression is regulated by a GGDEF and EAL domain-dependent modulation of the intracellular level of cyclic diguanylate." Environ Microbiol **9**(10): 2475-2485.
- Mendez-Ortiz, M. M., M. Hyodo, et al. (2006). "Genome-wide transcriptional profile of *Escherichia coli* in response to high levels of the second messenger 3',5'-cyclic diguanylic acid." J Biol Chem **281**(12): 8090-8099.
- Merighi, M., V. T. Lee, et al. (2007). "The second messenger bis-(3'-5')-cyclic-GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*." Mol Microbiol **65**(4): 876-895.
- Miller, J. H. (1972). Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Mutlu, G. M. and R. G. Wunderink (2006). "Severe pseudomonal infections." Curr Opin Crit Care **12**(5): 458-463.
- Navarro, M. V., P. D. Newell, et al. (2011). "Structural basis for c-di-GMP-mediated inside-out signaling controlling periplasmic proteolysis." PLoS Biol **9**(2): e1000588.
- Nestorovich, E. M., E. Sugawara, et al. (2006). "*Pseudomonas aeruginosa* porin OprF: properties of the channel." J Biol Chem **281**(24): 16230-16237.
- Newell, P. D., R. D. Monds, et al. (2009). "LapD is a bis-(3',5')-cyclic dimeric GMP-binding protein that regulates surface attachment by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(9): 3461-3466.
- Newman, J. R. and C. Fuqua (1999). "Broad-host-range expression vectors that carry the L-arabinose-inducible *Escherichia coli* *araBAD* promoter and the *araC* regulator." Gene **227**(2): 197-203.
- Nigaud, Y., P. Cosette, et al. (2010). "Biofilm-induced modifications in the proteome of *Pseudomonas aeruginosa* planktonic cells." Biochimica et biophysica acta **1804**(4): 957-966.
- Nikaido, H. (1989). "Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance." Antimicrob Agents Chemother **33**(11): 1831-1836.
- Ochs, M. M., M. P. McCusker, et al. (1999). "Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids." Antimicrob Agents Chemother **43**(5): 1085-1090.
- Poole, K. (2005). "Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*." Antimicrob Agents Chemother **49**(2): 479-487.
- Pratt, J. T., R. Tamayo, et al. (2007). "PilZ domain proteins bind cyclic diguanylate and regulate diverse processes in *Vibrio cholerae*." J Biol Chem **282**(17): 12860-12870.

- Rabilloud, T. (1998). "Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis." Electrophoresis **19**(5): 758-760.
- Rahme, L. G., E. J. Stevens, et al. (1995). "Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals." Science **268**(5219): 1899-1902.
- Romling, U. and D. Amikam (2006). "Cyclic di-GMP as a second messenger." Curr Opin Microbiol **9**(2): 218-228.
- Ross, P., H. Weinhouse, et al. (1987). "Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid." Nature **325**(6101): 279-281.
- Ryan, R. P., Y. Fouhy, et al. (2006). "Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover." PNAS **103**(17): 6712-6717.
- Ryan, R. P., J. Lucey, et al. (2009). "HD-GYP domain proteins regulate biofilm formation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*." Environ Microbiol **11**(5): 1126-1136.
- Ryjenkov, D. A., R. Simm, et al. (2006). "The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: the PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria." J Biol Chem **281**(41): 30310-30314.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, et al., Eds. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sauer, R. T. and T. A. Baker (2011). "AAA+ proteases: ATP-fueled machines of protein destruction." Annu Rev Biochem **80**: 587-612.
- Schmidt, A. J., D. A. Ryjenkov, et al. (2005). "The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: enzymatically active and inactive EAL domains." J Bacteriol **187**(14): 4774-4781.
- Silby, M. W., C. Winstanley, et al. (2011). "Pseudomonas genomes: diverse and adaptable." FEMS microbiology reviews **35**(4): 652-680.
- Silby, M. W., C. Winstanley, et al. (2011). "Pseudomonas genomes: diverse and adaptable." FEMS Microbiol Rev **35**(4): 652-680.
- Simm, R., M. Morr, et al. (2004). "GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility." Mol Microbiol **53**(4): 1123-1134.
- Simm, R., M. Morr, et al. (2009). "Quantitative determination of cyclic diguanosine monophosphate concentrations in nucleotide extracts of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry." Analytical biochemistry **386**(1): 53-58.
- Simon, R., U. Priefer, et al. (1983). "A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria." Biotechnology (N Y) **1**: 784-790.
- Simpson, R. J. (2003). Proteins and proteomics : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Singh, P. K., A. L. Schaefer, et al. (2000). "Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms." Nature **407**(6805): 762-764.
- Sonnleitner, E., M. Valentini, et al. (2012). "Novel targets of the CbrAB/Crc carbon catabolite control system revealed by transcript abundance in *Pseudomonas aeruginosa*." PloS one **7**(10): e44637.

- Spangler, C., A. Bohm, et al. (2010). "A liquid chromatography-coupled tandem mass spectrometry method for quantitation of cyclic di-guanosine monophosphate." J Microbiol Methods **81**(3): 226-231.
- Starkey, M., J. H. Hickman, et al. (2009). "*Pseudomonas aeruginosa* rugose small-colony variants have adaptations that likely promote persistence in the cystic fibrosis lung." J Bacteriol **191**(11): 3492-3503.
- Stover, C. K., X. Q. Pham, et al. (2000). "Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen." Nature **406**(6799): 959-964.
- Studier, F. W. and B. A. Moffatt (1986). "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes." J Mol Biol **189**(1): 113-130.
- Sudarsan, N., E. R. Lee, et al. (2008). "Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP." Science **321**(5887): 411-413.
- Tamayo, R., J. T. Pratt, et al. (2007). "Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis." Annu Rev Microbiol **61**: 131-148.
- Tan, M. W. (2002). "Cross-species infections and their analysis." Annu Rev Microbiol **56**: 539-565.
- Tremblay, J. and E. Déziel (2008). "Improving the reproducibility of *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility assays." J Basic Microbiol **48**(6): 509-515.
- Ueda, A. and T. K. Wood (2009). "Connecting quorum sensing, c-di-GMP, pel polysaccharide, and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* through tyrosine phosphatase TpbA (PA3885)." PLoS Pathog **5**(6): e1000483.
- Ueda, A. and T. K. Wood (2010). "Tyrosine Phosphatase TpbA of *Pseudomonas aeruginosa* Controls Extracellular DNA via Cyclic Diguanylic Acid Concentrations." Environmental microbiology **2**(3): 449-455.
- Van Delden, C. and B. H. Iglewski (1998). "Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections." Emerg Infect Dis **4**(4): 551-560.
- Weinhouse, H., S. Sapir, et al. (1997). "c-di-GMP-binding protein, a new factor regulating cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*." FEBS Lett **416**(2): 207-211.
- Westbrock-Wadman S, S. D., Hickey MJ, Coulter SN, Zhu YQ, Warrenner P, Nguyen LY, Shawar RM, Folger KR, Stover CK (1999). "Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump contributing to aminoglycoside impermeability." Antimicrob Agents Chemother. **43**(12): 2975-2983.
- Wiehlmann, L., A. Munder, et al. (2007). "Functional genomics of *Pseudomonas aeruginosa* to identify habitat-specific determinants of pathogenicity." Int J Med Microbiol **297**(7-8): 615-623.
- Winsor, G. L., R. Lo, et al. (2005). "*Pseudomonas aeruginosa* Genome Database and PseudoCAP: facilitating community-based, continually updated, genome annotation." Nucleic Acids Res **33**(Database issue): 338-343.
- Winsor, G. L., T. Van Rossum, et al. (2009). "*Pseudomonas* Genome Database: facilitating user-friendly, comprehensive comparisons of microbial genomes." Nucl. Acids Res. **37**(suppl_1): D483-488.
- Wolfe, A. J. and K. L. Visick (2008). "Get the message out: cyclic-Di-GMP regulates

multiple levels of flagellum-based motility." J Bacteriol **190**(2): 463-475.

Wolfgang, M. C., B. R. Kulasekara, et al. (2003). "Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(14): 8484-8489.

Súmula curricular

1. Dados Pessoais

Nome: Gianluca Gonçalves Nicastro

Nacionalidade: Brasileira

Data de nascimento: 20 de agosto de 1983

Endereço eletrônico: nicastro@iq.usp.br

2. Formação Acadêmica

Graduação

Bacharelado em Biomedicina

Fundação Lusíada, Unilus, Centro Universitário Lusíada, Santos – SP, fevereiro de 2001 a dezembro de 2004.

Estágios de Iniciação Científica

Preparação e controle de qualidade do ^{131}I -MB (Methylene Blue). Realizado no laboratório de Radio farmácia, Departamento de Produção, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, SP, de janeiro a julho de 2004, sob supervisão da Msc Marycel F. de Barboza.

Estabelecimento de culturas organotípicas que expressem a proteína E6 de papiloma vírus humano tipo 16 (HPV 16). Realizado no laboratório de virologia, pertencente ao Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, São Paulo, SP, de julho de 2004 a dezembro de 2004, sob supervisão da Prof. Dr Enrique Mario Boccardo Pierulivo. Bolsista CNPq

Pós-graduação

Mestrado em Bioquímica

Efeito dos reguladores de resposta PvrR e RcsB na motilidade, formação de biofilme e sua relação com a fímbria CupD de Pseudomonas aeruginosa PA14. Realizado no Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, de março de 2006 a dezembro de 2008, sob orientação da professora Dr^a Regina Lúcia Baldini. Bolsa CNPq

Doutorado em Bioquímica

Busca por alvos de regulação pelo segundo mensageiro c-diGMP em *Pseudomonas aeruginosa*. Realizado no Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, de janeiro de 2009 a abril de 2013, sob orientação da professora Dr^a Regina Lúcia Baldini. Bolsas Fapesp e CNPq

3. Monitorias de Pós-Graduação

Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE), Departamento de Bioquímica, USP, de março a julho de 2008. Disciplina QBQ0212 – Biologia Molecular, sob a supervisão da Profa. Dra. Aline Maria da Silva.

Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE), Departamento de Bioquímica, USP, de março a julho de 2008. Disciplina QBQ0215- Bioquímica: Estrutura de Biomoléculas e Metabolismo, sob a supervisão da Profa. Dra. Clélia Ferreira Terra.

4. Publicações

Artigos Científicos em Periódicos

NICASTRO, G G. ; BOECHAT, A. L. ; ABE, C. M. ; KAIHAMI, G. H. ; BALDINI, R. L. *Pseudomonas aeruginosa* PA14 *cupD* transcription is activated by the RcsB response regulator, but repressed by its putative cognate sensor RcsC . FEMS Microbiology Letters, v. 301, p. 115-123, 2009.

ZIMMER, K. R. ; MACEDO, A. J. ; GIORDANI, R. B. ; CONCEICAO, J. M. ; **NICASTRO, G. G.** ; BOECHAT, A. L. ; BALDINI, R. L. ; ABRAHAM, W. ; TERMIGNONI, C. . A steroidal molecule present in the egg wax of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* inhibits bacterial biofilms. Environmental Microbiology (Print), 2013 , v. 15, p. n/a-n/a, 2013; Meio de divulgação: Digital. Homepage; Série: 1; ISSN/ISBN: 14622912.

Manuscritos aceitos para publicação

ZIMMER, K. R. ; MACEDO, A. J. ; **NICASTRO, G. G.** ; BOECHAT, A. L.; BALDINI, R. L. ; TERMIGNONI, C. . Egg-wax from cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* inhibits *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. Ticks and Tick-borne Diseases, 2013.

Manuscritos submetidos para publicação

NICASTRO, G. G., KAIHAMI, G. H., PEREIRA, T O., GROLEAU, M.C., DÉZIEL, E. AND BALDINI, R. L. The role of c-di-GMP in *Pseudomonas aeruginosa* antibiotic resistance. *Submetido para publicação no periódico Environmental Microbiology*, em 18/02/2013.

5. Trabalhos apresentados em reuniões científicas

NICASTRO, G.G.; BOECHAT, A.L.; BALDINI, R.L. Expressão dos genes *cupD* presentes na ilha de patogenicidade PAPI-1 de *Pseudomonas aeruginosa* PA14. In: 53º Congresso Brasileiro de Genética 2007, 2007, Águas de Lindóia. **Trabalho escolhido para apresentação oral e premiado com menção honrosa (categoria Pós-graduação, Genética de Microrganismos).**

BOECHAT, A. L.; **NICASTRO, G. G.**; BALDINI, R.L. Expression of the putative fimbrial gene cluster *cupD* from *Pseudomonas aeruginosa* PA14 is regulated by genes present in the same pathogenicity island. In: American Society for Microbiology Conference on Pseudomonas, Seattle, 2007.

NICASTRO, G. G. ; BALDINI, R. L. . Functional characterization of *Pseudomonas aeruginosa* virulence-related genes located in a pathogenicity island.. In: XXVI Annual Meeting of the SBBq and 10th IUBMB Conference, 2007, Salvador. XXVI Annual Meeting of the SBBq and 10th IUBMB Conference, 2007.

BOECHAT, A. L.; **NICASTRO, G. G.** ; BALDINI, R. L. . Regulação da expressão da fímbria CupD por sistemas de dois componentes localizados na ilha de patogenicidade PAPI-1 de *Pseudomonas aeruginosa* PA14. In: 54º Congresso Brasileiro de Genética, e 26a Reunião de Genética de Microrganismos, 2008, Salvador, BA.

NICASTRO, G.G.; BOECHAT, A.L.; BALDINI, R.L. *Pseudomonas aeruginosa cupD* fimbrial genes in PAPI-1 are regulated by the RcsCB phosphorelay system. In: XXXVIII Annual Meeting of SBBq, 2009, Águas de Lindoia. XXXVIII Annual Meeting of SBBq, 2009.

MENEGASSO, P.; **NICASTRO, G.G.**; BALDINI, R.L. *Pseudomonas aeruginosa* phenotypic variation of *cupD* fimbrial genes. Poster apresentado na Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica, FCF-USP, outubro de 2009, e no evento Alunos na Ciência, IQ-USP, 2010.

NICASTRO, G.G.; BALDINI, R.L. Busca por alvos de regulação pelo segundo mensageiro c-diGMP em *Pseudomonas aeruginosa* PA14. Poster apresentado na 26ª Reunião de Genética de Microrganismos e no 56o. Congresso Nacional de Genética, Guarujá, SP, setembro de 2010. (**Prêmio de Melhor Poster de Genética de Microrganismos, 56º CBG**).

ZIMMER, K.R; GIORDANI, R.B.; **NICASTRO, G.G.**; BALDINI, R.L.; MACEDO, A.J.; TERMIGNONI, C. Modulação de biofilmes bacterianos por compostos obtidos de ovos do carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia, Foz do Iguaçu, PR, outubro de 2011.

ZIMMER, K. R. ; GIORDANI, R. B. ; **Nicastro, G.G.** ; Boechat, A.L. ; Baldini, R.L. ; Macedo, A.J. ; TERMIGNONI, C. . Modulation of bacterial biofilms by compounds obtained from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* eggs. In: 3rd Brazilian Conference on Natural Products (3rd BCNP), 2011, Ouro Preto.

NICASTRO GG, DÉZIEL E, BALDINI RL. Recherche de cibles régulées par le c-di-GMP chez *Pseudomonas aeruginosa* PA14. 7º Congrès Armand-Frappier. 2011. Estérel, Quebec, Canada.

NICASTRO GG, DÉZIEL E, BALDINI RL. Search for c-di-GMP regulation targets in *Pseudomonas aeruginosa*. 4th ASM Conference on Prokaryotic Cell Biology and Development. Search for c-di-GMP regulation targets in *Pseudomonas aeruginosa*. 2012, Montreal, Canada.

ZIMMER, K. R. ; MACEDO, A.J. ; GIORDANI, R. B. ; CONÇEICÃO, J. M. ; **NICASTRO, G.G.** ; BOECHAT, A. L. ; BALDINI, R. L. ; ABRAHAM, W. R. ; TERMIGNONI, C. . Anti-biofilm effect of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* egg wax against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. In: XXI ALAM Congresso Latino-Americano de Microbiologia, 2012, Santos. XXI ALAM Congresso Latino-Americano de Microbiologia, 2012. **Trabalho recebeu menção honrosa durante o XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia (XXI ALAM)**.

6. Prêmios recebidos

2012 Menção Honrosa 28ª Reunião de Genética de microorganismo, Sociedade Brasileira de Genética.

2012 Menção Honrosa 58º Congresso Brasileiro de Genética Prêmio Pós-Graduação, genética de microorganismos - Oral, Sociedade Brasileira de Genética.

2012 Menção Honrosa XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia, Associação Latinoamericana de Microbiologia.

2010 1º Lugar Prêmio Pós-Graduação Painel genética de microorganismos 56º Congresso Brasileiro de Genética, Sociedade Brasileira de Genética.

2007 Menção Honrosa Prêmio Pós Graduação, genética de microorganismos - Oral 53º Congresso Brasileiro de Genética, Sociedade Brasileira de Genética.