

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

ANA PAULA BARBOSA DO NASCIMENTO

**Um novo gene de *Pseudomonas aeruginosa* envolvido em
percepção de quórum**

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890
O original encontra-se disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

SÃO PAULO
Data do Depósito na SPG:
28/03/2014

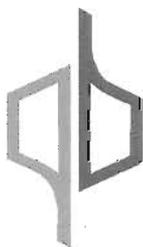
ANA PAULA BARBOSA DO NASCIMENTO

**Um novo gene de *Pseudomonas aeruginosa* envolvido em
percepção de quórum**

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

Orientadora: Professora Doutora Regina Lúcia Baldini

SÃO PAULO
2014



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

**“Um novo gene de *Pseudomonas aeruginosa*
envolvido em percepção de *quórum*”**

**ANA PAULA BARBOSA DO
NASCIMENTO**

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo
como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutora em Ciências - Área:
Bioquímica.

Aprovada por:

Profa. Dra. Regina Lúcia Baldini
Orientadora e Presidente

Profa. Dra. Suely Lopes Gomes
IQ - USP

Profa. Dra. Aline Maria da Silva
IQ - USP

Prof. Dr. Beny Spira
ICB - USP

Prof. Dr. Rodrigo da Silva Galhardo
ICB - USP

SÃO PAULO
10 de junho de 2014

"There's a lot of things you need to get across this universe. Warp drive, wormhole refractors... Do you know the thing you need most of all? You need a hand to hold." (The Doctor)

Aos meus pais, Geraldo e Nadir.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus a oportunidade da vida. Sem ti, querido Pai, não estaria aqui.

Agradeço as agências financiadoras, CAPES e FAPESP, o suporte ao projeto.

Agradeço a Universidade de São Paulo e o Instituto de Química a infraestrutura acadêmica.

Agradeço a Doutora Regina Lúcia Baldini a confiança na minha capacidade de realizar este trabalho. Mais que isso, agradeço a orientação, a amizade, o carinho e os conselhos dados a respeito da caminhada científica e da vida. Compartilhar da sua experiência acrescentou apenas bons aspectos à minha formação como profissional e como pessoa.

Agradeço a Doutora Suely Lopes Gomes a disposição do espaço físico, os recursos e o zelo pela organização sempre impecáveis do ambiente de trabalho.

Agradeço aos membros que compuseram minha banca de qualificação, os Doutores Daniela Sanchez Basseres, Maria Terêsa Machini e Beny Spira, as críticas construtivas e sugestões.

Agradeço o Doutor Bayardo Baptista Torres o ensino da Bioquímica de maneira tão fluída e prazerosa, sem assistir suas aulas jamais teria sido capaz de iniciar esta jornada.

Agradeço a todos os professores que contribuíram para a realização deste trabalho e para a minha formação acadêmica através de aulas, discussões informais e acesso a equipamentos e reagentes, em especial a Doutora Marilis do Valle Marques.

Agradeço aos amigos do grupo de pesquisa das professoras Regina e Suely. Desde 2005, quando iniciei meu estágio no laboratório, até o atual momento, muitas pessoas passaram por minha vida e deixaram sua contribuição. São elas: Sérgio, Cristina, Michelle, Humberto, Rogério, André, Tie, Raphaela, Karina, César, Christian, Anne, Patrícia, Eliezer, Diogo, Gabriela, Duílio, Juliana, Thays, Larissa, Gilberto, Gianluca, Viviane, Ana Luíza e Talita. Agradeço os valiosos momentos de discussão científica, mas também a amizade e os momentos de descontração compartilhados ao longo desses anos.

Agradeço a Ana Laura, que poderia estar no parágrafo anterior, mas merece um destaque especial pois durante esses anos permitiu que eu compartilhasse de sua vida e ousou dizer que nos tornamos grandes amigas. Agradeço a confiança, o carinho, o abrigo, a paciência em ouvir todas as minhas bobagens.

Agradeço as profissionais, Luci, Sandra, Ivone, Dóris e Nilde, a competência nos serviços prestados, indispensáveis para a realização deste trabalho. Agradeço também o carinho e atenção dedicados.

Agradeço aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação o auxílio e a orientação prestadas sempre que necessário.

Agradeço aos competentes médicos ortopedistas, Doutores Luciano, Carlos, Cleverton, Adriano, Daniella e Raphael, responsáveis pelo tratamento médico que se sobrepôs ao período da realização deste projeto, mas que pela importância para minha vida pessoal refletiu na minha formação profissional, me incentivando a perseverar e alcançar meus objetivos.

Agradeço aos meus pais que nunca pouparam esforços para me proporcionar uma educação de excelência. Se eu fui capaz de chegar até aqui, devo tudo a eles.

Agradeço a toda família, irmã, cunhado, tios, tias, primos, primas e minha querida sobrinha que tanto ilumina minha vida. Agradeço o amor incondicional, a dedicação, o suporte nos momentos difíceis e todas as alegrias compartilhadas. Vocês são meus exemplos, meu incentivo pra seguir em frente.

Agradeço aos velhos e novos amigos que permaneceram ao meu lado mesmo com todas as mudanças, a falta de tempo e a distância. Vocês são essenciais.

Agradeço ao Leonardo o companheirismo. Jamais me esquecerei todo o carinho e todas os momentos bons que compartilhamos ao longo desses anos.

Agradeço ao Daniel a ajuda e os momentos felizes que amenizaram o estresse nos instantes finais desta caminhada.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e para minha realização pessoal em concluir mais esta etapa da vida.

"In every job that must be done, there's an element of fun. You find the fun, and - SNAP - the job's a game!" (Poppins, M.)

RESUMO

Nascimento, A.P.B. **Um novo gene de *Pseudomonas aeruginosa* envolvido em percepção de quórum**. 2014. 80 p. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Pseudomonas aeruginosa é uma gamaproteobactéria com capacidade de colonizar diversos tipos de ambiente e infectar hospedeiros filogeneticamente distintos. Em humanos, comporta-se como um patógeno oportunista, estando frequentemente relacionada à infecções em indivíduos imunocomprometidos e indivíduos portadores de fibrose cística. Um mecanismo importante para a versatilidade de *P. aeruginosa* é o sistema de percepção de quórum (QS), onde a bactéria pode vincular expressão gênica à densidade populacional e às características do ambiente. Atualmente, sabe-se que muitos outros reguladores estão interligados com QS, entre eles, a proteína reguladora RsmA e os pequenos RNAs RsmZ e RsmY. Além disso, diversos fatores importantes para a patogenicidade da bactéria são reguladas por QS.

Em *P. aeruginosa* PA14, um fator importante para a patogenicidade em diversos hospedeiros é a proteína KerV, cujo envolvimento com QS foi descrito pela primeira vez neste trabalho. A linhagem D12, que possui uma deleção no gene *kerV*, mostrou alterações em fenótipos regulados por QS, como a maior produção de piocianina, composto que contribui para virulência e persistência das infecções causada por *P. aeruginosa*. Por ser facilmente detectável e pela regulação de sua síntese não ter sido completamente explorada em PA14, a expressão dos genes responsáveis pela produção de piocianina é um interessante repórter na investigação do possível envolvimento de KerV com QS. Além de piocianina, D12 apresenta níveis reduzidos de ramnolipídeos. Esses fenótipos somados se assemelham aos fenótipos da mutação de *rsmA*, sugerindo o envolvimento de KerV com os sistemas QS e Gac-Rsm direta ou indiretamente.

Neste trabalho, mostramos que KerV exerce um efeito negativo na regulação dos operons *phz1* e *phz2*, responsáveis pela síntese de piocianina, alterando a expressão desses genes. KerV exerce também um efeito positivo na expressão da proteína RsmA, responsável

pela repressão de diversos genes alvos, onde RsmA se liga ao sítio de ligação ao ribossomo no mRNA, impedindo a tradução. Ensaio de *gel shift* mostraram que a ligação direta de RsmA na sequência líder de *phzA1* e *phzA2* ocorre, elucidando a maneira pela qual KerV está envolvido na regulação da expressão dos operons *phz* em *P. aeruginosa* PA14.

Mostramos também que *phz2* é ativo e contribui para a síntese de piocianina, pois na ausência de *phz1*, os níveis do pigmento são maiores do que aqueles detectados em PA14. Isso sugere uma maior expressão de *phz2* e uma regulação diferencial dos operons de acordo com as condições ambientais como possível estratégia para manter os níveis desse composto. Uma evidência dessa regulação diferencial é vista no mutante *lasR*. Na fase inicial de crescimento, esse mutante não produz piocianina, porém quando exposto a tempos mais longos de cultivo, a produção de piocianina é maior quando comparada a PA14. Isso é reflexo da ativação da expressão de *phz1* no mutante *lasR* em fase estacionária tardia, enquanto *phz2* permanece não expresso. Isso indica que *phz2* é dependente de LasR, ainda que indiretamente. Já *phz1*, embora tenha sua expressão influenciada por LasR no estágio inicial de crescimento, na fase estacionária é regulado por outros fatores independentes de *las*.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*, percepção de quórum, regulação gênica, piocianina.

ABSTRACT

Nascimento, A.P.B. **A novel gene involved in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing**. 2014. 80 p. PhD Thesis. Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Pseudomonas aeruginosa is a gammaproteobacterium that colonizes several environments and infects phylogenetically distinct hosts. It behaves as an opportunistic pathogen in humans, often related to infection in immunocompromised individuals and cystic fibrosis patients. An important mechanism for *P. aeruginosa* versatility is the quorum sensing (QS) network, that allows bacteria to link gene expression to population density and environmental traits. Several additional regulators are interconnected with QS, as the regulatory mRNA binding protein RsmA and the non-coding small RNAs RsmZ and RsmY. Furthermore, key factors for pathogenicity are QS-regulated.

In *P. aeruginosa* PA14, an important pathogenicity-related factor is the KerV protein, described for the first time here as involved in QS. D12 strain, that harbor a deletion in the *kerV* gene, shows alterations in QS-regulated phenotypes, such as high production of pyocyanin, a compound that contributes to virulence and persistence of *P. aeruginosa* infections. As the production of pyocyanin is easily detected and all mechanisms involved in its synthesis regulation are not fully described, the expression of genes responsible for production of this pigment is a good reporter to investigate KerV involvement in the QS network. Additionally, D12 also shows lower levels of rhamnolipids, another QS-regulated trait. Taken together, these phenotypes resemble the effects of a *rsmA* mutation, suggesting KerV involvement with QS and Gac-Rsm systems.

In this work, we propose that KerV exerts a negative effect in the regulation of *phz1* and *phz2* operons, responsible for pyocyanin synthesis, by altering the expression of these genes. KerV also has a positive effect on *rsmA* expression, responsible for the repression of several genes by blocking the ribosome binding site preventing the translation. Gel shift assays showed that RsmA binds directly in the leader sequence of *phzA1* and *phzA2*, elucidating the manner in which KerV is involved in the regulation of *phz* operons expression in *P. aeruginosa*

PA14.

We also demonstrate that *phz2* is actively expressed and contributes to pyocyanin production in PA14, since in the *phz1* mutant the levels of pyocyanin are even higher than in the wild type strain. This suggests a *phz2* higher expression and a differential regulation of *phz* operons according to environmental changes as a mechanism to maintain the levels of pyocyanin synthesis. An evidence for this regulation is the synthesis of pyocyanin by the *lasR* mutant, which does not make pyocyanin at early growth stages. However, at late stationary phase, pyocyanin production is even higher than in the wild-type strain, reflecting the LasR-independent regulation of *phz1* expression, while *phz2* operon remains silent.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, quorum sensing, gene regulation, pyocyanin.

LISTA DE FIGURAS

1	A diversidade funcional e ambiental de <i>Pseudomonas</i> spp.	18
2	A rede reguladora de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
3	Dinâmica da produção dos autoindutores C12, C4 e PQS por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14	21
4	Cascata de percepção de quórum em <i>P. aeruginosa</i>	22
5	<i>P. aeruginosa</i> D12 apresenta uma maior produção de piocianina, é defectiva na produção de ramnolipídeos e no <i>swarming</i>	27
6	Produção dos autoindutores C12, C4 e PQS pelo mutante D12	28
7	Estrutura química da piocianina, fenazina sintetizada por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
8	Validação do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$	39
9	Sistema mini-Tn7 de clonagem e integração	41
10	Organização de <i>kerV</i> no genoma de <i>P. aeruginosa</i>	47
11	Análise <i>in silico</i> da região promotora do gene <i>kerV</i>	49
12	Regiões promotoras dos genes <i>pqsA</i> e <i>kerV</i> e a presença do <i>LysR-box</i>	50
13	Efeito dos reguladores transcricionais do sistema QS sobre a transcrição do gene <i>kerV</i>	50
14	Comparação dos níveis de produção de piocianina na linhagem selvagem PA14 e no mutante D12	51
15	Efeito de KerV sobre a expressão dos reguladores transcricionais de percepção de quórum	52
16	Efeito de KerV na transcrição de <i>mvfR</i>	53
17	Efeito de KerV na atividade promotora dos operons <i>phz</i>	54
18	Níveis relativos de mRNA dos operons <i>phz</i> em D12	55
19	Efeito de KerV na transcrição dos operons <i>phz</i>	56
20	Efeito de KerV na tradução dos operons <i>phz</i>	57
21	Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas PhzA1 e PhzA2 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14	58
22	<i>Immunoblots</i> com soros obtidos após imunização de coelhos com GST-PhzA1 e GST-PhzA2	58
23	Reconhecimento cruzado dos soros policlonais anti-PhzA1 e anti-PhzA2	59
24	Efeito de KerV sobre a expressão de <i>rsmA</i>	60
25	Efeito de KerV sobre a transcrição de <i>rsmA</i>	61
26	Reatividade do soro policlonal obtido após imunização com a proteína recombinante His ₆ -RsmA	61
27	Efeito de KerV sobre a transcrição dos pequenos RNAs RsmZ e RsmY	62
28	Organização da região promotora do gene <i>phzA1</i> de <i>P. aeruginosa</i> PA14	63
29	Organização da região promotora do gene <i>phzA2</i> de <i>P. aeruginosa</i> PA14	64
30	Predição das estruturas secundárias das regiões 5' não traduzidas dos genes <i>phzA1</i> e <i>phzA2</i>	66
31	Predição da estrutura secundária da região 5' não traduzida do gene <i>kerV</i>	66
32	Ensaio de retardamento de migração de RNA em gel de poliacrilamida: controles.	67
33	Ensaio de retardamento de migração de RNA em gel de poliacrilamida: <i>phzA1</i> , <i>phzA2</i> e <i>kerV</i>	68
34	Efeito de LasR sobre os níveis relativos de mRNA de <i>phzA1</i> e <i>phzA2</i>	69
35	Efeito de LasR sobre a transcrição dos genes <i>phzA1</i> e <i>phzA2</i>	70
36	Importância do <i>lux-box</i> na expressão dos operons <i>phz</i>	71
37	Esquema ilustrado das conclusões obtidas neste trabalho	74

LISTA DE TABELAS

1	Linhagens, vetores e plasmídeos	33
2	Composição dos meios de cultura	35
3	Oligonucleotídeos	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHL	Acil-homoserina lactona
Ap	Ampicilina
BCA	Ácido bicinconínico
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Albumina de soro bovino
C12	<i>N</i> -(3-oxododecanoil)-L-homoserina lactona
C4	<i>N</i> -butanoil-L-homoserina lactona
Cb	Carbenicilina
cDNA	DNA complementar
CPM	Contagem por minuto
CTAB	Brometo de cetil-trimetil-amônio
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO	Densidade óptica
DOC	Desoxicolato de sódio
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Gm	Gentamicina
GST	Glutaciona-S-transferase
HAQ	4-hidroxi-2-alquilquinolina
HHQ	4-hidroxi-2-heptilquinolina
Km	Canamicina
LB	Caldo lisogênico
MCS	Múltiplos sítios de clonagem
MOPS	Ácido 3-(<i>N</i> -morfolino)propanosulfônico
mRNA	RNA mensageiro
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NBT	Azul de nitrotetrazólio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ONPG	<i>Orto</i> -nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo
ORF	Quadro aberto de leitura
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato-salino
PCA	Ácido fenazina-1-carboxílico
PCN	Fenazina-1-carboxiamida
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PQS	Quinolona sinal de <i>Pseudomonas</i>
qRT-PCR	RT-PCR quantitativo
QS	Percepção de quórum
RACE	Amplificação rápida das extremidades de cDNA
RBS	Sítio de ligação ao ribossomo
RCF	Força centrífuga relativa
RNA	Ácido ribonucléico
RPM	Rotação por minuto
RT-PCR	Reação da transcriptase reversa seguida de PCR

SAM	S-adenosil-metionina
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
SSDNA	Serviço de sequenciamento de DNA
TBE	Tampão Tris-borato-EDTA
TBS	Tampão Tris-salino
TCEP	Tris-(2-carboxietil)-fosfina
Tet	Tetraciclina
Tn	Transposon
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

1	Introdução	17
1.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
1.1.1	Percepção de quórum	19
1.1.1.1	Reguladores transcricionais do tipo LuxR	22
1.1.1.2	Reguladores transcricionais do tipo LysR	23
1.1.2	Sistema Gac-Rsm	24
1.2	Modelos de estudo: linhagens PA14 e D12	25
1.2.1	Piocianina como repórter para investigação da relação de KerV com o sistema QS	28
2	Objetivos	32
3	Materiais e Métodos	33
3.1	Linhagens, condições de cultura, plasmídeos e oligonucleotídeos	33
3.2	Técnicas Básicas de Biologia Molecular	36
3.3	Estudo da organização de genes em operon utilizando RT-PCR	37
3.4	Análise de expressão gênica por RT-PCR quantitativo (qRT-PCR)	38
3.4.1	Validação do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$	38
3.5	Quantificação de piocianina	39
3.6	Obtenção de linhagens repórteres para ensaios de atividade da enzima β -galactosidase	40
3.6.1	Uso dos vetores mini-Tn7	40
3.7	Ensaio de atividade da enzima β -galactosidase	41
3.7.1	Adaptação do protocolo para ensaio em microplacas de 96 poços	42
3.8	Ensaio de amplificação rápida das extremidades de cDNA (RACE)	43
3.9	Expressão de proteínas recombinantes	44
3.10	Obtenção de soro policlonal em coelhos	44
3.11	Ensaio de immunoblotting	45
3.12	Ensaio de retardamento de migração de RNA em gel de poliacrilamida (<i>gel shift</i>)	45
4	Resultados e Discussão	47
4.1	Determinação da organização de <i>kerV</i> em operon com os genes <i>rnhA</i> e <i>dnaQ</i>	47
4.2	Expressão de <i>kerV</i> em linhagens mutantes em genes envolvidos em percepção de quórum	48
4.3	Quantificação de piocianina no mutante D12	51
4.4	Influência de KerV na expressão dos genes envolvidos em QS	51
4.5	Efeito de KerV na expressão dos operons responsáveis pela síntese de piocianina	53
4.6	KerV afeta a expressão de RsmA, mas não dos pequenos RNAs RsmY e RsmZ	59
4.7	Regulação da expressão dos operons <i>phz</i> por RsmA	62
4.7.1	Determinação do início de transcrição dos operons <i>phz</i>	62
4.7.2	Predição da estrutura secundária dos mRNAs de <i>phzA1</i> e <i>phzA2</i>	65
4.7.3	RsmA liga diretamente nas sequências líder dos operons <i>phz</i>	65
4.8	O mutante <i>lasR</i> é capaz de produzir piocianina em fase estacionária tardia	68
5	Conclusões	73
6	Referências Bibliográficas	75

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Pertencente ao grupo das gamaproteobactérias, o gênero *Pseudomonas* é composto por diversas espécies destacadas por uma extraordinária versatilidade metabólica e fisiológica, que permite a colonização de diferentes ambientes bióticos e abióticos. Há décadas vem sendo estudado devido sua importância como agente causador de doenças em plantas e animais, bem como seu potencial em aplicações biotecnológicas (figura 1) (Silby *et al.*, 2011).

Dentre as espécies componentes do gênero está *Pseudomonas aeruginosa*, capaz de infectar uma variedade de hospedeiros, como protozoários, insetos, plantas e mamíferos. Muito conhecida por se comportar como patógeno oportunista em humanos, *P. aeruginosa* é responsável por cerca de 10 a 20% de todas as infecções hospitalares (Ikeno *et al.*, 2007; Mahajan-Miklos *et al.*, 2000). Ainda, é frequentemente associada a infecções em indivíduos imunocomprometidos, como portadores de fibrose cística, pacientes sujeitos à quimioterapia, queimados graves, entre outros (Lyczak *et al.*, 2000; Wagner e Iglewski, 2008).

O tratamento das infecções causadas por *P. aeruginosa* utilizando antibióticos convencionais tem se tornado cada vez mais ineficiente, devido a resistência intrínseca da bactéria pela ação de bombas de efluxo ou pela aquisição de mecanismos de resistência (Lee *et al.*, 2006; Westbrook-Wadman *et al.*, 1999; Wiehlmann *et al.*, 2007). Além disso, a persistência de formas tolerantes a antibióticos também contribui para sua difícil erradicação (Drenkard, 2003).

Uma abordagem alternativa para o combate à *P. aeruginosa* é o uso de drogas anti-infectivas, tendo como alvo a inibição de fatores envolvidos na patogenicidade, sem interromper o metabolismo da bactéria ou do hospedeiro, causando menores efeitos colaterais. Adicionalmente, evitando uma pressão seletiva que favoreça à aquisição de resistência pelo patógeno (Lesic *et al.*, 2007). Para que tais drogas sejam desenvolvidas e sejam efetivas, os mecanismos responsáveis pela adaptação e virulência da bactéria devem ser compreendidos em detalhes.

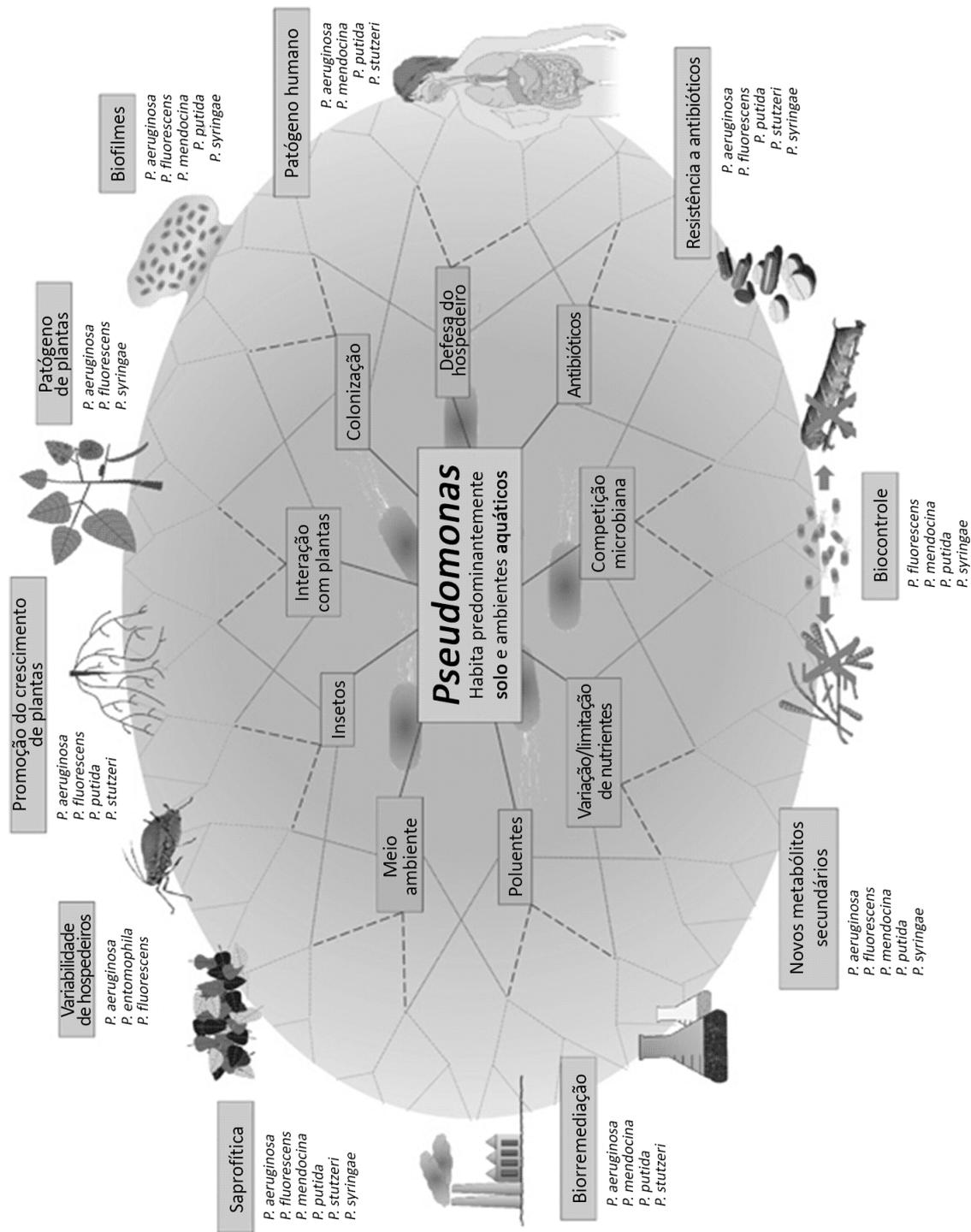


Figura 1. A diversidade funcional e ambiental de *Pseudomonas* spp. O ancestral comum do gênero *Pseudomonas* encontrou uma variedade de ambientes bióticos e abióticos que levou à evolução de diversas características e estilos de vida com significativa sobreposição entre as espécies. Adaptado de Silby *et al.* (2011).

O primeiro sequenciamento completo do genoma de *P. aeruginosa* ocorreu no ano 2000 (Stover *et al.*, 2000) e forneceu uma percepção inicial da base da versatilidade e resistência dessa bactéria. Atualmente, o genoma completo de diversas linhagens está anotado e disponível em: www.pseudomonas.com/viewAllGenomes.do, endereço eletrônico do projeto *Pseudomonas Genome Database* (Winsor *et al.*, 2011). O repertório genético da bactéria reflete o modo de vida dessa espécie. A versatilidade metabólica é fornecida por genes codificando não somente enzimas de vias metabólicas, mas também um grande número de reguladores transcricionais e sistemas de dois componentes. Os genomas das linhagens de *P. aeruginosa* são maiores que aqueles da maioria das bactérias sequenciadas e variam em tamanho de 5,5 a 7 Mpb (Klockgether *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2006; Ramos, 2004; Stover *et al.*, 2000).

A virulência de *P. aeruginosa* compreende determinantes associados à célula (lipopolissacarídeos, pili, flagelo) e diversos fatores secretados (elastases, proteases, exotoxinas, piocianina, polissacarídeos extracelulares). Outras características, como a formação de biofilmes, motilidade, resistência a antibióticos, transição do estado agudo para o estado crônico da infecção, são igualmente importantes para a persistência do patógeno. Todos esses fenótipos são finamente controlados por uma vasta rede de mecanismos reguladores que se sobrepõem (figura 2). Essa regulação gênica é um processo complexo que envolve diversos reguladores transcricionais e ácidos ribonucléicos (RNA) reguladores, garantindo o sucesso das infecções causadas pela bactéria (Balasubramanian *et al.*, 2013; Coggan e Wolfgang, 2012).

1.1.1 Percepção de quórum

Percepção de quórum, do inglês *quorum sensing* (QS), é um termo usado para enfatizar o fato de que um número suficiente de bactérias, um quórum bacteriano, é necessário para induzir ou reprimir a expressão coordenada de um determinado conjunto de genes. Isso porque a bactéria é capaz de coordenar seu comportamento através da produção e secreção de pequenas moléculas sinalizadoras difusíveis, os autoindutores, de maneira dependente da densidade populacional. Durante o crescimento bacteriano, há o acúmulo de autoindutores intra e extracelularmente e, quando uma concentração limite é atingida, essas moléculas

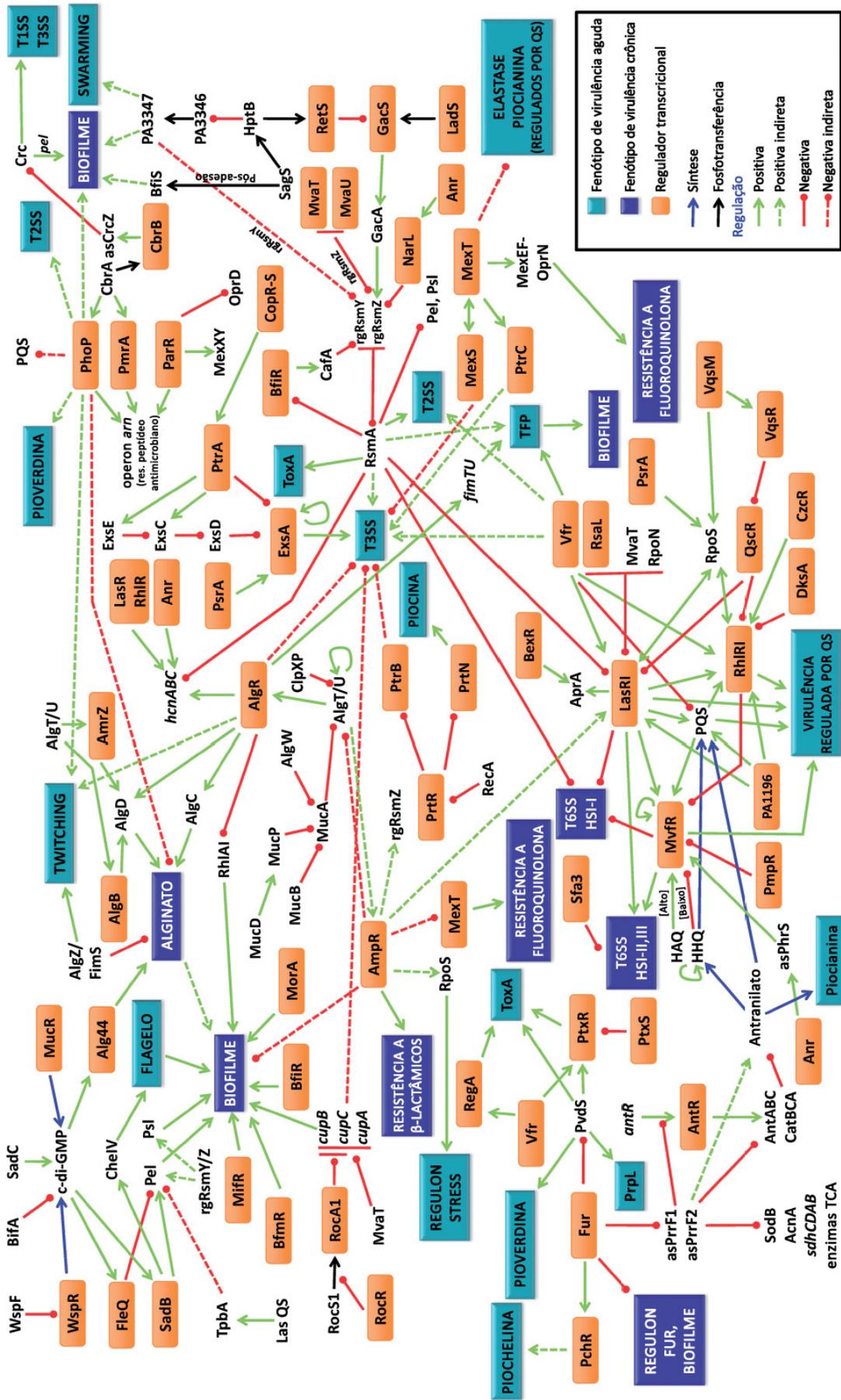


Figura 2. A rede reguladora de *Pseudomonas aeruginosa*. Adaptado de Balasubramanian et al. (2013).

ativam sistemas reguladores, o que desencadeia a expressão de certos grupos de genes (Juhás *et al.*, 2005).

P. aeruginosa produz uma variedade de compostos que funcionam como autoindutores. Entre eles, as acil-homoserina lactonas (AHLs): *N*-(3-oxododecanoil)-L-homoserina lactona (C12) e *N*-butiril-L-homoserina lactona (C4), que fazem parte dos sistemas do tipo LuxRI, *las* e *rhl*, respectivamente; e a quinolona sinal de *Pseudomonas* (PQS): 3,4-dihidroxi-2-heptilquinolona, que está envolvida na cascata reguladora de MvfR, entre os sistemas *las* e *rhl* (Wade *et al.*, 2005). A figura 3, ilustra a dinâmica da produção desses autoindutores, que parece obedecer a hierarquia observada para QS, com o sistema *las* sendo o primeiro a atuar durante o crescimento bacteriano, seguido por *rhl* e intermediados por MvfR (Dekimpe e Déziel, 2009; Wagner *et al.*, 2007).

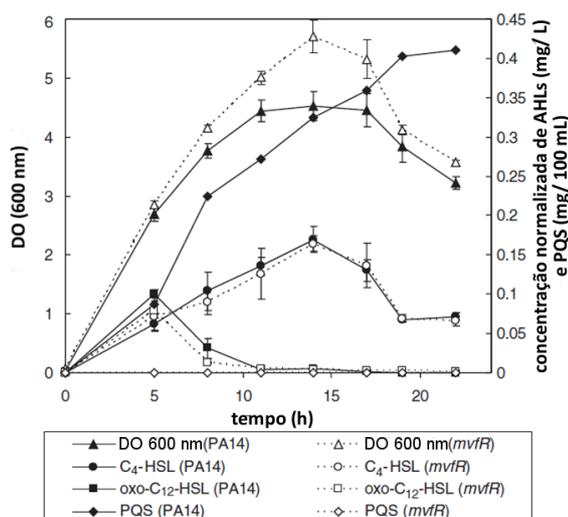


Figura 3. Dinâmica da produção dos autoindutores C12, C4 e PQS por *Pseudomonas aeruginosa* PA14. Adaptado de (Déziel *et al.*, 2005).

A ativação da maioria dos genes controlados por QS parece não ser desencadeada apenas pelo acúmulo de sinal e sofre influência de fatores adicionais (figura 4), como o fator sigma RpoS, os ativadores Vfr e QscR e a proteína H-NS MvaT. Entre esses fatores está também a via de transdução de sinal de dois componentes GacA-GacS, que controla o sistema de regulação pós-transcricional Rsm (Schuster e Greenberg, 2007).

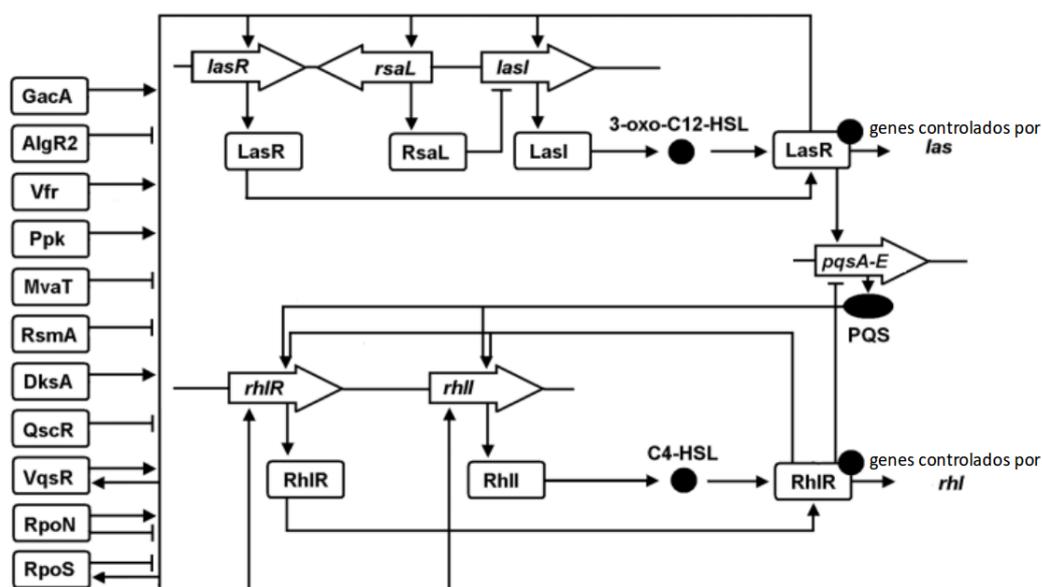


Figura 4. Cascata de percepção de quórum em *P. aeruginosa*. Os dois sistemas *las* e *rhl* são arranjados hierarquicamente e estão sujeitos a modulação por vários reguladores adicionais, que ajustam com precisão a resposta mediada por QS do organismo (→ ativação; ⊥ inibição). Adaptado de Juhas *et al.* (2005). Neste esquema não estão considerados os genes regulados por MvfR-PQS.

1.1.1.1 Reguladores transcricionais do tipo LuxR

Os sistemas *las* e *rhl* consistem de uma proteína reguladora (proteína R), LasR e RhIR, e de sua molécula sinalizadora cognata, C12 produzida pela sintase LasI e C4 produzida por RhlI. Alcançando a concentração intracelular limite do autoindutor cognato, a proteína R se liga a ele para formar um complexo que regula a expressão de genes alvos (Wagner *et al.*, 2007), pela ligação do complexo proteína R-autoindutor a sequências palindrômicas chamadas *lux-box*, presentes na região promotora desses genes. Porém, apenas uma pequena porcentagem dos promotores de genes controlados por QS possuem esses boxes e a maioria deles parece ser regulada de forma indireta (Schuster e Greenberg, 2006). Adicionalmente, estudos mostram que alguns genes diretamente regulados por QS codificam reguladores transcricionais conhecidos ou hipotéticos, sugerindo que eles possam atuar abaixo dos sistemas *las* e *rhl*, ativando ou reprimindo a transcrição de genes identificados como regulados por QS (Wagner *et al.*, 2007).

Alguns genes podem estar sob o controle de ambos os sistemas, outros podem apenas ser especificamente regulados por um deles. Além disso, *las* e *rhl* também estão sujeitos a regulação por vários fatores reguladores adicionais (Juhas *et al.*, 2005). Apesar de C4

não ativar LasR, nem C12 ativar RhIR, os dois sistemas estão intimamente conectados e são auto-regulados, formando uma cascata reguladora. LasR-C12 positivamente regula *lasI*, criando um *feedback* positivo. LasR-C12 também regula a expressão de *rhIR*, e RhIR-C4 então regula a transcrição de *rhlI* resultando na amplificação do sinal (Wade *et al.*, 2005). Além disso, a atividade de RhIR é controlada de maneira pós-transcricional por *las*, uma vez que C12 pode se associar a RhIR impedindo sua ligação a C4 (Pesci *et al.*, 1997).

Outros dois reguladores transcricionais do tipo LuxR envolvidos na cascata de percepção de quorum são QscR e VqsR. QscR não possui uma molécula sinalizadora cognata, mas pode se ligar com menor especificidade a C12. Diferente dos outros reguladores transcricionais envolvidos no sistema, QscR é conhecido por sua ação majoritariamente repressora sobre um conjunto específico de genes alvo regulados também pelos outros ativadores (Fuqua, 2006). VqsR, cuja expressão é ativada transcricionalmente por LasR-C12, não possui domínio de ligação a AHLs, mas é essencial para a produção dessas moléculas sinalizadoras, bem como para a expressão de muitos genes sob controle de QS. VqsR também influencia a expressão de QscR, pois se liga a região promotora desse gene reprimindo sua transcrição (Juhás *et al.*, 2004; Liang *et al.*, 2012).

1.1.1.2 Reguladores transcricionais do tipo LysR

PQS, uma das 4-hidroxi-2-alkilquinolinas (HAQs) produzidas por *Pseudomonas*, atua sobre a expressão de um subgrupo de genes controlados por QS e participa da cascata reguladora intermediando os sistemas *las* e *rhl*. A síntese de PQS requer várias enzimas codificadas pelos operons *pqsABCDE*, *phnAB*, o gene *pqsH* e o regulador transcricional MvfR, também conhecido por PqsR (Déziel *et al.*, 2004). Os sistemas *las* e *rhl* também controlam a síntese de PQS indiretamente, sendo positivamente regulada por *las*, mas estando sob controle negativo de *rhl*; por outro lado, PQS regula positivamente a expressão de RhII, favorecendo o acúmulo de C4 (Juhás *et al.*, 2005).

MvfR é um homólogo de LysR que é necessário para a produção de vários compostos secretados, incluindo fatores de virulência, além de PQS (Déziel *et al.*, 2004). Homólogos de LysR geralmente funcionam em conjunto com um coindutor e interagem com uma sequência simétrica T-N₁₁-A do ácido desoxirribonucléico (DNA) próxima a região -35 de

um promotor (Schell, 1993; Wade *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 2006a). Os operons *phn* e *pqs* são exemplos de genes alvos desse regulador transcricional. *phnAB* direciona a produção de ácido antranílico, precursor primário das HAQs; enquanto *pqsABCDE* direciona a produção de 4-hidroxi-2-heptilquinolina (HHQ) a partir de HAQ. HHQ é convertido a PQS pela monooxigenase produto do gene *pqsH* (Déziel *et al.*, 2004; Lesic *et al.*, 2007). Ambos, HHQ e PQS funcionam como coindutores de MvfR para induzir a transcrição dos genes por ele regulados (Déziel *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 2006a).

Por sua vez, a transcrição de *mvfR* é regulada pelos sistemas *las* e *rhl*. Um evento regulador competitivo ocorre no promotor de *mvfR*, com LasR-C12 e RhlR-C4 induzindo e reprimindo o gene, respectivamente. LasR-C12 também exerce efeito positivo na expressão de *pqsH*. MvfR então interage com PQS e o complexo MvfR-PQS atua sobre seus genes alvos. MvfR-PQS tem um efeito positivo sobre *rhlI*, levando a um *feedback* negativo na produção de PQS (Wade *et al.*, 2005).

1.1.2 Sistema Gac-Rsm

O sistema de dois componentes GacA-GacS é composto de uma proteína quinase sensora GacS, que sofre autofosforilação em resposta a um sinal ainda desconhecido e transfere o grupo fosfato ao regulador de resposta GacA, que fosforilado desencadeia a expressão de seus genes alvos. O sistema Gac está envolvido no controle da produção de metabólitos secundários e enzimas extracelulares envolvidas em patogenicidade. Opera uma mudança entre os metabolismos primário e secundário, com um maior envolvimento de mecanismos pós-transcricionais (Heeb e Haas, 2001).

A ação pós-transcricional de GacA-GacS sobre QS se dá através dos pequenos RNAs reguladores: RsmY e RsmZ, e da proteína de ligação ao RNA: RsmA (Juhás *et al.*, 2004). A proteína reguladora RsmA é um elemento de controle negativo na formação de vários produtos extracelulares, assim como na produção de AHLs. Quando RsmA exerce um efeito negativo na expressão gênica, ela impede o início da tradução e favorece a rápida degradação de um RNA mensageiro (mRNA) alvo, por se ligar ao sítio de ligação do ribossomo (RBS) ou próximo a ele nesse mRNA (Burrowes *et al.*, 2006; Heurlier *et al.*, 2004). RsmA também exerce controle positivo sobre determinados fatores de virulência por um mecanismo ainda não conhecido.

CsrA, proteína reguladora de *Escherichia coli* da qual RsmA é homóloga, exerce esse efeito positivo por se ligar ao segmento 5' de um mRNA estimulando sua tradução e aumentando sua meia-vida (Heurlier *et al.*, 2004; Kay *et al.*, 2006).

Ambos os efeitos de RsmA, positivo e negativo, podem ser antagonizados pelos RNAs não codificadores, RsmY e RsmZ. Isto porque esses RNAs sequestram múltiplas cópias dessa proteína, titulando sua atividade. A transcrição de RsmY e RsmZ é regulada positivamente por GacA. Adicionalmente, os promotores de *rsmY* e *rsmZ* são positivamente controlados por RsmA e negativamente por RsmY e RsmZ. Análise de linhagens mutantes em *gacA* ou *rsmA* mostram níveis consideravelmente reduzidos de transcrito RsmY. Esse efeito se mostra mais forte no mutante *rsmA* que no mutante *gacA*. Padrões análogos são observados na expressão de RsmZ, e linhagens superexpressando RsmA também resultam na superexpressão de RsmZ. Além disso, a inserção de fusões de transcrição *rsmY-lacZ* e *rsmZ-lacZ* no cromossomo de linhagens apresentando dupla mutação *rsmY rsmZ* apresentam expressão de ambas as fusões nitidamente elevadas quando comparadas à linhagem selvagem, confirmando regulação negativa por RsmY e RsmZ sobre sua própria expressão (Heurlier *et al.*, 2004; Kay *et al.*, 2006).

A respeito do efeito antagônico a RsmA, RsmY também atua em paralelo com RsmZ. Até certo ponto, ambos RNAs parecem ter função redundante (Kay *et al.*, 2006), contudo eles diferem em pelo menos um aspecto: a estabilização pelo regulador global Hfq. A proteína Hfq se liga especificamente a RsmY e estabiliza esse RNA, que por sua vez inativa RsmA. Hfq não estabiliza RsmZ (Sonnleitner *et al.*, 2006).

1.2 Modelos de estudo: linhagens PA14 e D12

Pseudomonas aeruginosa UCBPP-PA14 (PA14) é um isolado clínico de paciente vítima de queimadura. É significativamente mais virulenta que a linhagem PAO1, podendo infectar uma variedade de hospedeiros, incluindo camundongos, plantas, insetos e nematódeos (Mahajan-Miklos *et al.*, 2000; Rahme *et al.*, 1995).

O genoma de PA14 foi completamente sequenciado e consiste de um cromossomo de 6,54 Mb, com 5973 quadros abertos de leitura identificados (Lee *et al.*, 2006). Seu genoma abriga ilhas de patogenicidade e mostra um extenso grau de conservação de genes de

virulência que contribuem marcadamente para sua capacidade de infectar vários hospedeiros (Kukavica-Ibrulj *et al.*, 2008). Duas ilhas de patogenicidade, PAPI-1 e PAPI-2, foram identificadas nessa linhagem e a maioria dos genes dentro dessas ilhas são homólogos a genes encontrados em outros patógenos infectando plantas e animais. Os produtos da expressão desses genes parecem ser fatores adicionais na patogenicidade de PA14 (Cao *et al.*, 2001a; He *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2006).

A alta virulência de PA14 e sua capacidade de adaptação a diferentes ambientes fazem dessa linhagem um modelo atraente para estudo dos genes e mecanismos envolvidos na sua patogenicidade e para busca de novos alvos para estratégias terapêuticas.

Um dos genes importantes para a patogenicidade em diversos hospedeiros e que está presente no genoma de todas as linhagens sequenciadas foi isolado a partir da análise de um mutante selecionado de uma biblioteca obtida pela inserção de um transposon e denominado 33C7 (Rahme *et al.*, 1997). O gene interrompido, anotado como PA14_41070 (PA1814 em PAO1) e posteriormente denominado *kerV* (An *et al.*, 2009), presente fora da região das ilhas de patogenicidade, também parece desempenhar uma importante função na regulação da patogenicidade. Isto ficou evidenciado ao observar um fenótipo atenuado em virulência da linhagem mutante D12 (derivada da linhagem PA14 que apresenta uma deleção em fase de leitura em *kerV*) em vários modelos de hospedeiro, especialmente pela não inibição da síntese de peptídeos antimicrobianos em *Drosophila melanogaster* (An *et al.*, 2009; Apidianakis *et al.*, 2005). Homólogos de *kerV* também são importantes para a virulência de *Vibrio cholerae* e *Yersinia pseudotuberculosis* (An *et al.*, 2009).

O produto de *kerV* não tem similaridade com genes de função conhecida, mas KerV apresenta um domínio metiltransferase dependente de S-adenosil-metionina (SAM). Nenhuma outra informação foi encontrada em pesquisas nas bases de dados Pfam (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=pfam08241>) ou Entrez (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=4381036) que mostrassem qualquer similaridade com motivos de ligação ao DNA ou RNA, nem domínios de interação proteína-proteína. Ensaio realizado em nosso laboratório não trouxe resultados conclusivos sobre o provável substrato de KerV (Meiros, 2011).

A linhagem D12, além do fenótipo atenuado em virulência, apresenta menor produção

de ramnolipídeos e maior produção de piocianina do que PA14 (Meireles, 2011) (figura 5). Como ambas as características são reguladas através do sistema QS, a expressão de diversos genes sabidamente envolvidos nesse sistema foram analisados, encontrando-se numerosas diferenças entre PA14 e D12, o que sugere que a função do gene *kerV* está de maneira direta ou indiretamente envolvida num passo de regulação gênica, provavelmente acima do sistema QS. Outra característica apresentada por esta linhagem é ser parcialmente defectiva nas motilidades do tipo *twitching* e *swarming* (figura 5). Enquanto a linhagem D12 apresenta um atraso na formação do *swarming* quando comparado com a linhagem selvagem, no *twitching* a linhagem D12 apresenta uma morfologia do centro da colônia alterada (Meireles, 2011). Outro dado importante se refere aos resultados de transcriptoma da linhagem D12 (Rahme, L.G., dados não publicados). Foi observado que há mais de 500 genes que são pelo menos 3 vezes induzidos ou reprimidos na linhagem D12 em relação a PA14.

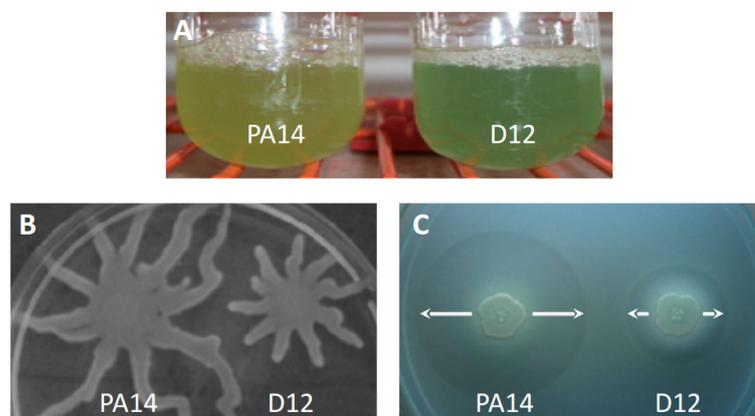


Figura 5. *P. aeruginosa* D12 apresenta uma maior produção de piocianina, é defectiva na produção de ramnolipídeos e no *swarming*. (A) Aspecto visual das culturas de D12 em meio LB, apresentando uma coloração verde mais intensa, dada pela maior produção de piocianina. (B) Ensaio de motilidade do tipo *swarming* em placas de meio semi-sólido. (C) Produção de ramnolipídeos em meio contendo CTAB e azul de metileno é visualizada através da formação de um halo transparente ao redor da colônia. Adaptado de Meireles (2011).

Apesar dessa alteração fenotípica, apenas a síntese de C12 está aumentada em D12, estando os demais autoindutores com níveis semelhantes a PA14 (figura 6). Embora apresente esse aumento nos níveis de C12, a dinâmica da produção dos autoindutores em D12 não é alterada em relação a PA14.

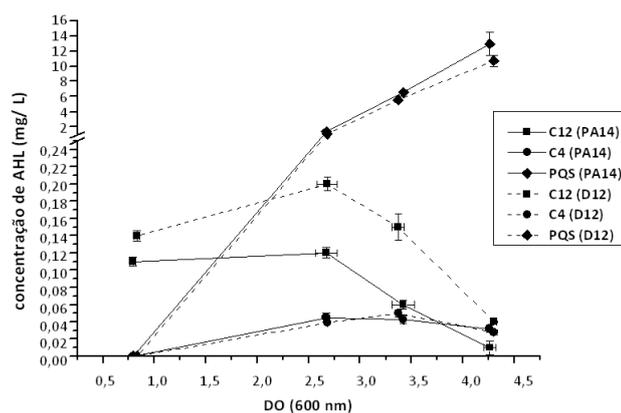


Figura 6. Produção dos autoindutores C12, C4 e PQS pelo mutante D12 (Déziel, E., dados não publicados).

1.2.1 Píocianina como repórter para investigação da relação de KerV com o sistema QS

Fenazinas são compostos heterocíclicos contendo nitrogênio, frequentemente secretados em altos níveis durante o crescimento bacteriano *in vitro*, tipicamente pigmentados, cuja cor varia de acordo com a natureza e a posição de substituintes no anel heterocíclico (Mavrodi *et al.*, 2006). Esses metabólitos biologicamente ativos atuam na fisiologia celular (Price-Whelan *et al.*, 2007), na competitividade bacteriana, na supressão de fitopatógenos presentes no solo e na virulência em humanos e animais (Mavrodi *et al.*, 2001).

A píocianina (figura 7) é a principal fenazina produzida por *P. aeruginosa* PA14, contribui tanto para a virulência quanto para a extraordinária persistência das infecções causadas pela bactéria. Esse composto é altamente tóxico devido sua habilidade de participar de reações de óxido-redução que depletam as células de NADH, glutatona e outros antioxidantes. Sua atividade redox gera oxidantes como superóxidos e peróxidos, substâncias ligadas a vários fenômenos celulares que aumentam a patogênese e a habilidade de *P. aeruginosa* sobreviver (Lau *et al.*, 2004; Parsons *et al.*, 2007).

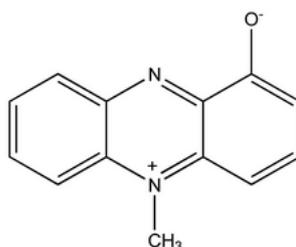


Figura 7. Estrutura química da píocianina, fenazina sintetizada por *Pseudomonas aeruginosa*. Retirado de Parsons *et al.* (2007).

Fisiologicamente, o potencial de redução de piocianina é alto o bastante para permitir sua redução por NADH e glutatona, mas também é baixo o bastante para permitir a transferência de elétrons para oxidantes ambientalmente relevantes, tais como oxigênio, nitrato e íon férrico. *Pseudomonas* oxida fontes de carbono através da via Entner-Doudoroff e do ciclo do ácido cítrico. Vários passos dessas vias estão acoplados a redução de NAD^+ a NADH, que deve então ser reoxidado para que as vias prossigam. Na ausência de outros aceptores finais de elétrons para essa reoxidação, piocianina pode reagir com o NADH acumulado e liberar piruvato no meio extracelular, facilitando a homeostase intracelular. Este papel fisiológico é coerente com o fato da síntese de fenazinas ser induzida por QS sob alta densidade celular, uma condição correlacionada com a limitação de aceptores de elétrons (Hernandez e Newman, 2001; Price-Whelan *et al.*, 2007).

A produção de piocianina pode ser facilmente observada, uma vez que culturas bacterianas produzindo esse composto têm sua cor caracteristicamente azul - forma oxidada da piocianina - e são convertidas para "sem cor- forma reduzida - se deixadas em repouso ou em condições anaeróbicas (Hernandez e Newman, 2001; Price-Whelan *et al.*, 2007).

P. aeruginosa contém duas cópias completas de um operon com sete genes codificando enzimas responsáveis pela síntese do ácido fenazina-1-carboxílico (PCA), precursor da piocianina, a partir de ácido corísmico, sendo eles *phzA1B1C1D1E1F1G1* e *phzA2B2C2D2E2F2G2* (referidos neste trabalho como *phz1* e *phz2*, respectivamente). Contém também três genes adicionais, *phzM*, *phzS* e *phzH*, codificando enzimas envolvidas na conversão de PCA a piocianina e fenazina-1-carboxiamida (PCN) (Mavrodi *et al.*, 2001). A produção de fenazinas acontece principalmente no início da fase estacionária e é regulada por QS e pelo sistema Gac-Rsm (Mavrodi *et al.*, 2001; Pesci *et al.*, 1997). O sistema Gac-Rsm ativa QS primeiramente estimulando a produção de C4. C4 ativa o regulador transcricional RhIR. RhIR é requerido para produção de fatores de virulência, em particular exoprodutos dependentes de *rhl*, incluindo piocianina (Heurlier *et al.*, 2004). *phz1* é precedido por um *lux-box*. De maneira interessante, tal elemento não foi relatado precedendo o operon *phz2* (Mavrodi *et al.*, 2001; Whiteley e Greenberg, 2001). Isto sugere que a presença de dois operons para biossíntese de fenazinas diferentemente regulados possa dar à bactéria grande modulação na quantidade ou no limite de fenazinas produzidas dependendo da fase de crescimento ou sinais ambientais.

RsmA exerce o efeito oposto a GacA na produção de piocianina. Experimentos com *Pseudomonas* mostram que um mutante *rsmA* produz quantidade elevada de piocianina comparado à linhagem selvagem e linhagens superexpressando RsmA produzem dez vezes menos piocianina que a linhagem selvagem, evidenciando o efeito negativo de RsmA na produção deste metabólito (Pessi *et al.*, 2001). Da mesma maneira, duplos mutantes *rsmY rsmZ* produziram menos piocianina que a linhagem selvagem, enquanto mutantes em *rsmY* ou *rsmZ* mostraram níveis intermediários desse exoproducto, reafirmando o controle positivo do sistema Gac-Rsm na produção de piocianina mediado por RsmY e RsmZ (Kay *et al.*, 2006).

A síntese de piocianina depende ainda de ambos, PQS e PqsE. Mutantes *pqsE* não apresentam produção deficiente de HAQs ou PQS, mas são deficientes na produção de piocianina. Embora seja um fenótipo controlado pelo sistema *rhl*, a produção de C4 e a expressão de *rhlI* e *rhlR* não são afetadas no mutante *pqsE*, bem como no mutante *mvfR* (Déziel *et al.*, 2005).

Em *P. aeruginosa* PAO1, o mutante *phzC1* não apresenta produção de piocianina, inferindo-se que o operon *phz2* não é funcional nesta linhagem (Whiteley *et al.*, 1999). Porém, na linhagem PA14 os dois operons são ativos e aparentemente regulados de maneira diversa da descrita para PAO1. Mutantes PAO1/*asR* são completamente desprovidos de piocianina, enquanto PA14/*asR* apresenta sua produção apenas em fase estacionária tardia (Cabeen, 2014). Apesar dos muitos trabalhos sobre piocianina, a regulação de sua expressão não foi completamente explorada e possivelmente existam outros pontos de controle distintos para os dois operons *phz* em PA14. Um exemplo das particularidades possíveis para diferentes linhagens, apesar da homologia entre suas sequências, é a regulação dos operons *phz* descrita para a linhagem *P. aeruginosa* M18. Essa linhagem produz predominantemente a fenazina PCA. Os autores sugerem que a síntese desse composto sofre um ciclo regulatório onde uma pequena quantidade de PCA produzida por *phz2* é capaz de ativar a expressão de *phz1*. Além disso, foi demonstrado que GacA exerce um efeito negativo sobre a expressão dos operons. Em M18, RsmA reprime a expressão de *phz1* e ativa a expressão de *phz2*, ligando-se diretamente na região 5' UTR destes genes, bloqueando o RBS no mRNA de *phz1* impedindo a tradução, enquanto estabiliza uma estrutura secundária em *phz2* que facilita o acesso do ribossomo ao transcrito (Li *et al.*, 2011; Ren *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2013).

Quanto ao efeito de KerV sobre o sistema QS, é interessante notar a semelhança de fenótipos entre a linhagem D12 e o mutante *rsmA*, sugerindo a possibilidade de uma relação entre esse gene e o sistema Gac-Rsm, intimamente ligado a QS, e enfatizando a necessidade de maiores estudos para esclarecer qual a influência de KerV na complexa rede regulatória de *P. aeruginosa*.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi investigar o papel da proteína KerV na cascata de regulação de percepção de quórum em *Pseudomonas aeruginosa*. Para alcançar esse objetivo foram utilizadas as seguintes abordagens:

- Verificar se *kerV* está em operon com os genes a jusante *rnhA* e *dnaQ*, determinar seu início de transcrição e buscar na região promotora sequências importantes para sua regulação;
- Verificar se a expressão de *kerV* sofre influência de genes reguladores de percepção de quórum;
- Analisar se a expressão de genes da cascata de percepção de quórum sofre influência de KerV;
- Analisar a expressão dos operons de síntese de piocianina em PA14 e no mutante *kerV* e compará-la com os resultados em outras linhagens isogênicas com mutações em genes envolvidos na percepção de quórum, como *lasR*, *rhlR*, *mvfR*, *qscR* e *rsmA*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagens, condições de cultura, plasmídeos e oligonucleotídeos

Linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* foram cultivadas a 37°C em meio de cultura pertinente ao experimento realizado acrescido de antibióticos, quando necessário, nas seguintes concentrações: carbenicilina 300 µg/ mL, canamicina 250 µg/ mL e gentamicina 30 µg/ mL para *P. aeruginosa*; ampicilina 100 µg/ mL, ácido nalidíxico 20 µg/ mL, canamicina 50 µg/ mL e gentamicina 10 µg/ mL para *E. coli*.

A descrição das linhagens e plasmídeos utilizados está listada na tabela 1. As linhagens construídas neste trabalho serão descritas nas subseções abaixo. A composição dos meios de cultura está disponível na tabela 2.

Tabela 1. Linhagens, vetores e plasmídeos

LINHAGENS, VETORES E PLASMÍDEOS	CARACTERÍSTICAS	FONTE OU REFERÊNCIA
<i>E. coli</i>		
DH5α	<i>supE44 lacU169(80 lacZM15) hsdR17 recA1 endA11 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Invitrogen
S17-1	<i>recA thi pro hsdR</i> (res ⁻ mod ⁺)(RP4::2-Tc::Mu-Km::Tn7) λ <i>pir</i>	Simon <i>et al.</i> , 1983
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻)</i> λ(DE3 [<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>])	Studier e Moffatt, 1986
<i>P. aeruginosa</i>		
PA14	Isolado clínico UCBPP-PA14	Rahme <i>et al.</i> , 1995
D12	PA14 com uma deleção <i>in-frame</i> no gene <i>kerV</i>	Apidianakis <i>et al.</i> , 2005
33C7	PA14 com uma inserção do transposon Tn <i>phoA</i> no gene <i>kerV</i> e com deficiência de antígeno O do LPS, Tc ^R	Rahme <i>et al.</i> , 1997
PA14 <i>lasR</i>	PA14 com uma inserção do cassete de resistência a gentamicina no gene <i>lasR</i>	Déziel <i>et al.</i> , 2004
PA14 <i>rhIR</i>	PA14 com uma inserção do cassete de resistência a tetraciclina no gene <i>rhIR</i>	Déziel <i>et al.</i> , 2005
PA14 <i>mvfR</i>	PA14 com uma mutação pontual <i>nonsense</i> no gene <i>mvfR</i>	Cao <i>et al.</i> , 2001b
PA14 <i>qscR</i>	PA14 com uma deleção <i>in-frame</i> no gene <i>qscR</i>	Rahme, L. G.
37612 (PA14 <i>phzA1</i>)	PA14 contendo a inserção do transposon MrT7 no gene <i>phzA1</i> , Gm ^R	Liberati <i>et al.</i> , 2006
PA14 <i>phzA2</i>	PA14 com uma deleção <i>in-frame</i> no gene <i>phzA2</i>	Déziel, E.
RB400	PA14 com uma deleção <i>in-frame</i> no gene <i>rsmY</i>	Este trabalho

RB401	PA14 com uma deleção <i>in-frame</i> no gene <i>rsmZ</i>	Este trabalho
RB402	PA14 com dupla deleção <i>in-frame</i> nos genes <i>rsmY</i> e <i>rsmZ</i>	Este trabalho
Vetores e Plasmídeos		
pGEM-T	Vetor de clonagem para produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR), Ap ^R	Promega
pNPTS138	Vetor suicida contendo <i>sacB</i> , Km ^R	Alley, D.
pUC18-mini-Tn7T-Gm- <i>lacZ</i>	Vetor com gene repórter <i>lacZ</i> sem promotor, Gm ^R em mini-Tn7T	Choi e Schweizer, 2006
pUC18-mini-Tn7T-Gm-LacZ10	Vetor para construção de fusão com a proteína β-galactosidase, frame 1, Gm ^R em mini-Tn7T	Choi e Schweizer, 2006
pUC18-mini-Tn7T-Gm-LacZ20	Vetor para construção de fusão com a proteína β-galactosidase, frame 2, Gm ^R em mini-Tn7T	Choi e Schweizer, 2006
pUC18-mini-Tn7T-Gm-LacZ30	Vetor para construção de fusão com a proteína β-galactosidase, frame 3, Gm ^R em mini-Tn7T	Choi e Schweizer, 2006
pGEX-4T-1	Vetor de expressão que adiciona uma cauda de glutathione-S-transferase (GST) à porção N-terminal do produto do gene clonado, Ap ^R	GE Healthcare
pProEx-HTa	Vetor de expressão que adiciona uma cauda de poli-histidina à porção N-terminal do produto do gene clonado, Ap ^R	Invitrogen
pTNS3	Plasmídeo expressando a transposase Tn7, Ap ^R	Choi <i>et al.</i> , 2008
pFLP2	Plasmídeo expressando a recombinase FLP, Cb ^R	Hoang <i>et al.</i> , 1998
pMW303	Fusão de transcrição <i>phzA1B1C1-lacZ</i> , Cb ^R	Whiteley <i>et al.</i> , 2000
pED3	Fusão de transcrição <i>phzA2-lacZ</i> , Cb ^R	Hazan <i>et al.</i> , 2010
pGX1	Fusão de transcrição <i>mvfR-lacZ</i> , Cb ^R	Déziel <i>et al.</i> , 2005
pME3859	Fusão de tradução <i>rsmA-lacZ</i> , Tc ^R	Pessi <i>et al.</i> , 2001
pAN3	pUC18-mini-Tn7T-Gm- <i>lacZ</i> contendo a fusão de transcrição <i>phzA1-lacZ</i> , Gm ^R	Este trabalho
pAN4	pUC18-mini-Tn7T-Gm- <i>lacZ</i> contendo a fusão de transcrição <i>phzA2-lacZ</i> , Gm ^R	Este trabalho
pAN5	pUC18-mini-Tn7T-Gm-LacZ20 contendo a fusão de tradução <i>phzA1-lacZ</i> , Gm ^R	Este trabalho
pAN6	pUC18-mini-Tn7T-Gm-LacZ30 contendo a fusão de tradução <i>phzA2-lacZ</i> , Gm ^R	Este trabalho
pAN7	pUC18-mini-Tn7T-Gm- <i>lacZ</i> contendo a fusão de transcrição <i>rsmA-lacZ</i> , Gm ^R	Este trabalho
pAN8	pUC18-mini-Tn7T-Gm-LacZ20 contendo a fusão de tradução <i>rsmA-lacZ</i> , Gm ^R	Este trabalho
pAN10	pGEX-4T-1 contendo a fusão <i>gst-phzA1</i> , Ap ^R	Este trabalho
pAN11	pGEX-4T-1 contendo a fusão <i>gst-phzA2</i> , Ap ^R	Este trabalho
pAN12	pProEx-HTa contendo a fusão <i>his-rsmA</i> , Ap ^R	Este trabalho
pAN13	pUC18-mini-Tn7T-Gm- <i>lacZ</i> contendo a fusão de transcrição <i>phzA1-lacZ</i> sem o box Lux, Gm ^R	Este trabalho
pAN14	pUC18-mini-Tn7T-Gm- <i>lacZ</i> contendo a fusão de transcrição <i>phzA2-lacZ</i> sem o box Lux hipotético, Gm ^R	Este trabalho

Tabela 2. Composição dos meios de cultura

MEIO DE CULTURA	CARACTERÍSTICAS	REFERÊNCIA
LB	Triptona 10 g/L; NaCl 10 g/L; extrato de levedura 5 g/L; pH 7,0	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
2x TY	Triptona 16 g/L; extrato de levedura 10 g/L; NaCl 5 g/L; pH 7,4	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
Meio A de King	Peptona 20 g/L; MgCl ₂ 1,4 g/L; K ₂ SO ₄ 1 g/L; FeCl ₃ 10 µM; glicerol 2%; pH 7,0	King <i>et al.</i> , 1954

Os oligonucleotídeos utilizados para ampliações de fragmentos pertinentes a este trabalho estão listados na tabela 3 e foram desenhados com auxílio do programa Primer 3, disponível em <http://bioinfo.ut.ee/primer3> e sequências do genoma de PA14 disponíveis em <http://pseudomonas.com> (Winsor *et al.*, 2011).

Tabela 3. Oligonucleotídeos

NOME	SEQUÊNCIA	FINALIDADE
1814-rnhA_up	AAAGTCAGCCGGCGAGATTCC	RT-PCR
1814-rnhA_down	CATGCGTTGTTGGTGGTGTCC	RT-PCR
rnhA-dnaQ_up	ACGAGCGGGCCGACCAAGTTGG	RT-PCR
rnhA-dnaQ_down	CGGCGCCCCTCCAGCTCGACAC	RT-PCR
41070_up	CCCGGGATGAACGAACCGCAAGCCTTC	RT-PCR
rnhA_right	AAGTCGACGCTGGTGAACGCTTGTTC	RT-PCR
nadB_up	CTACCTGGACATCAGCCACA	qRT-PCR
nadB_low	GGTAATGTGCGATGCCGAAGT	qRT-PCR
1814_up	CGAGCACCGGGCAGATTCA	qRT-PCR
1814_low	CGGCTTCGCGCAGGAGAC	qRT-PCR
lasR_up	CGCGAAAGCAGCACGAGTT	qRT-PCR
lasR_low	TTCCGCTTCCACGCTGAGG	qRT-PCR
rhIR_up	CCACACGATTCCCTTACC	qRT-PCR
rhIR_low	TCGCTCCAGACCACATTT	qRT-PCR
mvfR_up	GCCATCCCGCCGTCGTTCT	qRT-PCR
mvfR_low	TCCGCGTTGTCCTGCTTGAT	qRT-PCR
qRTqscR_left	GTTCTTCTCCCTGGTTCTCG	qRT-PCR
qRTqscR_right	ATGATATTTAGGCGCGGTCA	qRT-PCR
qRTphz1_left	GGGAAACACCCCTCGACATC	qRT-PCR
qRTphz1_right	CTGTGCCGCTGTAACCGTTC	qRT-PCR
qRTphz2_left	CACGGTCGAGCACTACATGC	qRT-PCR
qRTphz2_right	GCTTCCGTTGGTCCAGTTGC	qRT-PCR
qRTTrsmZ_left	ACACGCAACCCCGAAGGA	qRT-PCR
qRTTrsmZ_right	GTATTACCCGCCACTCT	qRT-PCR
qRTTrsmY_left	AGGAAGCGCCAAAGACAATA	qRT-PCR
qRTTrsmY_right	GGGGTTTTGCAGACCTCTAT	qRT-PCR
phzA1_up	TCCCTGCAGAGGTGGCTGGTGGGGTATT	Fusões de transcrição e tradução

phzA1_down	CAGAAGCTTGATGTCGAGGGGTGTTT	Fusões de transcrição e tradução
phzA2_up	GGCTGCAGCCATCGGCCTGCTCAACT	Fusões de transcrição e tradução
phzA2_down	GCAAAGCTTCGCCGACGCAATTCCAGGTTG	Fusões de transcrição e tradução
antiphzA1_up	GGAATTCATGAACGGTCAGCGGTAC	Expressão de PhzA1 recombinante
antiphzA1_down	TCTCGAGGTAGCGCTCCACCGTGCC	Expressão de PhzA1 recombinante
antiphzA2_up	TGAATTCATGCGAGAGTACCAACGG	Expressão de PhzA2 recombinante
antiphzA2_down	GCTCGAGGTGCTCGACCGTGCCACG	Expressão de PhzA2 recombinante
exprsmA_L	TGAGGATCCAGGAATGCTGATTCTGACTCG	Expressão de RsmA recombinante
exprsmA_R	AATAAGCTTAAAATTAATGGTTTGGCTCTGA	Expressão de RsmA recombinante
race_phz_1	CAATAGCCCTGCGGATAACC	5' RACE
race_phz_2	TTTCCGTGGTCCAGTTGC	5' RACE
race_phzA1_3	GAGGGGTGTTTCCCTGTACC	5' RACE
race_phzA2_3	AAACCCTTCAACCGTTGGT	5' RACE
GSphzA1_L	CTGACGCGGTACGAGCGTTCTGTG	<i>gel shift</i>
GSphzA1_R	AAGCTTTTCCCTGTACCGCTGACC	<i>gel shift</i>
GSphzA2_L	CTGACGGCAAACCGGCCAAAGAAT	<i>gel shift</i>
GSphzA2_R	AAGCTTCCGCAATCCAGGTTGTC	<i>gel shift</i>
GSrsmZ_L	GAATTCCTTCGCTGGGTTTTCTGG	<i>gel shift</i>
GSrsmZ_R	GGATCCCCTTTTCTTTGGCGACGA	<i>gel shift</i>
GSrsmY_L	GAATTCTCTCCCCCTCGCAGAGAT	<i>gel shift</i>
GSrsmY_R	GGATCCCTGGAAGGCGTGGTCTGA	<i>gel shift</i>
kerV_up	CTGCAGAAGGCTTGCAGTTTCGTTTCAT	<i>gel shift</i>
kerV_down	CAAGCTTGCTCCGCCGGGTGGTAGTA	<i>gel shift</i>
poprF1_Bam	AGCCGATGACAACGCCTA	<i>gel shift</i>
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	<i>gel shift</i>
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG	<i>gel shift</i>

3.2 Técnicas Básicas de Biologia Molecular

Isolamento de DNA plasmidial e genômico, precipitação de DNA com etanol, digestões com enzimas de restrição, PCR, eletroforese em gel de agarose, ligações, transformações e outras técnicas básicas de biologia molecular de uso recorrente no laboratório foram realizadas segundo protocolos específicos retirados de publicações na área, metodologia padrão descrita em manuais de referência (Ausubel *et al.*, 1996; Sambrook *et al.*, 1989) ou de acordo com instruções de fabricantes dos reagentes e equipamentos utilizados.

DNA genômico de *P. aeruginosa* foi isolado pela técnica descrita por Chen e Kuo (1993). DNA plasmidial foi extraído por lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989) a partir de culturas *overnight* de *E. coli*. Isolamento de RNA total foi realizado com o reagente TRIzol (Invitrogen), segundo as instruções do fabricante, acrescentando um passo de incubação a 65°C por 10 minutos após a adição do reagente. Sequenciamento de DNA para a confirmação da fidelidade dos produtos de PCR foi realizado utilizando o reagente BigDye (Applied Biosystems), de acordo com o protocolo do fabricante adaptado pela técnica Luci Deise Navarro, e a plataforma de sequenciamento ABI Prism 3130XL Genetic Analyzer (Hitachi) do Serviço de Sequenciamento de DNA do Instituto de Química da USP (SSDNA). A análise das sequências foi realizada usando a ferramenta BLAST, disponível em: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> e <http://www.pseudomonas.com/blast.jsp> (Winsor *et al.*, 2011).

3.3 Estudo da organização de genes em operon utilizando RT-PCR

Para verificar a organização de genes em operon, foram realizados ensaios de transcrição reversa seguidos de PCR (RT-PCR) utilizando oligonucleotídeos específicos que permitem a amplificação da região intergênica e parte das regiões codificadoras dos genes em questão. Como molde para a síntese do DNA complementar (cDNA), RNA total de *P. aeruginosa* PA14 foi extraído de culturas em fase exponencial tardia (DO = 3,0) e tratado com a enzima DNase I (Fermentas). Após, o RNA total foi submetido à transcrição reversa pela enzima AMV Reverse Transcriptase, componente do kit AcessQuick RT-PCR System (Promega), segundo protocolo do fabricante.

O cDNA gerado foi usado como molde para PCR com oligonucleotídeos específicos para amplificar as possíveis regiões intergênicas e assim confirmar a organização dos genes em operon. Como controle das reações, foi realizada PCR sob as mesmas condições usando como molde RNA total (controle negativo) e DNA genômico de PA14 (controle positivo) para cada um dos pares de oligonucleotídeos.

3.4 Análise de expressão gênica por RT-PCR quantitativo (qRT-PCR)

Transcrição reversa combinada com a reação em cadeia da polimerase é uma técnica muito utilizada para se analisar a expressão gênica. A tecnologia de RT-PCR em tempo real é uma adaptação dessa técnica para realizar essa análise de uma maneira quantitativa.

Ensaio de qRT-PCR foram realizados utilizando RNA total extraído de células cultivadas de maneira apropriada para cada experimento, então tratado com DNase I (Fermentas) e utilizado como molde para a síntese de cDNA com a enzima SuperScript III (Invitrogen) e oligonucleotídeos randômicos. O cDNA foi então amplificado com oligonucleotídeos específicos para os genes de interesse com o reagente SYBR Green PCR Master Mix (Fermentas) em triplicata técnica, utilizando o seguinte programa: 60°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto; no equipamento Applied Biosystems 7300 Real-time PCR System. As taxas de expressão foram calculadas de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001). O gene *nadB* foi utilizado como normalizador.

3.4.1 Validação do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Para que o cálculo com o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ seja válido, a eficiência de amplificação do alvo e do normalizador devem ser aproximadamente iguais. Uma forma de avaliar se dois amplicons tem a mesma eficiência é ver como seus ΔCt variam de acordo com a diluição do molde de cDNA.

O cDNA obtido a partir de 1 μ g de RNA total extraído foi submetido a diluições seriadas. Para o cDNA concentrado e para cada diluição, amplificações foram realizadas utilizando os mesmos oligonucleotídeos desenhados para o ensaio de qRT-PCR e nas mesmas condições descritas anteriormente, porém em duplicatas técnicas. A média dos Ct para cada amplicon foi calculada e o ΔCt foi determinado ($Ct_{\text{alvo}} - Ct_{\text{normalizador}}$).

Se o valor absoluto da inclinação for próximo a zero, a eficiência para os genes alvo e normalizador são similares e o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ pode ser utilizado para o cálculo da quantificação da expressão relativa do gene alvo (Livak e Schmittgen, 2001). A figura 8 representa alguns exemplos de gráficos com o log da diluição *versus* o ΔCt dos oligonucleotídeos testados neste trabalho, onde se assume que o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ pode ser

utilizado para a análise dos dados demonstrados nas seções adiante, já que a inclinação das retas variou de 0,0013 a 0,0632.

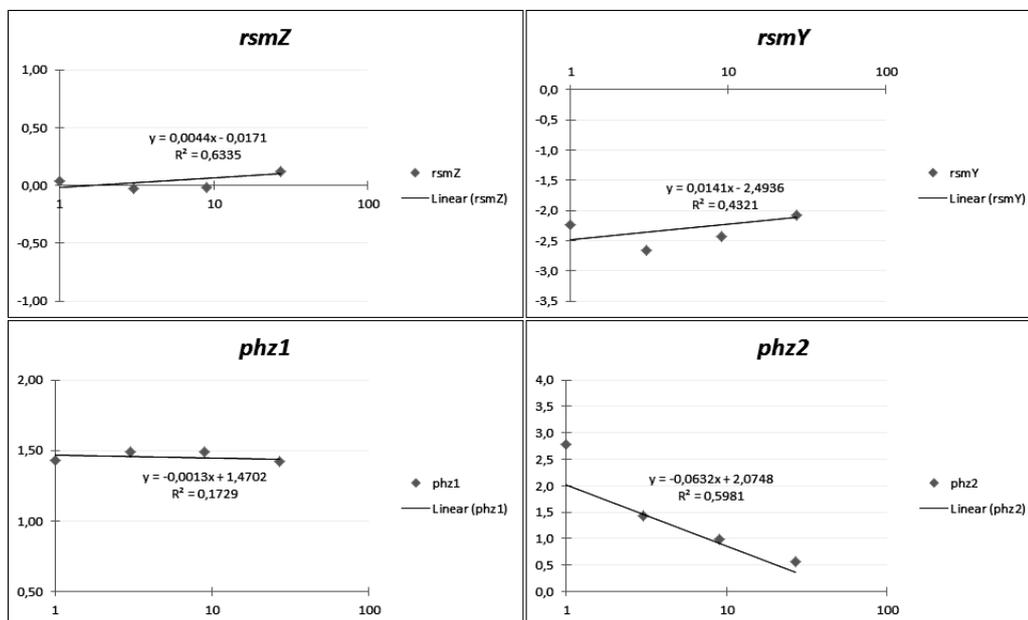


Figura 8. Validação do método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Amplificação de cDNA sintetizado a partir de diluições seriadas de RNA total. O ΔC_t ($C_{t_{alvo}} - C_{t_{nadB}}$) foi calculado para cada diluição. Os dados foram ajustados usando regressão linear.

3.5 Quantificação de piocianina

A quantificação de piocianina foi realizada após a extração do pigmento do sobrenadante de culturas crescidas em meio LB ou A de King, onde alíquotas de 1 mL foram retiradas em tempos determinados, centrifugadas a 12000 g por 15 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante reservado. A cada amostra de sobrenadante foi adicionado 1 mL de clorofórmio. As amostras foram agitadas vigorosamente com auxílio de um vórtex por cerca de 30 segundos e em seguida centrifugadas a 4000 g por 10 minutos a temperatura ambiente para separação das fases. A fase aquosa foi descartada e à fase orgânica foi adicionado 1 mL de uma solução de HCl 0,2 M. A mistura foi agitada vigorosamente por 30 segundos e em seguida submetida a centrifugação para separação das fases. A fase aquosa foi coletada e sua absorbância foi determinada usando um espectrofotômetro no comprimento de onda 520 nm. A concentração de piocianina em $\mu\text{g}/\text{mL}$ foi calculada de acordo o seu coeficiente de extinção molar (17,072) (Essar *et al.*, 1990).

3.6 Obtenção de linhagens repórteres para ensaios de atividade da enzima β -galactosidase

As regiões promotores de genes de interesse foram amplificadas por PCR a partir de DNA genômico extraído de *P. aeruginosa* PA14, utilizando o High Fidelity PCR Enzyme Mix (Fermentas) e oligonucleotídeos específicos para cada região, desenhados para conter sítios de restrição adequados à posterior ligação do fragmento obtido no vetor desejado.

Após purificação, o produto do PCR foi ligado ao vetor pGEM-T (Promega), conforme instruções do fabricante e o plasmídeo resultante foi transformado por eletroporação em células de *E. coli* DH5 α . Após cultivo das células, o plasmídeo foi extraído e a fidelidade da amplificação foi verificada através de sequenciamento do DNA plasmidial.

Os insertos foram excisados do vetor de clonagem por reação com enzimas de restrição apropriadas e ligados ao vetor final desejado. O produto dessas ligações foi analisado em *E. coli* e transferidos para as células *P. aeruginosa* PA14 e mutantes, gerando as linhagens repórteres descritas na tabela 1.

3.6.1 Uso dos vetores mini-Tn7

Em processos de clonagem de DNA para estudos da expressão gênica, a escolha de um vetor apropriado está bastante relacionada com o sucesso do trabalho, visto que algumas características, como necessidade de seleção continuada ou múltiplas cópias por célula podem atrapalhar a manutenção dos clones, assim como a interpretação dos resultados.

Os vetores mini-Tn7 contém um pequeno transposon que é integrado em uma única cópia ao cromossomo bacteriano no sítio *attTn7*, que está frequentemente localizado a jusante do gene *glmS* altamente conservado em muitas bactérias, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*. Uma transposase que compreende os componentes TnsABCD, codificada por um plasmídeo auxiliar, cataliza a inserção do transposon no sítio e orientação específicos com alta frequência. Aproveitando essas vantagens, foram incorporadas ao transposon características úteis como múltiplos sítios de clonagem (MCS) e outros elementos permitindo seu uso em complementação gênica, construção de fusões gênicas e expressão gênica regulada (Choi e

Schweizer, 2006).

As sequências de interesse foram clonadas no vetor mini-Tn7 apropriado e os plasmídeos resultantes foram cotransformados por eletroporação com o plasmídeo auxiliar em *P. aeruginosa* PA14 e mutantes de interesse (figura 9), seguido pela seleção por resistência a antibiótico das linhagens contendo a inserção. Para confirmação da inserção foi realizada PCR com oligonucleotídeos específicos, conforme Choi e Schweizer (2006).

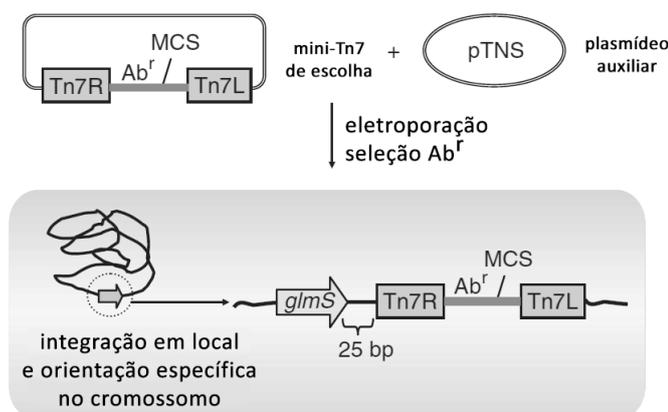


Figura 9. Sistema mini-Tn7 de clonagem e integração. Esquema do vetor mini-Tn7 com seus elementos transponíveis Tn7R e Tn7L, a marca de resistência a antibiótico (Ab^R) e o MCS, antes e depois da integração ao cromossomo bacteriano com auxílio do plasmídeo auxiliar pTNS. Adaptado de Choi e Schweizer (2006).

3.7 Ensaio de atividade da enzima β -galactosidase

β -galactosidase é uma enzima codificada pelo gene *lacZ*, capaz de hidrolizar β -D-galactosídeos. Esta enzima facilita o crescimento celular quando fontes de carbono como lactose estão disponíveis, clivando a lactose em uma molécula de glicose e uma molécula de galactose, que a célula pode catabolizar e usar para seu crescimento. No ensaio, a lactose é substituída por *orto*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG). Quando a β -galactosidase cliva ONPG, *orto*-nitrofenol é produzido. Este composto tem cor amarela e absorve luz a 420 nm. Para medir a atividade da enzima o acúmulo da cor amarela (absorbância a 420 nm) é monitorado ao longo do tempo. Dessa forma, a sequência reguladora de um gene de interesse pode ser fusionada ao gene *lacZ*, possibilitando a medida indireta de sua atividade promotora através da intensidade da cor amarela.

As linhagens repórteres foram cultivadas de maneira pertinente a cada experimento e os ensaios foram realizados de acordo com Miller (1972), salvo algumas modificações. O experimento foi feito com triplicatas técnicas e uma amostra de 100 μL de cada réplica foi retirada em tempos determinados. As amostras foram adicionadas a uma mistura contendo tampão Z (60 mM de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 40 mM de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 10 mM de KCl, 1 mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 2,7 mL/L de β -mercaptoetanol, clorofórmio e dodecil sulfato de sódio (SDS) a 0,1%) para permeabilizar as células. Após incubação por 5 minutos a 30°C, o substrato ONPG foi adicionado, a reação foi novamente incubada a 30°C e cronometrada até a visualização da cor amarela. Para parar a reação, Na_2CO_3 a 1 M foi adicionado a mistura. As amostras foram submetidas a centrifugação e a absorbância da fase aquosa foi medida por um espectrofotômetro.

Para os ensaios realizados com fusões de tradução integradas no cromossomo em cópia única, o volume de cultura usado foi 500 μL , pois a atividade da enzima nessa situação se mostrou muito baixa e de difícil detecção. Os valores foram devidamente substituídos na equação a seguir.

A atividade da enzima β -galactosidase é dada em unidades Miller e foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{atividade} = \frac{\text{DO}_{420}}{\text{DO}_{600} \times \text{tempo (m)} \times \text{volume de cultura (mL)}} \times 1000$$

3.7.1 Adaptação do protocolo para ensaio em microplacas de 96 poços

O ensaio em microplacas de 96 poços permite o uso de uma quantidade menor de amostra de cultura celular, a avaliação de um maior número de réplicas simultaneamente e a leitura das absorbâncias em um leitor de placas (SpectraMax Paradigm, Molecular Devices).

Para a realização do ensaio foram utilizadas três microplacas. Na primeira microplaca (1), foram distribuídas amostras de 175 μL das linhagens de interesse cultivadas em triplicata técnica e a absorbância 600 nm foi medida. Na sequência, uma alíquota de 20 μL da microplaca 1 foi transferida para uma nova microplaca (2), contendo 80 μL da solução de permeabilização (100 mM de Na_2HPO_4 , 20 mM de KCl, 2 mM de MgSO_4 , 0,06% de

brometo de cetil-trimetil-amônio (CTAB), 0,04% de desoxicolato de sódio (DOC) e 0,5 mM de tris-(2-carboxietil)-fosfina (TCEP)). Essa solução é estável por várias horas, o que permite a coleta e acúmulo das alíquotas ao longo do tempo de crescimento.

Após todas as amostras serem recolhidas e permeabilizadas, uma alíquota de 25 μ L da microplaca 2 foi transferida para uma nova microplaca (3) contendo 150 μ L da solução substrato (60 mM de Na_2HPO_4 , 40 mM de NaH_2PO_4 , 4 mM de ONPG e 0,25 mM de TCEP). Imediatamente após a adição, foi feita a leitura da absorbância a 550 nm para correção de uma possível turbidez ocasionada pela solução de permeabilização. A microplaca 3 foi também submetida à leitura da absorbância 420 nm por um período de 1 hora a *overnight* (com leituras a cada 5 minutos) para detecção da reação e a atividade da enzima foi calculada usando a seguinte equação, considerando o tempo em que a cor amarela (detectada a 420 nm) estava mais intensa:

$$\text{atividade} = \frac{\text{DO}_{420} - (1,75 \times \text{DO}_{550})}{\text{DO}_{600} \times \text{tempo (m)} \times \text{volume de cultura (mL)}} \times 1000$$

3.8 Ensaios de amplificação rápida das extremidades de cDNA (RACE)

A fim de se identificar os inícios de transcrição dos operons *phz*, ensaios de 5' RACE foram realizados com o kit 3'/5' RACE, 2nd generation (Roche Applied Science). Esse ensaio consiste na síntese de cDNA com oligonucleotídeo iniciador específico para cada gene, seguido de síntese de uma cauda poli-A e posteriormente, duas etapas de PCR com um dos oligonucleotídeos específicos para o gene de interesse e o outro contendo um poli-T. A segunda etapa de PCR é denominada *nested* PCR por ser uma reamplificação, utilizando como molde o produto da primeira amplificação e pelo menos um oligonucleotídeo mais interno aos utilizados na reação anterior.

Todos os passos foram realizados segundo protocolo do fabricante. Ao final de cada PCR, 10 μ L do produto da reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%. Os produtos da segunda etapa de PCR purificados foram ligados no vetor pGEM-T (Promega), sequenciados no SSDNA do Instituto de Química da USP e analisados para a identificação do início de transcrição e estudo das regiões promotoras.

3.9 Expressão de proteínas recombinantes

Para a expressão de proteínas recombinantes, linhagens de *E. coli* carregando os plasmídeos pAN10, pAN11 e pAN12 (tabela 1), contendo parte ou a região codificadora completa dos genes *phzA1*, *phzA2* e *rsmA*, foram cultivadas em 2 mL de meio 2X TY ou LB, incubadas sob agitação a 37°C *overnight* e usadas para inocular 100 mL do mesmo meio de cultura corrigidos para uma DO = 0,1. Esses inóculos foram incubados a 37°C até atingir uma DO entre 0,8 e 1,2. Para indução da expressão das proteínas recombinantes foi adicionado à cultura 0,5 mM de IPTG. Após a adição, a cultura foi mantida sob agitação nas mesmas condições, onde a cada intervalo de hora foi retirado 1 mL da cultura para verificação da ocorrência da indução, totalizando um período de 3 horas. Após centrifugação durante 5 minutos a 12000 g, uma alíquota dos tempos obtidos foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) em minigel de acrilamida de 8 a 18% a 200 V por 50 minutos no sistema MiniProtean 3 (BioRad). As proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade seguindo o protocolo de purificação do manual *The Recombinant Protein Handbook* (Amershan Biosciences).

3.10 Obtenção de soro policlonal em coelhos

Para a obtenção do soro policlonal, coelhos fêmea de 1,5 kg foram inoculadas subcutaneamente com uma mistura de 1 mg da proteína purificada em tampão fosfato-salino (PBS) com emulsão do adjuvante de Freund completo (1:1). Após 14 dias do primeiro inóculo, foi dado um reforço que consiste numa mistura contendo 300 mg da proteína purificada em PBS com emulsão do adjuvante de Freund incompleto (1:1). Após sete dias contados a partir do reforço, uma alíquota de 1 mL do sangue do coelho foi retirada e processada para obtenção do soro (incubado por 30 minutos a 37°C, depois 30 minutos no gelo, em seguida centrifugado a 4000 g por 30 minutos). O soro obtido foi armazenado a -20°C para em seguida ser testado quanto sua reatividade contra a proteína de interesse.

3.11 Ensaios de immunobloting

Para detecção de proteínas recombinantes nos extratos totais das linhagens de interesse, as proteínas foram separados por SDS-PAGE e transferidas para membranas de nitrocelulose a 45 mA por 50 minutos, segundo protocolo de transferência semi-seca utilizando o sistema NovaBlot (GE Healthcare). Após a transferência, as proteínas na membrana foram coradas com Ponceau S (0,1% em ácido acético 10%) e descoradas com água destilada, para verificar a eficiência da transferência. As membranas foram então bloqueadas por 2 horas em tampão Tris-salino (TBS) contendo 5% de leite desnatado e depois incubadas com o soro policlonal. As membranas foram lavadas por 5 minutos duas vezes em tampão Tris-salino contendo Tween 20 (TBS-T) e uma vez em TBS, posteriormente incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (1:30000). A lavagem foi repetida como descrito acima. As membranas foram reveladas com 150µL de azul de nitrotetrazólio (NBT) 10 mg/mL e 50 µL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) 50 mg/mL em 5 mL de tampão para fosfatase alcalina (10 mM Tris-HCl pH = 9, 100 mM NaCl e 5 mM MgCl₂). A reação foi interrompida com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 10 mM e o perfil de bandas analisado.

Quando necessário, foi feita a clivagem da cauda de GST usando o kit Thrombin CleanCleave (Sigma-Aldrich) e a purificação dos peptídeos foi feita usando colunas contendo glutationa sefarose. O eluato contendo os peptídeos foi usado para ensaios de dot blot, onde 10 µg das amostras foram pipetadas na membrana de nitrocelulose e após secagem, seguiu-se o protocolo descrito anteriormente.

3.12 Ensaio de retardamento de migração de RNA em gel de poliacrilamida (*gel shift*)

Transcritos dos genes *phzA1*, *phzA2*, *kerV*, *rsmZ*, *rsmY* e *oprF* foram sintetizados e usados como sondas para estudar a ligação da proteína RsmA. A sequência compreendendo a região 5' não traduzida dos genes acima citados foram amplificadas e clonadas no vetor pGEM-T. O DNA plasmidial obtido após a clonagem foi usado como molde para PCR, onde um

dos oligonucleotídeos usados foi o T7 ou o SP6 (tabela 3), dependendo da orientação em que a sequência amplificada foi inserida no vetor. O fragmento resultante foi utilizado como molde para reações de transcrição *in vitro* usando as enzimas T7 ou SP6 RNA polimerase (Fermentas). Os transcritos foram marcados durante a reação de transcrição usando [α - 32 P]-UTP, conforme protocolo do fabricante da enzima utilizada.

A reação de ligação ao RNA incluiu a proteína recombinante His₆-RsmA em várias concentrações, o transcrito marcado e uma solução tampão contendo 10 mM de Tris-HCl (pH = 7,5), 10 mM de MgCl₂, 50 mM de NaCl, 50 mM de KCl e 5 mM de ditioneitol (DTT). A reação foi incubada a temperatura ambiente por 30 minutos e misturada com 1 μ L de solução corante (97% glicerol, 0,01% azul de bromofenol e 0,01% xileno cianol) e imediatamente aplicada em gel de poliacrilamida nativo 4% usando tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 1X como tampão de corrida. Após a corrida (10 mA por cerca de 6 horas a temperatura ambiente), o gel resultante foi seco a vácuo sobre papel Whatman 3MM a 70°C por duas horas e a radioatividade foi detectada usando o Typhoon PhosphorImager ou através de filmes de raio-x. As sondas *rsmZ* e/ou *rsmY* foram usadas como controle positivos do ensaio e *oprF* como controle negativo. Os ensaios de competição foram realizados nas mesmas condições descritas acima, utilizando RNA não marcado em excesso, obtido segundo protocolo fornecido pelo fabricante da enzima utilizada.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação da organização de *kerV* em operon com os genes *rnhA* e *dnaQ*

A jusante do gene *kerV* encontram-se os genes *rnhA* e *dnaQ* (figura 10A). Eles apresentam a mesma orientação de transcrição e são conservados em outras linhagens de *Pseudomonas* (An *et al.*, 2009). Em *E. coli*, os genes *rnhA* e *dnaQ* formam uma unidade transcricional divergente e seus produtos, a proteína RNase HI e a subunidade ϵ da DNA polimerase III, respectivamente, têm função relacionada a replicação e reparo do DNA (Foster e Marinus, 1992). A anotação desses genes no projeto *Pseudomonas genome database* (Winsor *et al.*, 2011) sugere, através de predições computacionais, que eles façam parte de um operon. A proximidade, a conservação em *Pseudomonas* e a possibilidade desses genes serem cotranscritos, poderiam indicar uma relação entre suas funções, uma vez que a proteína KerV apresenta um domínio de metiltransferase e que processos de metilação estão frequentemente relacionados a processos de replicação e reparo.

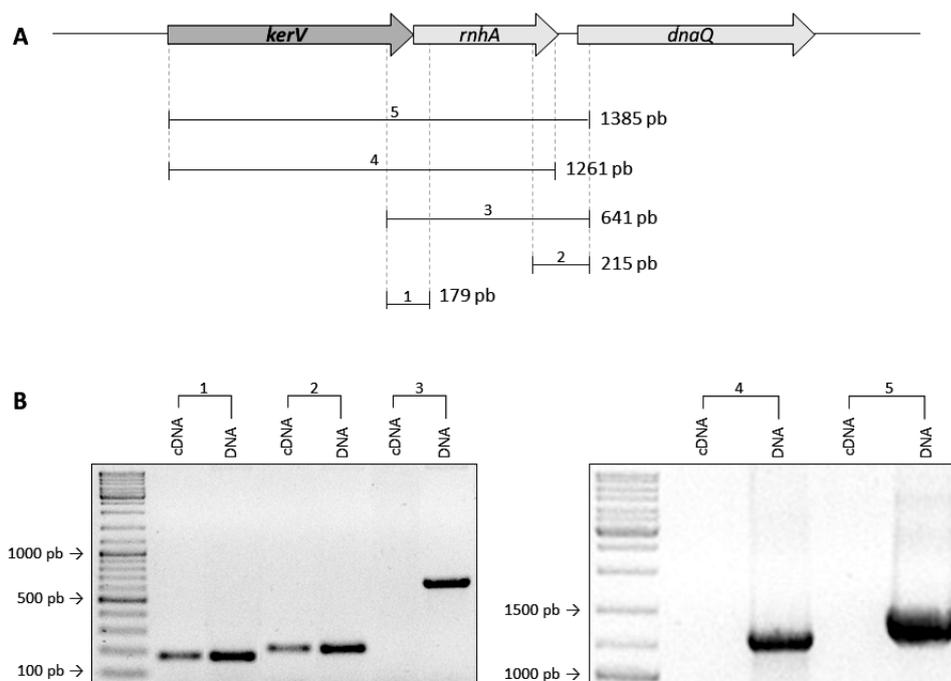


Figura 10. Organização de *kerV* no genoma de *P. aeruginosa*. (A) Esquema ilustrando a organização de *kerV* e sua proximidade com os genes *rnhA* e *dnaQ*. Os fragmentos correspondentes aos pares de oligonucleotídeos utilizados estão indicados por números de 1 a 5 com seus respectivos tamanhos em pares de bases (pb). (B) Géis de agarose mostrando os fragmentos obtidos pela amplificação com oligonucleotídeos específicos a partir de cDNA e DNA genômico (controle positivo).

Para averiguar essa possibilidade, amostras de cDNA obtidas pela transcrição reversa do RNA total de culturas de PA14 extraído em fase exponencial tardia (DO = 3,0), foram amplificados com pares de oligonucleotídeos específicos para cada par contíguo de genes. Um produto de amplificação foi detectado para os pares *kerV-rnhA* e *rnhA-dnaQ* (figura 10B - 1 e 2), mas não para *kerV-dnaQ* (figura 10B - 3 e 5) ou mesmo *kerV-rnhA* (figura 10B - 4) quando requerida a amplificação de uma região maior compreendendo os respectivos genes. Para que fosse caracterizado um operon, esperava-se obter um fragmento compreendendo os respectivos genes. O experimento foi repetido, porém, além das bandas mostradas, apenas bandas difusas e de tamanhos incompatíveis com os oligonucleotídeos utilizados foram detectadas na eletroforese em gel de agarose (dados não mostrados).

Uma hipótese para explicar esses resultados, seria que as regiões amplificadas para os dois primeiros pares são pequenas, 179 e 215 pb, respectivamente, sugerindo que os inícios de transcrição dos genes a jusante possam estar localizados no final da sequência codificadora do gene anterior. Paralelamente a este trabalho, o Dr. Diogo de Abreu Meireles verificou no decorrer do desenvolvimento de seu projeto de doutorado que os genes *rnhA* e *dnaQ* apresentam inícios de transcrição situados na região codificadora do gene a montante (Meireles, 2011), o que corrobora a hipótese citada anteriormente, descaracterizando a organização desses três genes em operon na condição testada.

4.2 Expressão de *kerV* em linhagens mutantes em genes envolvidos em percepção de quórum

A sequência da região promotora do gene *kerV* foi analisada em busca de consensos conhecidos para ligação de proteínas reguladoras conhecidas. Através de análises *in silico*, uma sequência consenso para ligação de proteínas do tipo LuxR, como os reguladores transcricionais LasR e RhlR, foi encontrada cerca de 410 bases a montante do provável início de transcrição de *kerV* (figura 11). Esse consenso, conhecido como *lux-box*, é caracterizado pela sequência **CT-[N]₁₂-AG**, onde N é qualquer nucleotídeo e as bases destacadas em negrito são altamente conservadas (Schuster *et al.*, 2004; Whiteley e Greenberg, 2001). O *lux-box* está geralmente localizado próximo ao início de transcrição de um gene, uma vez que os

reguladores do tipo LuxR atuam majoritariamente como ativadores transcricionais. Porém, já foram relatadas distâncias de aproximadamente 40 até 500 bases entre o *lux-box* e o início de transcrição dos genes regulados por QS. Alguns exemplos são o promotor do gene *hcnA*, ativado por RhIR, cujo box se localiza 42 bases a montante de seu início de transcrição (Pessi e Haas, 2000) e o promotor do gene *mvfR*, ativado por LasR, cujo box se localiza 513 bases a montante de seu início de transcrição. Um exemplo de repressão pelo regulador RhIR sobre o operon *pqsABCDE*, cujo box se situa 311 bases a montante de seu início de transcrição foi relatado (Xiao *et al.*, 2006b). Isso demonstra uma grande flexibilidade quanto ao sítio de ligação dos ativadores do tipo LuxR nos promotores dos genes alvos.

```

GGTGTCCGCGCAGAACAGCAGCGGGCTCTCCGCGGGTGGTAGTAGGCGATATGGCCGAGGGTATGGCCGGGCAC
                                lux-box
GTGGAAGATCTCGAAGACCAGGCCGAGCACCTCGACCCGTTCCGCGTCTTCCAGCGCCAGGTCGCGGGCCGGGAT

CTTCTCGTTGGCCGGGCCGAGAACCCGCGCGCCGGTCAGTTCTTCAGGGCCGCGACGCCGCCGACGTGGTCTGTG

ATGCTGGTGGGTCACCAAGGATATCGCTCAACCGCCAGTCGGGATGGGCGGCCAGCCAGGCTTCCACCGGCTTGGC
                                lysR-box
ATCGCCGGGGTCGACCACCGCGCAGCGACGGCTTGTCGCATCTTGCAACAGCCAGATGTAGTTGTCGTTAAAGGC

GGGCAGGGCGTCGATCTGTATCATGGGTGATGTCGCTAAGCAGAAGTCATTGGCGCATAGTATTGCTTATTTTC
                                                                +1
                                                                ┌
                                                                └
CCGTCGTGCCGGCGTCCGTCGCCGCGAAGGGGAAGACGCTGGAGGTACGCATGAACGAACCGCAAGCCTTCGCC

```

Figura 11. Análise *in silico* da região promotora do gene *kerV*. A sequência de nucleotídeos compreende 500 bases acima do início de tradução de *kerV* (em negrito e sublinhado). A busca por sítios de reconhecimento de proteínas reguladoras evidenciou um possível consenso para proteínas do tipo LuxR e do tipo LysR, destacadas por caixas. O provável início de transcrição situado 54 pb a montante do início de tradução do gene (Meireles, 2011) está indicado por +1 e uma seta dobrada.

O mesmo tipo de análise permitiu encontrar uma sequência consenso para ligação de proteínas da família LysR, da qual MvfR é membro. Proteínas dessa família ativam a transcrição de genes cuja região promotora contém a sequência palindrômica T-[N]₁₁-A, chamada *LysR-box*. Como exemplo, o gene *pqsA* que é regulado por MvfR, contém em sua região promotora um consenso para o *LysR-box* centrado a -45 bases relativas ao seu início de transcrição, onde apenas a primeira e última base, T e A, respectivamente, são altamente

conservadas (Xiao *et al.*, 2006b). A sequência encontrada a montante do gene *kerV* mantém o padrão palindrômico descrito (com exceção de um par de bases no centro da região), mostrado na figura 12, e se localiza centrado a -210 bases relativas ao início de transcrição do gene.

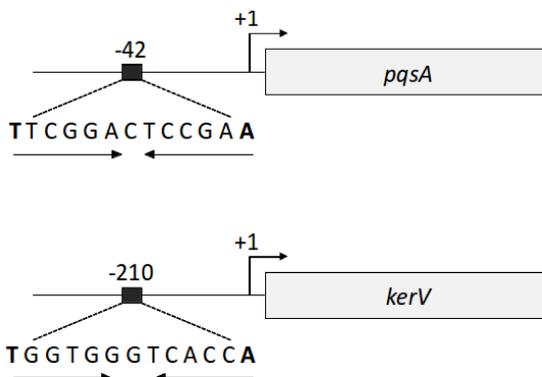


Figura 12. Esquema ilustrando as regiões promotoras dos genes *pqsA* e *kerV*, a sequência do provável *LysR*-box a montante do gene *kerV* e a comparação do seu padrão palindrômico com o consenso observado para o gene *pqsA*, regulado por MvfR. Os nucleotídeos destacados em negrito representam as bases altamente conservadas.

A presença desses consensos poderia indicar a influência de algum regulador transcricional do sistema QS sobre a regulação de *KerV*. Para averiguar essa possibilidade, ensaios de RT-PCR quantitativo foram realizados para avaliar a expressão do gene *kerV* em PA14 e das linhagens mutantes nos genes *lasR*, *rhIR*, *mvfR* e *qscR*. A figura 13 é representativa de experimentos submetidos ao teste *t* de Student, onde apenas o mutante no gene *mvfR* mostrou ter uma alteração significativa ($p < 0,05$) nos níveis relativos de mRNA de *kerV*, cuja expressão está diminuída em aproximadamente 50%. Esse resultado indica que *kerV* pode ser positivamente regulado por MvfR, atuando no *Lys*-box predito.

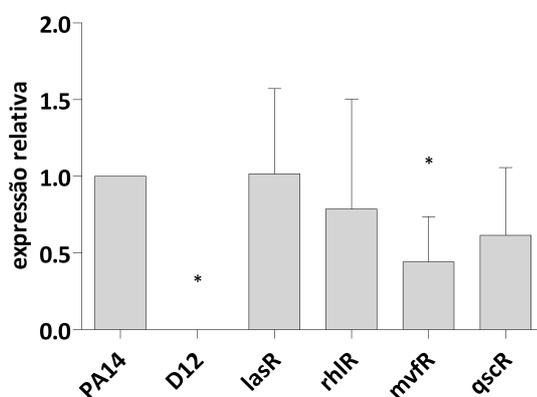


Figura 13. Efeito dos reguladores transcricionais do sistema QS sobre a transcrição do gene *kerV*. Níveis relativos de mRNA de *kerV* foram determinados por qRT-PCR a partir do RNA total das linhagens PA14 e mutantes (indicados na figura), cultivadas até uma fase exponencial tardia (DO = 3,0) a 37°C com agitação. O gráfico mostra a média de três experimentos e a barra de erro representa o desvio padrão obtido.

4.3 Quantificação de piocianina no mutante D12

Para melhor avaliar o fenótipo de aumento da produção de piocianina, foram realizadas quantificações do pigmento no sobrenadante das culturas de PA14 e D12 ao longo de seu crescimento. De fato, D12 sintetiza uma quantidade maior de piocianina, apresentando um aumento de 20 até 60% quando comparada com a produção da linhagem PA14 (figura 14). Os genes responsáveis pela síntese do pigmento são majoritariamente regulados por QS e pelo sistema Gac-Rsm (Dekimpe e Déziel, 2009; Pessi *et al.*, 2001). Portanto, esse fenótipo é indicativo de uma relação direta ou indireta de KerV com a regulação desses genes e de um provável envolvimento com os sistemas reguladores de *P. aeruginosa*.

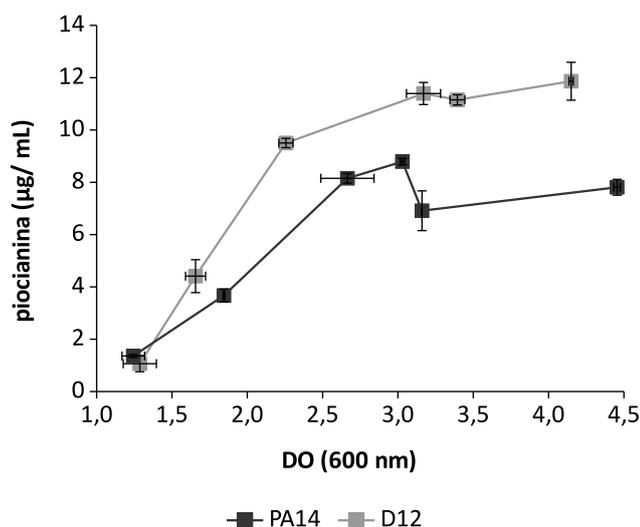


Figura 14. Comparação dos níveis de produção de piocianina na linhagem selvagem PA14 e no mutante D12. A ausência do gene *kerV* causa um aumento de 20 até 60% na síntese de piocianina. As linhagens foram cultivadas em triplicata em meio LB a 37°C com agitação e amostras foram retiradas ao longo do tempo para a quantificação do pigmento. As barras de erro representam o desvio padrão obtido para cada linhagem testada. O gráfico é representativo de três experimentos independentes.

4.4 Influência de KerV na expressão dos genes envolvidos em QS

Para estudar o efeito de KerV na expressão dos genes envolvidos em QS, foram realizados ensaios de qRT-PCR com oligonucleotídeos específicos para mensurar a expressão relativa dos genes *lasR*, *rhIR*, *mvfR* e *qscR* no mutante D12 em relação à linhagem selvagem. O experimento foi feito em triplicata técnica e repetido para afirmar a reprodutibilidade dos

resultados, porém foram observadas grandes variações entre os experimentos. Ainda assim, os dados foram tratados estatisticamente usando o método ANOVA e nenhuma alteração significativa ($p < 0,05$) foi encontrada para nenhum dos genes (figura 15).

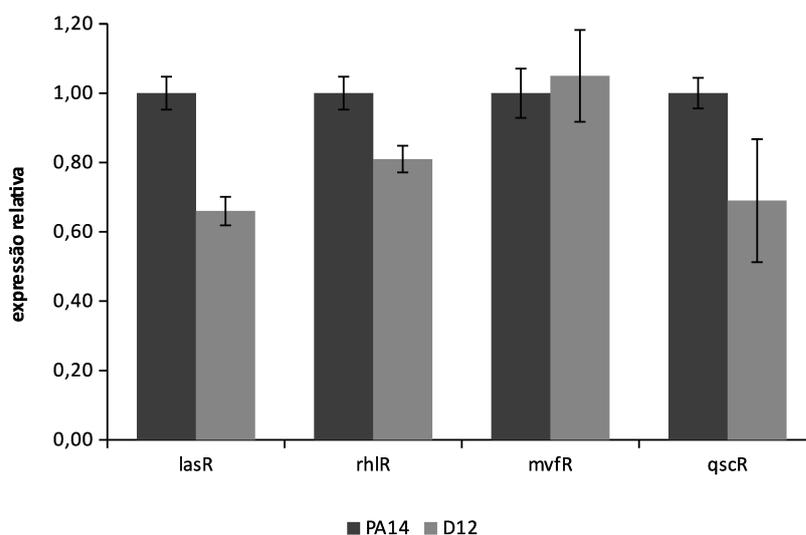


Figura 15. Efeito de KerV sobre a expressão dos reguladores transcricionais de percepção de quórum. Níveis relativos de mRNA de *lasR*, *rhIR*, *mvfR* e *qscR* foram determinados por ensaios de qRT-PCR. O RNA total foi extraído das linhagens cultivadas em meio LB a 37°C com agitação até uma fase de crescimento exponencial tardia (DO = 3). O gráfico é representativo de experimentos independentes e as barras de erros representam o desvio padrão obtido para cada triplicata técnica.

Adicionalmente, ensaios de atividade da enzima β -galactosidase foram realizados com o plasmídeo pGX1 (tabela 1), onde a força promotora do gene *mvfR* foi medida nas linhagens PA14 e D12. D12 apresenta uma expressão alterada de *mvfR* em comparação a PA14, diminuindo cerca de 55 até 70% na média de todos os experimentos realizados (figura 16). A princípio, este resultado pareceu contraditório, uma vez que MvfR é conhecido por influenciar positivamente a produção de piocianina (Cao *et al.*, 2001b; Xiao *et al.*, 2006a). Porém, esse efeito é dependente de PQS, cuja síntese não está alterada em D12 (figura 6). É possível que, apesar da menor transcrição de *mvfR*, a quantidade de proteína não esteja alterada ou que mecanismos compensatórios para equilibrar o efeito de sua menor expressão desregulem a síntese de piocianina.

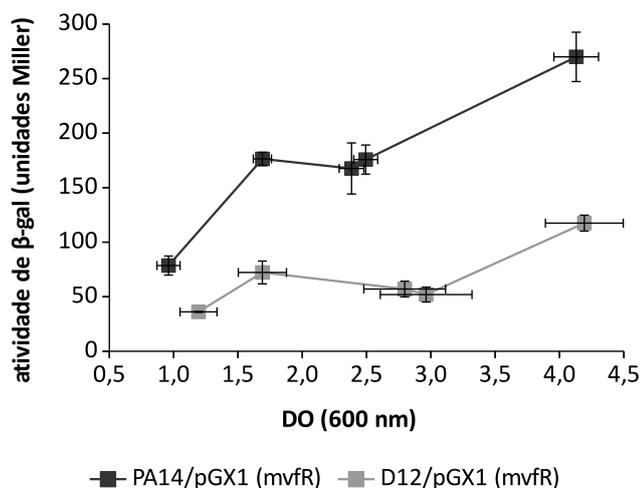


Figura 16. Efeito de KerV na transcrição de *mvfR*. As linhagens PA14 e D12, carregando a fusão de transcrição *mvfR-lacZ*, foram cultivadas em meio LB a 37°C com agitação em triplicata técnica e amostras foram coletadas ao longo do crescimento para realização do ensaio. O gráfico é representativo de experimentos independentes e as barras de erro representam o desvio padrão obtido para cada linhagem testada.

4.5 Efeito de KerV na expressão dos operons responsáveis pela síntese de piocianina

Visto que a linhagem D12 produz uma quantidade maior de piocianina, a atividade promotora dos operons responsáveis pela síntese de pigmento foi analisada. Para tal, os plasmídeos pMW303 e pED3 (tabela 1) foram transformados por eletroporação nas linhagens PA14 e D12 para realização de ensaios de atividade da enzima β -galactosidase. D12 mostra uma expressão alterada de ambos os operons, sendo 2,5 até 4 vezes maior para *phzA1* e 0,75 até 1,5 vezes maior para *phzA2*, quando comparada a PA14 (figura 17). Isso confirma o fenótipo observado, contudo: (1) a transcrição aumentada de ambos operons não condiz com o aumento observado do produto final, o que poderia inferir passos adicionais de regulação, por exemplo, pós-transcricionalmente; (2) a comparação das unidades Miller sugere que o primeiro operon seria mais ativo que o segundo. Porém, é importante notar que as fusões estão presentes em plasmídeos diferentes, o que não permite uma comparação absoluta da força desses promotores, uma vez que o número de cópias das fusões pode ser diferente e que informações como região clonada e/ou vetor usado como base para as construções foram encontradas na literatura. Apesar da aparente menor atividade, esse resultado confirma que PA14 tem o operon *phz2* ativo, ao contrário do relatado para PAO1 (Whiteley *et al.*, 2000).

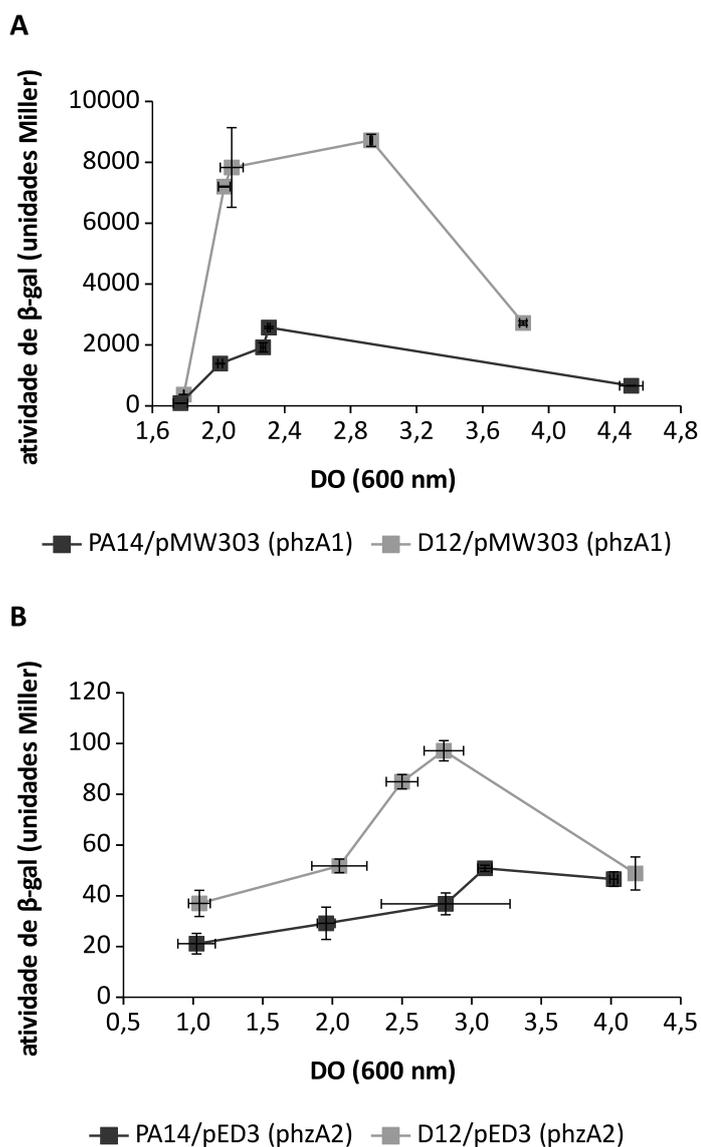


Figura 17. Efeito de KerV na atividade promotora dos operons *phz*. As linhagens PA14 e D12 contendo a fusão de transcrição para os genes *phzA1* (A) e *phzA2* (B), foram cultivadas em meio LB com antibiótico a 37°C com agitação em triplicata biológica e amostras foram coletadas ao longo do crescimento. O gráfico é representativo de três experimentos independentes e as barras de erro representam o desvio padrão obtido para cada linhagem testada.

A expressão dos genes *phzA1* e *phzA2* nas linhagens PA14 e D12 foi analisada também através de RT-PCR quantitativo usando oligonucleotídeos específicos (tabela 3), apesar da grande semelhança entre os operons. Houve grande variação nos resultados obtidos nos diferentes experimentos e o tratamento estatístico (teste *t* de Student) considerou como significativa apenas a alteração observada para o primeiro operon ($p < 0,05$). D12 apresentou uma indução 100% maior para *phzA1*, enquanto nenhuma mudança foi vista para *phzA2* (figura 18B). Uma particularidade percebida durante a realização de diversos ensaios de qRT-PCR

na rotina laboratorial foi que genes regulados e envolvidos em QS tendem a apresentar uma variação maior entre ensaios realizados em ocasiões diferentes, mesmo mantendo uma variação mínima nas condições dos experimentos.

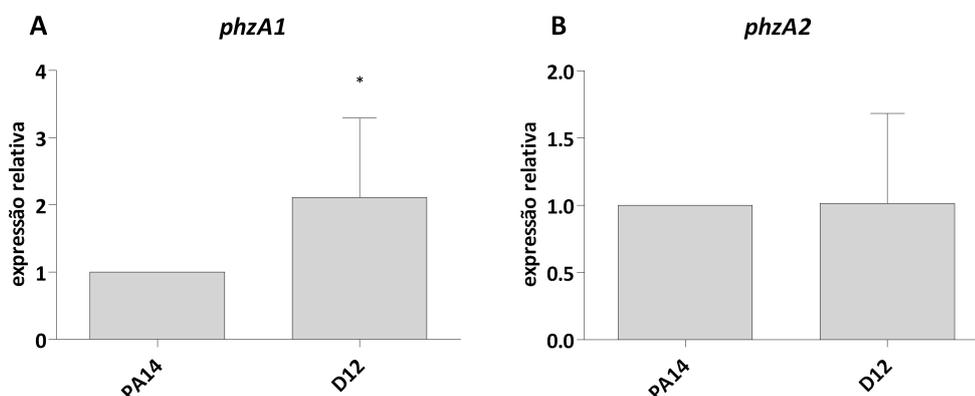


Figura 18. Níveis relativos de mRNA dos operons *phz* em D12. A expressão dos genes *phzA1* (A) e *phzA2* (B) foi determinada por ensaios de qRT-PCR. O RNA total foi extraído das linhagens PA14 e D12 cultivadas em meio LB a 37°C com agitação até uma fase de crescimento exponencial tardia (DO = 3). O gráfico mostra a média obtida de experimentos independentes e as barras de erros representam o desvio padrão para as réplicas experimentais.

A fim de padronizar o uso dos vetores repórteres, optou-se pela construção de novas fusões de transcrição e de tradução usando os vetores mini-Tn7, que se integram no cromossomo em cópia única. O uso dessa abordagem permitiu uma melhor comparação entre os dados de transcrição e tradução obtidos ao longo do restante deste trabalho. Para tal, as regiões 5' de *phzA1* (994 pb) e de *phzA2* (557 pb) foram amplificadas e clonadas nos vetores mini-Tn7 apropriados para gerar os plasmídeos pAN3, pAN4, pAN5 e pAN6 (tabela 1). As linhagens PA14 e D12 foram transformadas com esses plasmídeos e submetidas a ensaios de atividade da enzima β -galactosidase.

A deleção de *kerV* resultou na indução da expressão de *phzA1* em nível de transcrição (figura 19, linhas contínuas), com um aumento de aproximadamente 10 a 30%, considerando a média de todos experimentos realizados. A transcrição de *phzA2* também foi influenciada por *KerV* (figura 19, linhas tracejadas), porém de maneira mais sutil, mostrando um aumento de 10 a 15%. Também foi possível notar que *phzA2* foi expresso numa fase mais tardia em relação a *phzA1* em PA14, podendo ter relação com qual regulador transcricional estaria atuando sobre esses promotores. A produção de C12 tem seu pico na fase exponencial tardia, enquanto a produção de C4 tem seu pico na fase estacionária, sendo que a produção de PQS se

inicia na transição entre a fase exponencial e estacionária, mas continua aumentando na fase estacionária (Déziel *et al.*, 2005). Essa dinâmica na produção dos autoindutores poderia ser relacionada com os picos mostrados na figura 19, sugerindo que *phz1* sofra maior influência de LasR, já que o perfil de expressão é semelhante à produção de C12. *phz2* seria regulado primariamente por RhIR e/ou MvfR, sendo seu perfil de expressão mais coincidente com estes sistemas. Já em D12, que apresenta maior produção de C12 (figura 6), a transcrição de *phzA1* é maior em relação a PA14, apesar de atingir o pico em um ponto mais tardio, o que pode refletir um desbalanço do sistema QS nessa linhagem, mantendo altos níveis de transcrição de *phzA1* por mais tempo ao longo da curva de crescimento, refletindo na maior produção de piocianina em D12.

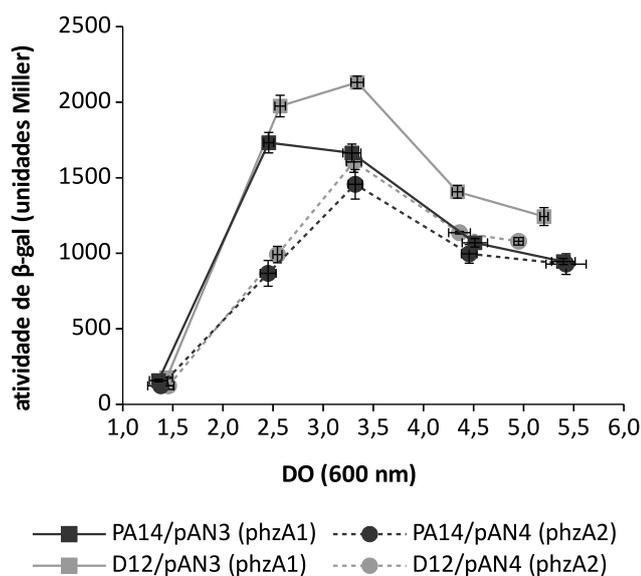


Figura 19. Efeito de KerV na transcrição dos operons *phz*. Linhagens derivadas de PA14 e D12 contendo a fusão de transcrição para os genes *phzA1* (pAN3, linhas contínuas) e *phzA2* (pAN4, linhas tracejadas), foram cultivadas em triplicata biológica em meio A de King a 37°C com agitação. O gráfico é representativo de ensaios independentes e as barras de erro representam o desvio padrão obtido para cada linhagem testada.

A expressão dos operons *phz1* e *phz2* também foi analisada em nível de tradução. Os ensaios mostraram que ambos os genes parecem sofrer uma indução da expressão na ausência de KerV, sendo cerca de 10 a 50% maior para *phzA1* e de 15 a 25% maior para *phzA2* (figura 20, linhas sólidas e tracejadas, respectivamente). É interessante notar que a expressão a partir da fusão de tradução de *phzA2*, foi maior em comparação a *phzA1* (figura 20), ao contrário do observado nas fusões de transcrição (figura 19). Isto reforça a ideia de que a regulação

dos dois operons esteja sob controle pós-transcricional e realmente ocorra de forma distinta na linhagem PA14 e que talvez ambos os operons sejam importantes para a produção de piocianina nessa linhagem.

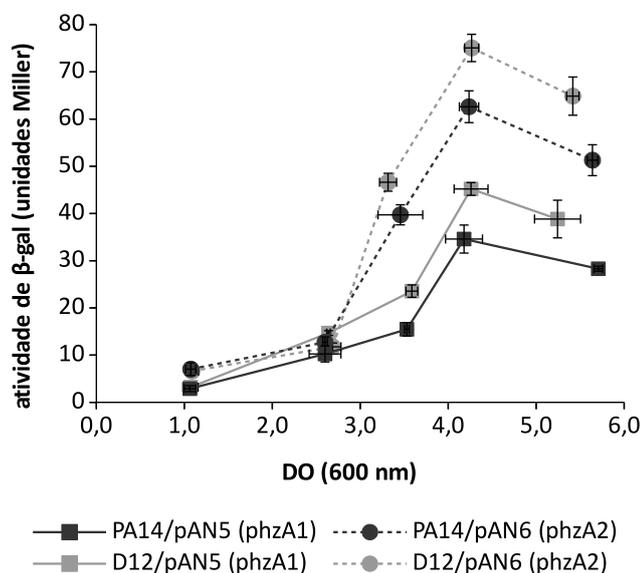


Figura 20. Efeito de KerV na tradução dos operons *phz*. Linhagens derivadas de PA14 e D12 contendo a fusão de tradução para os genes *phzA1* (pAN5, linhas contínuas) e *phzA2* (pAN6, linhas tracejadas), foram cultivadas em triplicata biológica em meio A de King a 37°C com agitação. O gráfico é representativo de ensaios independentes e as barras de erro representam o desvio padrão obtido para cada linhagem testada.

A proteína KerV parece atuar em mais de uma etapa de regulação dos genes responsáveis pela síntese de piocianina. Porém, não está claro se o aumento na produção do pigmento é uma soma dos efeitos transcricional e pós-transcricional ou de apenas uma dessas etapas, ou mesmo se é consequência da ação somada das enzimas dos dois operons ou de apenas um. Uma abordagem adotada foi estudar diretamente os níveis das proteínas codificadas pelos operons na célula através de *immunoblot*.

Os operons *phz* são 98% idênticos em sua sequência de DNA (Mavrodi *et al.*, 2001) e essa pequena diferença pouco se reflete na sequência de aminoácidos. Porém, comparando separadamente a sequência da primeira proteína de ambos os operons, PhzA, essa semelhança cai para 87%, concentrando a diferença principalmente nos primeiros resíduos de aminoácidos (figura 21). Fragmentos de 81 pb compreendendo o início da região codificadora do gene *phzA1* ou de *phzA2* foram amplificadas e clonadas no vetor de expressão pGEX-4T-1, gerando os plasmídeos pAN10 e pAN11, respectivamente (tabela 1), os

quais expressaram os peptídeos recombinantes. GST-PhzA1 e GST-PhzA2 foram utilizados para a produção de anticorpos policlonais em coelhos, visando a produção de anticorpos policlonais.

```

phzA1      MNGQRYRETPLDIERLRRLNRATVERYMAMKGAERLQRHSLFVEDGCAGNWTTESGEPLV 60
phzA2      MREYQRLKGFTDNLELRRLNRATVEHYMRMKGAERLQRHSLFVEDGCAGNWTTESGEPLV 60
           *  :  :  *  .*** *****:*  *****

phzA1      FRGHESLRRLAEWLERCFPDWEWNRVRIFETEDPNHFWVECDGRGKALVPGYPQGYCENH 120
phzA2      FRGHESLRRLAEWLERCFPDWEWNRVRIFETEDPNHLWVECDGRGKALVPGYPQGYCENH 120
           *****:*****:*****

phzA1      YIHSFELENGRIKRNREFMNPMQKLRALGIAVPQIKRDGIPT 162
phzA2      YIHSFELENGRIKRNREFMNPMQKLRALGIAVPQIKRDGIPT 162
           *****

```

Figura 21. Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas PhzA1 e PhzA2 de *Pseudomonas aeruginosa* PA14. As sequências compartilham 87% de identidade e apresentam diferenças apenas nos resíduos de aminoácidos na porção N-terminal. Os aminoácidos sublinhados correspondem a sequência utilizada para expressão dos peptídeos recombinantes e produção de anticorpos policlonais.

Nos ensaios de *immunoblot*, os soros policlonais obtidos após duas etapas de imunização, anti-PhzA1 e anti-PhzA2, não foram capazes de reconhecer as proteínas PhzA (19 kDa) no extrato total das culturas de PA14, nem dos mutantes nos genes *phzA1* e *phzA2* (figura 22). Porém, é possível notar que os soros foram capazes de reconhecer as proteínas recombinantes purificadas (figura 22, canaletas 1 e 2), o que sugeriu que o soro estaria reconhecendo apenas a cauda de GST, uma vez que o peptídeo fusionado proveniente da proteína PhzA corresponde apenas a 3 kDa.

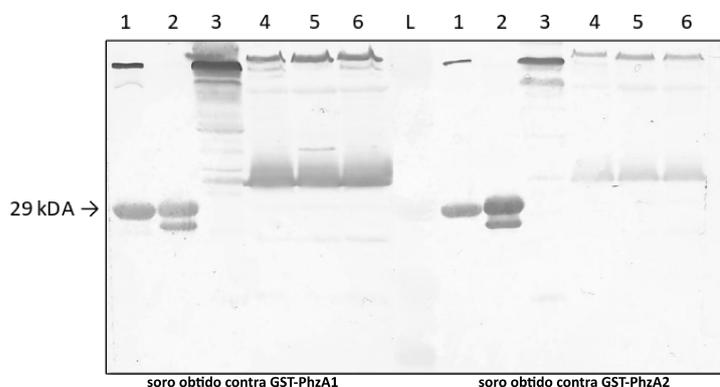


Figura 22. Immunoblots com soros obtidos após imunização de coelhos com GST-PhzA1 e GST-PhzA2. Os soros reconheceram apenas as proteínas recombinantes GST-PhzA1 (1) e GST-PhzA2 (2) purificadas, além de bandas inespecíficas no extrato total de *E. coli* BL21 (3), *P. aeruginosa* PA14 (4), mutante *phz1* (5) e mutante *phz2* (6). Marcador de peso molecular (L).

Diante dessa possibilidade, foi feita a clivagem do peptídeo separando a sequência de aminoácidos de PhzA da cauda de GST. Os peptídeos foram utilizados para realização de *dot blot* para verificar a especificidade dos soros obtidos contra PhzA1 e PhzA2. Os resultados mostraram que os soros foram capazes de reconhecer os peptídeos clivados, porém ambos os soros reconheceram tanto o peptídeo obtido a partir da clivagem da proteína recombinante GST-PhzA1 como de GST-PhzA2 (figura 23). Isso impossibilitou o uso desses peptídeos para futuras etapas de imunização na tentativa de obter um soro capaz de reconhecer e permitir a comparação dos níveis das proteínas selvagens no extrato total de *P. aeruginosa*.

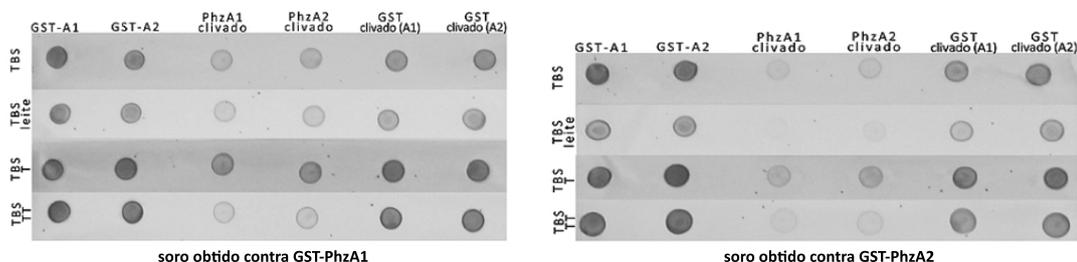


Figura 23. Reconhecimento cruzado dos soros policlonais anti-PhzA1 e anti-PhzA2. O *dot blot* revelou que os soros foram capazes de reconhecer o peptídeo clivado, porém reconheceram de maneira mútua tanto PhzA1 quanto PhzA2 (terceira e quarta colunas).

4.6 KerV afeta a expressão de RsmA, mas não dos pequenos RNAs RsmY e RsmZ

A proteína RsmA e os pequenos RNAs reguladores RsmZ e RsmY exercem influência sobre a produção de piocianina. O mutante de *rsmA* produz níveis elevados de piocianina. O mutante *rsmA* produz também quantidades menores de ramnolipídeo (Kay *et al.*, 2006; Pessi *et al.*, 2001). O oposto é observado para o duplo mutante nos genes *rsmY* e *rsmZ* (dados não mostrados). A semelhança dos fenótipos desse mutante com os fenótipos de D12, levantou a hipótese de que KerV poderia exercer alguma influência no sistema Gac-Rsm, como mostrado na Introdução.

Adicionalmente, este trabalho mostrou que a linhagem D12 apresenta níveis diminuídos da expressão do gene *mvfR* (figura 16). Segundo Déziel *et al.* (2005), MvfR é

importante para a expressão de *rsmA* e o mutante *mvfR* tem a expressão de *rsmA* reduzida quando comparada com PA14. A expressão de β -galactosidase a partir da fusão de tradução *rsmA-lacZ* nas linhagens PA14 e D12 foi analisada a fim de verificar se KerV exerce influência na expressão de RsmA. O ensaio mostrou que D12 tem níveis de expressão de *rsmA* diminuídos entre 30 e 45% quando comparada a PA14 (figura 24), reafirmando a influência de KerV nos sistemas reguladores de *P. aeruginosa*. Porém, esse ensaio não esclareceu se essa influência é causada devido a queda da expressão de *mvfR* em D12, uma vez que MvfR exerce seu efeito transcricionalmente em *rsmA*. A fusão de tradução usada nesse ensaio contém a região promotora de *rsmA*, o RBS putativo e os primeiros sete códons da região codificadora e os dados obtidos podem refletir tanto a transcrição quanto a tradução do gene.

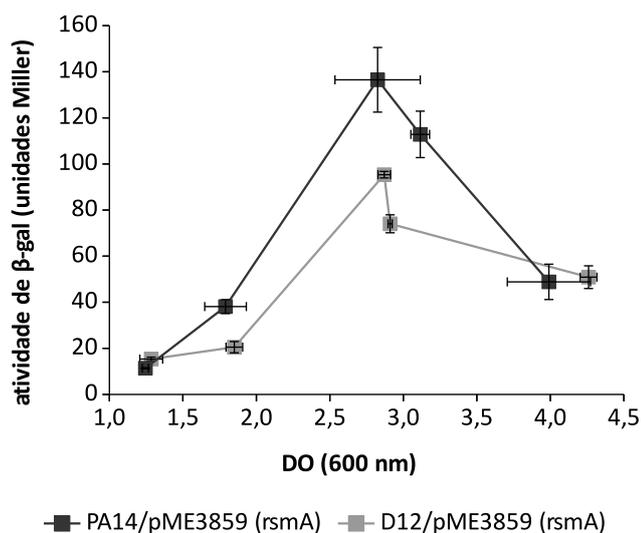


Figura 24. Efeito de KerV sobre a expressão de *rsmA*. As linhagens PA14 e D12 foram cultivadas em triplicata em meio LB a 37°C com agitação e amostras foram coletadas ao longo do crescimento para a realização do ensaio. O gráfico é representativo de três experimentos independentes e as barras de erro mostram o desvio padrão obtidos para cada linhagem testada.

Para esclarecer esse ponto, fusões de transcrição e tradução *rsmA-lacZ*, pAN7 e pAN8, respectivamente, foram construídas e inseridas no cromossomo de PA14 e D12. Um ensaio realizado a partir da fusão de transcrição mostrou que a atividade de β -galactosidase é cerca de 25 a 35% menor em D12 (figura 25), sugerindo um controle transcricional. Não foi possível confirmar a regulação pós-transcricional de *rsmA* por ensaios com as fusões de tradução integradas ao cromossomo, pois a expressão de *rsmA* em cópia única na célula gera leituras muito baixas de atividade da enzima β -galactosidase (dados não mostrados).

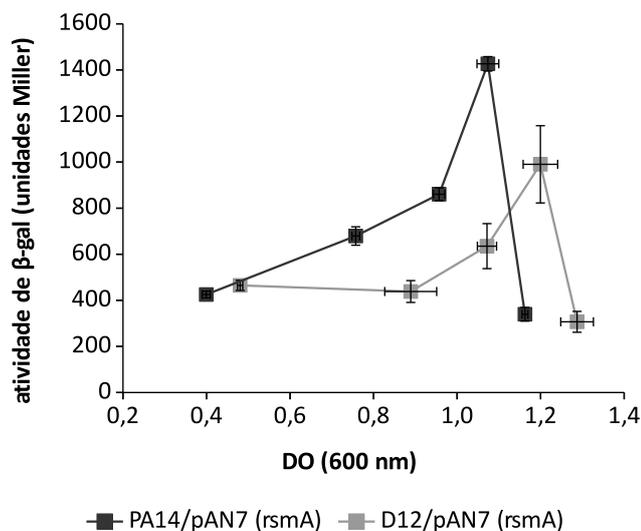


Figura 25. Efeito de KerV sobre a transcrição de *rsmA*. As linhagens PA14 e D12 foram cultivadas em triplicata em meio LB a 37°C com agitação e amostras foram coletadas ao longo do crescimento para a realização do ensaio. As barras de erro mostram o desvio padrão obtido para cada triplicata técnica testada.

Uma abordagem alternativa para confirmar os níveis mais baixos de RsmA em D12 foi quantificação direta de RsmA através de *immunoblot*. Para tal, um soro policlonal contra a proteína RsmA foi obtido e ensaios de *immunoblot* foram realizados. Porém, como é possível observar na figura 26, a expressão da proteína ocorre também em níveis baixos, o que dificultou a reprodutibilidade e a percepção de diferenças que não fossem drásticas nos níveis de RsmA nas condições testadas.

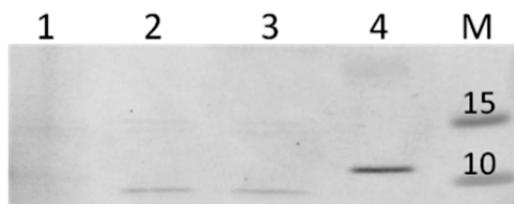


Figura 26. Reatividade do soro policlonal obtido após imunização com a proteína recombinante His₆-RsmA. O *immunoblot* revelou o reconhecimento da proteína selvagem RsmA pelo soro policlonal nos extratos totais de culturas da linhagem PA14 (canaleta 3) e D12 (canaleta 2), as bandas estão indicadas por setas. Como controle negativo, foi usado o extrato total do mutante *rsmA* (canaleta 1), onde não foi possível visualizar a banda correspondente. A canaleta 4 representa uma alíquota da proteína recombinante His₆-RsmA. Marcador de peso molecular, indicando o peso aproximado das bandas em kDa (M).

Paralelamente, foram feitos ensaios de RT-PCR quantitativo usando oligonucleotídeos para os genes *rsmZ* e *rsmY*. Os resultados mostraram não haver alterações significativas (test *t* de Student, $p < 0,05$) na expressão desses genes em D12, no que diz respeito aos

níveis relativos de mRNA (figura 27), mais uma vez apontando para uma possível regulação pós-transcricional dos operons *phz* através da ação de RsmA.

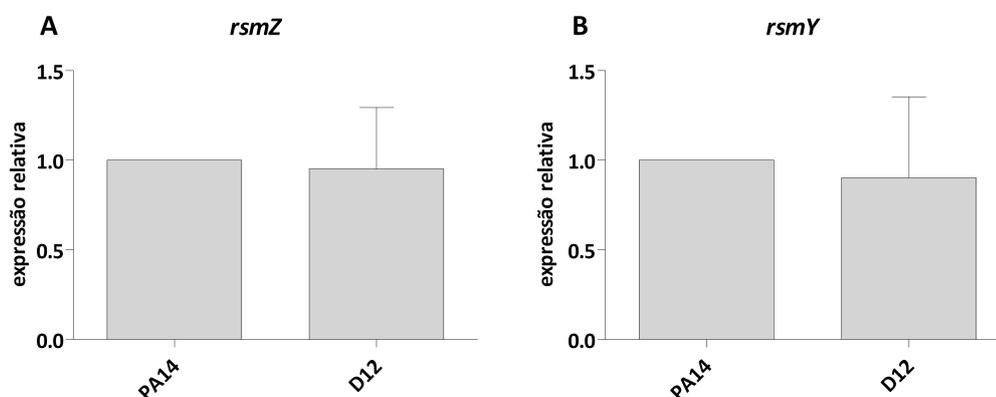


Figura 27. Efeito de KerV sobre a transcrição dos pequenos RNAs RsmZ e RsmY. Níveis relativos de mRNA para esses genes foram determinados por ensaios de qRT-PCR a partir do RNA total das linhagens PA14 e D12 cultivadas em meio LB a 37°C sob agitação até uma fase exponencial tardia (DO = 3,0). O gráfico mostra a média obtida de experimentos independentes e as barras de erro representam o desvio padrão para as réplicas experimentais.

4.7 Regulação da expressão dos operons *phz* por RsmA

4.7.1 Determinação do início de transcrição dos operons *phz*

Para determinar experimentalmente o início de transcrição dos genes *phzA1* e *phzA2*, foram realizados ensaios de 5' RACE. O ensaio gera fragmentos de DNA que representam a extensão da região 5' de um gene, revelando seu início de transcrição. Os fragmentos provenientes do ensaio foram clonados no vetor pGEM-T e sequenciados. O sequenciamento gera cromatogramas que mostram a sequência da cauda poli-A ou poli-T (dependendo de qual orientação se inseriu o fragmento de DNA no vetor), precedida ou seguida, respectivamente, da base que representa o início de transcrição encontrado para aquele gene.

Entre os 152 clones analisados para o gene *phzA1*, 15 revelaram a base C na posição 334 a montante do início de tradução como sendo o início de transcrição desse gene (figura 28). Adicionalmente, outros 35 clones apontaram bases de duas a quatro posições ao redor da base -334 como sendo o início de transcrição de *phzA1*. Outros 62 clones resultaram em bases em diferentes locais da região a montante do início de tradução. Os demais clones do total

sequenciado resultaram em cromatogramas que não puderam ser analisados por possíveis problemas durante a síntese do cDNA ou no sequenciamento em si. Foi possível encontrar, próximo ao início de transcrição mais provável (posição -334), consensos para os sítios -10 e -35 de reconhecimento pelo fator sigma 70, indicados na figura 28. Também foi detectada a presença do consenso para o *lux-box*, requerido por proteínas regulatórias do tipo LuxR, responsáveis pela regulação da expressão desse operon, como relatado na literatura (Mavrodi *et al.*, 2001). O estudo da região 5' não traduzida do gene *phzA1* revelou ainda a presença de diversas sequências GGA, reforçando a possibilidade desse operon sofrer regulação pela proteína RsmA, que se liga a estes motivos no mRNA, impedindo sua tradução (Romeo *et al.*, 2013).



Figura 28. Organização da região promotora do gene *phzA1* de *P. aeruginosa* PA14. As possíveis regiões -10 e -35 estão destacadas por caixas e as bases em negrito são idênticas aos consensos relatados para estes motivos.

A sequência destacada por um retângulo a montante da região -35 representa um *lux-box*. O início de transcrição encontrado através de experimentos de 5' RACE está indicado por +1 e uma seta dobrada, localizado 334 bases a montante do início de tradução (em negrito e sublinhado). Sete sequências GGA estão destacadas em negrito, indicando uma possível regulação por RsmA. A seta tracejada indica a região complementar ao oligonucleotídeo usado na reação de *nested* PCR.

Entre os 200 clones analisados para o gene *phzA2*, 8 apontaram a base C localizada 201 bases a montante do início de tradução como provável início de transcrição. Adicionalmente, outros 10 clones indicaram as bases C ao redor da posição -201 como início de transcrição (figura 29). Foi possível encontrar, próximo ao início de transcrição mais provável, consensos para os sítios -10 e -35 de reconhecimento pelo fator sigma 70, indicados na figura 29.

Entretanto, 31 clones analisados tiveram como início as bases nas posições 9 ou 8 a montante do início de tradução de *phzA2*. Isso levantou a hipótese de que o início de tradução do gene pudesse estar localizado em outra região, mais a jusante na sequência. Levando em consideração essas bases como ponto de partida, não foi possível encontrar regiões -10 e -35 que concordassem com o consenso descrito para *P. aeruginosa* (Potvin *et al.*, 2008). Além disso, parte dessas sequências apresentaram cromatogramas de baixa qualidade, indicando uma possível contaminação cruzada durante o processo de purificação dos plasmídeos ou problemas de anelamento e extensão durante a reação de sequenciamento, portanto foram considerados como artefatos da técnica. Outros 95 clones resultaram em inícios dispersos em diferentes bases da região a montante do início de tradução de *phzA2* e os clones restantes do total sequenciado resultaram em cromatogramas que não puderam ser analisados por possíveis problemas na síntese do cDNA ou no sequenciamento. Da mesma maneira, foi observada a presença de quatro sequências GGA, podendo *phzA2* ser também regulado por RsmA.

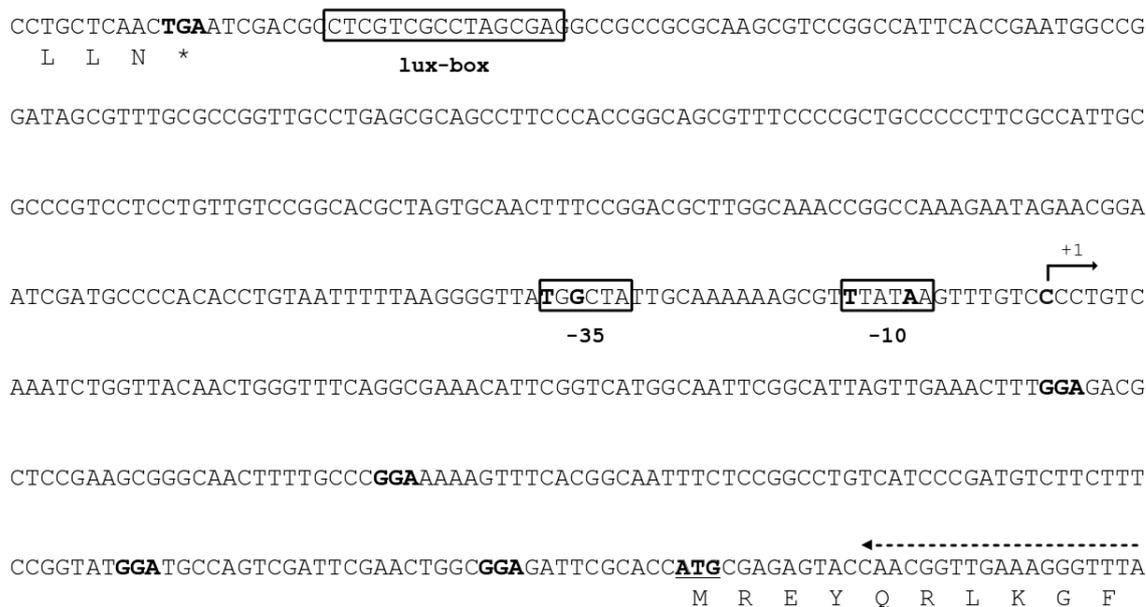


Figura 29. Organização da região promotora do gene *phzA2* de *P. aeruginosa* PA14. As possíveis regiões -10 e -35 estão destacadas por caixas e as bases em negrito são idênticas aos consensos relatados para estes motivos. A sequência destacada com um retângulo a montante da região -35 representa um provável *lux-box*. O início de transcrição mais provável encontrado através de experimentos de 5' RACE está indicado por +1 e uma seta dobrada, localizado 201 bases a montante do início de tradução (em negrito e sublinhado). Quatro sequências GGA estão destacadas em negrito, indicando uma possível regulação por RsmA. A seta tracejada indica a região complementar ao oligonucleotídeo usado na reação de *nested* PCR.

4.7.2 Predição da estrutura secundária dos mRNAs de *phzA1* e *phzA2*

A presença de várias sequências GGA na região 5' não traduzida dos genes *phzA1* e *phzA2* levantou a hipótese de que eles poderiam sofrer regulação pela proteína RsmA. A figura 30 mostra a predição da estrutura secundária desses mRNAs determinadas pelo programa Mfold (Zuker, 2003), onde o motivo GGA sobrepõe o sítio de ligação do ribossomo (RBS) e se encontra em uma região de simples fita numa estrutura similar a um *stem-loop*. Além do motivo GGA encontrado no RBS, a sequência líder dos genes *phzA1* e *phzA2* contém três ou mais motivos GGA. Baseado nas estruturas preditas, para o gene *phzA1*, outros motivos GGA também se encontram expostos em *stem-loop* e poderiam servir como substrato para a ligação de RsmA, ajudando a estabilização da ligação ao RBS, como observado para vários outros alvos de RsmA (Schubert *et al.*, 2007).

Apesar da predição das estruturas secundárias desses mRNAs serem compatíveis com as estruturas preditas de outros mRNAs regulados por RsmA, elas carecem do consenso estendido ANGGA observado no sítio de ligação do ribossomo de genes comprovadamente regulados por RsmA (Brencic e Lory, 2009; Schubert *et al.*, 2007).

4.7.3 RsmA liga diretamente nas sequências líder dos operons *phz*

Para averiguar se RsmA regula a tradução dos genes *phzA1* e *phzA2*, foi escolhido o uso do ensaio de retardamento de migração de RNA em gel de poliácridamida (*gel shift*), descrito em Materiais e Métodos. A partir da identificação dos inícios de transcrição dos genes *phzA1* e *phzA2*, as regiões 5' não traduzidas identificadas foram sintetizadas através de transcrição *in vitro* na presença de [α -³²P-UTP] para servirem como sondas nos ensaios de *gel shift* com a proteína recombinante His₆-RsmA. Igualmente, uma sonda radioativa do pequeno RNA RsmZ foi produzida para ser usada como controle positivo e de mRNA de *oprF* como controle negativo.

Apesar da região 5' não traduzida do gene *kerV* possuir apenas uma sequência GGA além daquela contida no sítio de ligação do ribossomo (figura 31), *kerV* também foi usado como sonda para o *gel shift* na tentativa de averiguar mais uma possibilidade de regulação para esse gene.

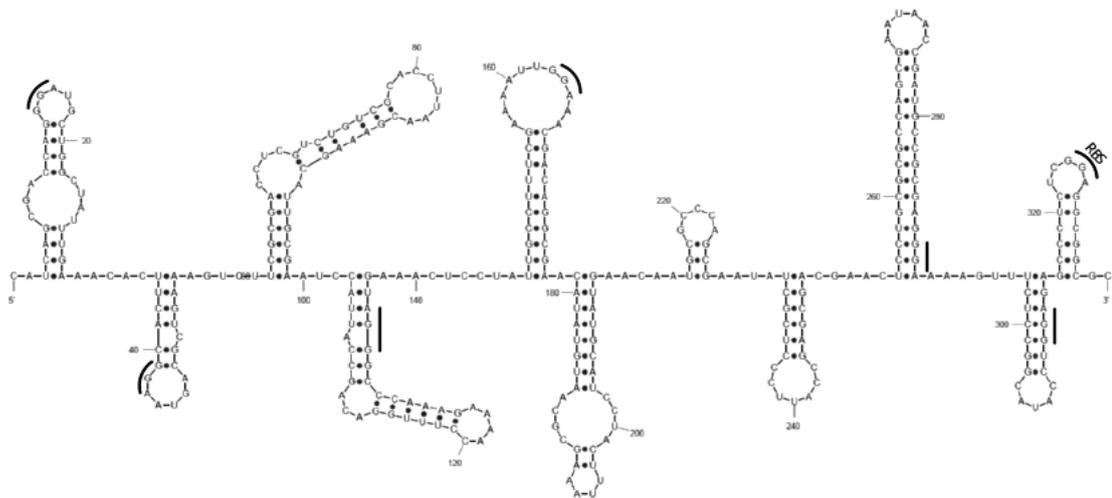
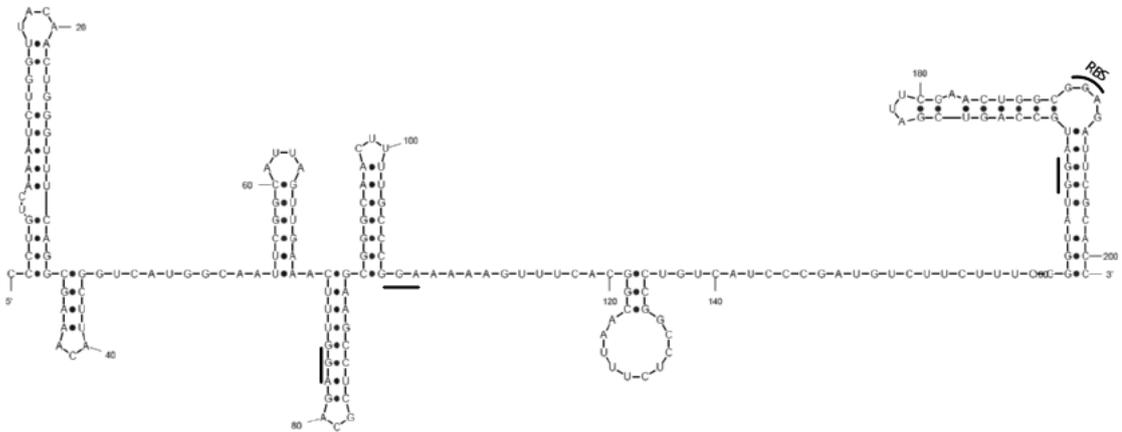
***phzA1******phzA2***

Figura 30. Estruturas secundárias das regiões 5' não traduzidas dos genes *phzA1* e *phzA2* preditas pelo programa Mfold. Estão destacados os motivos GGA e o sítio de ligação ao ribossomo (RBS).

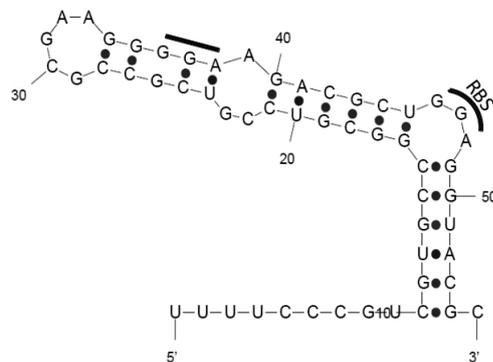


Figura 31. Estrutura secundária da região 5' não traduzida do gene *kerV* predita pelo programa Mfold. Estão destacados os motivos GGA e o sítio de ligação ao ribossomo (RBS).

Um ensaio controle com as sondas de *rsmZ* e *oprF* foi realizado para averiguar a especificidade de ligação de RsmA. A proteína recombinante His₆-RsmA foi adicionada em concentração crescente (2 a 10 μ M) e foi capaz de retardar os fragmentos de *rsmZ*, como esperado (figura 32). A adição do competidor (*rsmZ* em excesso não marcado radioativamente) foi capaz de sequestrar a proteína disponível, sendo possível observar a migração normal da sonda marcada livre. O mRNA de *oprF* foi marcado e submetido a eletroforese sem e com a presença de His₆-RsmA, e não foi possível ver na figura 32 diferença entre os padrões de migração. Esses resultados confirmam que RsmA é capaz de ligar especificamente a região 5' não traduzida de *rsmZ* e dos genes testados a seguir.

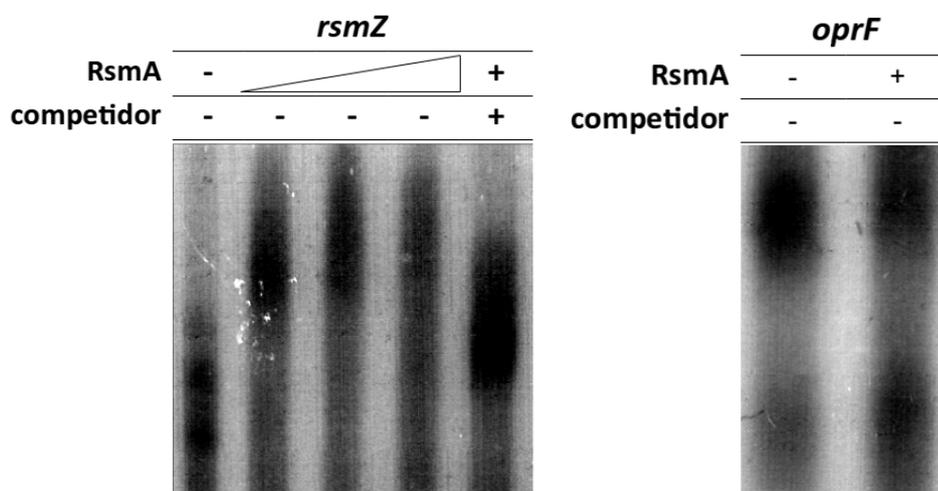


Figura 32. Ensaio de retardamento de migração de RNA em gel de poliacrilamida: controles. As sondas marcadas de *rsmZ* e *oprF* foram submetidas a eletroforese após terem sido incubadas com a proteína recombinante His₆-RsmA. A concentração crescente usada abrangeu de 2 a 10 μ M de RsmA e a concentração escolhida para realização das demais incubações foi 5 μ M.

Nos ensaios realizados com as sondas de interesse, His₆-RsmA foi capaz de retardar os fragmentos de mRNA de *phzA1*, *phzA2* e também *kerV* (figura 33). Com a adição do competidor (*rsmZ* em excesso não marcado radioativamente), foi observada a migração normal dos fragmentos marcados, mostrando que esses genes são diretamente regulados pela ligação de RsmA a sequência líder de seus mRNAs.

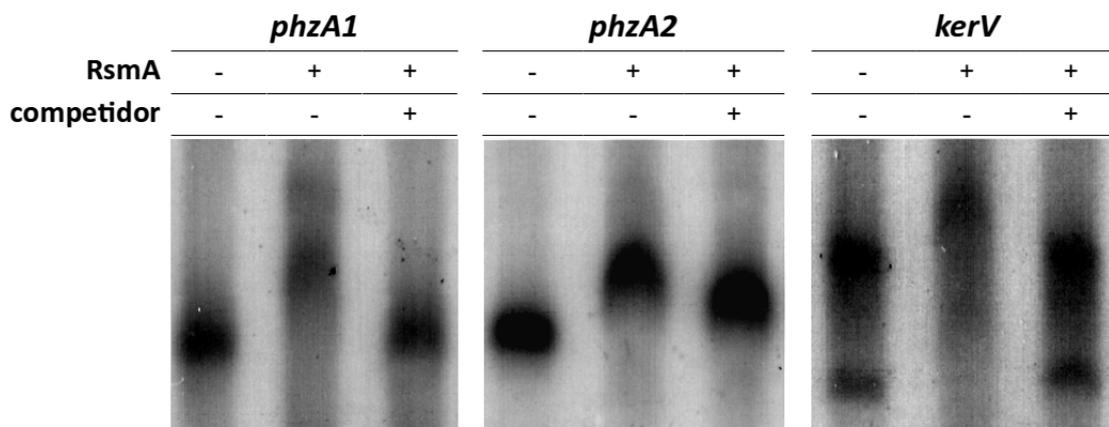


Figura 33. Ensaio de retardamento de migração de RNA em gel de poliacrilamida: *phzA1*, *phzA2* e *kerV*.

Em conjunto, esses dados comprovam que a deleção de *kerV* influencia a expressão dos operons *phz* e possivelmente os demais genes afetados por intermédio da ação de RsmA, cuja expressão é também, de forma direta ou indireta, afetada por KerV.

4.8 O mutante *lasR* é capaz de produzir piocianina em fase estacionária tardia

A proposta deste trabalho foi estudar a influência de KerV nos sistemas regulatórios de *P. aeruginosa* usando como ferramenta a expressão dos operons *phz*, que acreditava-se ter uma regulação vastamente descrita e estabelecida. Porém, no decorrer do desenvolvimento do projeto foi possível perceber que a linhagem PA14 tem algumas características bem distintas da linhagem PAO1 em relação a expressão desses genes.

Uma dessas características é que, durante a rotina no laboratório, notou-se que o mutante *lasR* é capaz de produzir piocianina quando submetido a um tempo de crescimento prolongado. Isso levou a investigar a hipótese de qual operon estaria sendo ativado nessas condições. A princípio, ensaios de qRT-PCR foram realizados com RNA total extraído de PA14 e do mutante *lasR* em DO = 3,0 (cerca de 4 horas de crescimento), quando a expressão dos genes responsáveis pela síntese de piocianina atinge o pico, e do mutante *lasR* em fase estacionária tardia (acima de 18 horas de crescimento). Foi possível observar a ativação da transcrição do gene *phzA1* no mutante *lasR* nas amostras mantidas em crescimento *overnight* (figura 34A). O mesmo não ocorre com o gene *phzA2* (figura 34B), levantando a hipótese de

que a expressão deste operon seja dependente de LasR e sugerindo a possibilidade de que o *lux-box* encontrado a montante desse gene seja um alvo desse regulador.

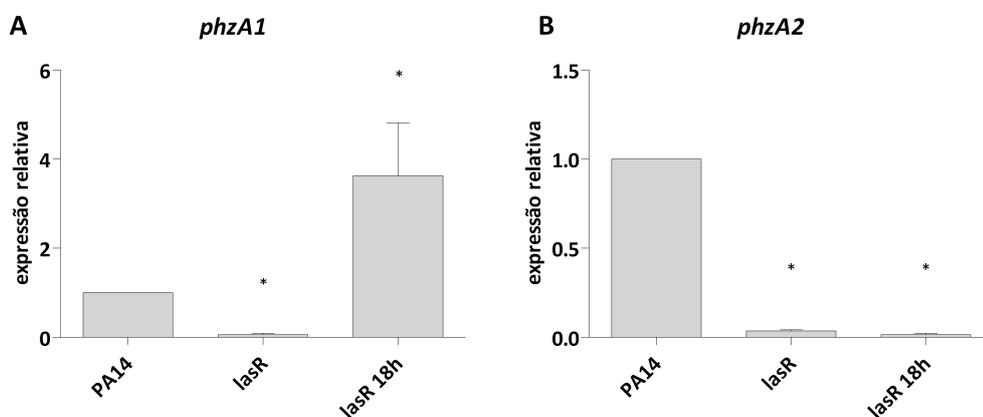


Figura 34. Efeito de LasR sobre os níveis relativos de mRNA de *phzA1* e *phzA2*. Níveis relativos de mRNA para esses genes foram determinados por ensaios de qRT-PCR a partir do RNA total das linhagens PA14 e mutante *lasR*, nas condições acima citadas. O gráfico mostra a média obtida de experimentos independentes e as barras de erro representam o desvio padrão para as réplicas experimentais.

Para confirmar esses dados, os plasmídeos pAN3 (*phzA1-lacZ*) e pAN4 (*phzA2-lacZ*) foram inseridos no mutante *lasR* para realização de ensaios de atividade da enzima β -galactosidase. Os ensaios foram realizados em microplatas de 96 poços e o protocolo está detalhado em Materiais e Métodos. O mutante *lasR* apresenta uma vantagem no crescimento quando comparado à PA14 (figura 35A). Corroborando os dados obtidos nos experimentos de qRT-PCR, o gene *phzA1* começa a ser expresso na fase estacionária no mutante *lasR*, porém em PA14 já teve seu pico de expressão na fase exponencial (figura 35B), enquanto o gene *phzA2* tem a expressão praticamente abolida durante o mesmo período de crescimento (figura 35C).

Esses resultados sugerem que (1) tanto *phzA1* quanto *phzA2* são dependentes direta ou indiretamente de LasR na fase exponencial do crescimento, porém (2) *phzA1* sofre uma ativação por algum fator independente de QS na fase estacionária, levando ao aumento da expressão observado. Finalmente, *phzA2* tem a expressão totalmente dependente de LasR. Entretanto, essa regulação é indireta, uma vez que uma fusão de transcrição com a deleção do *lux-box* encontrado na região a montante do gene não interfere na sua expressão nas condições testadas, ao contrário do que acontece com *phzA1* (figura 36).

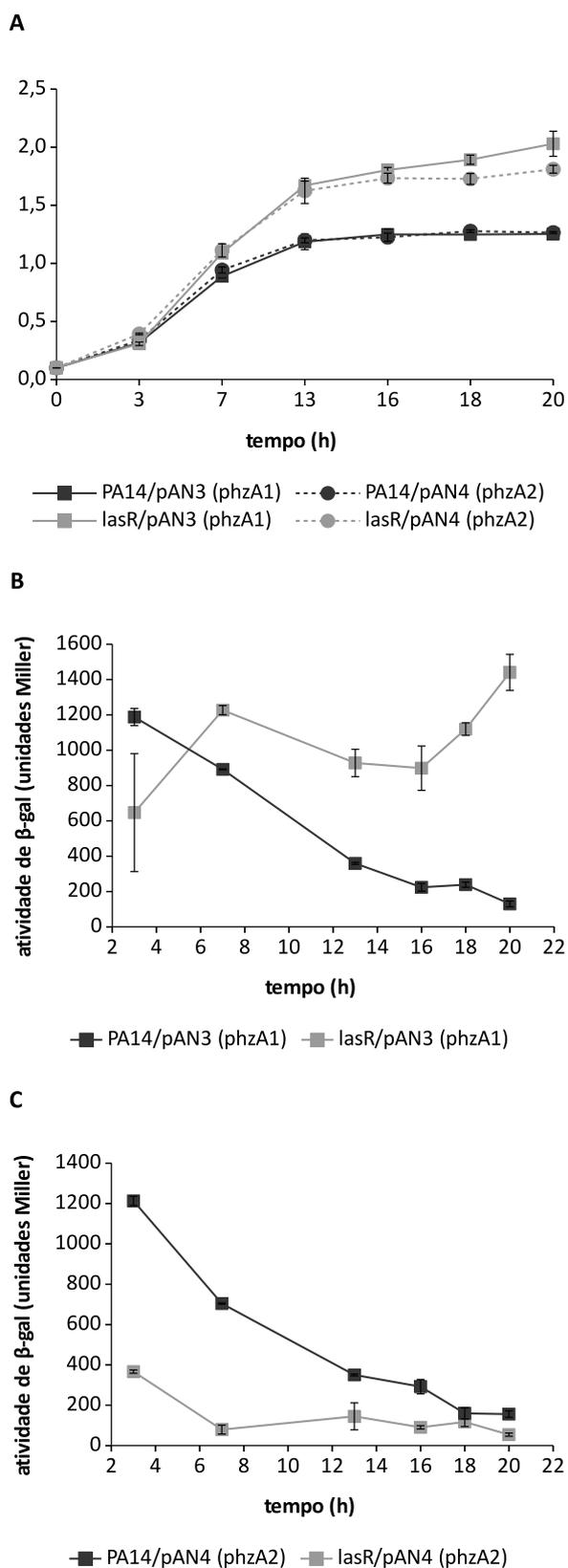


Figura 35. Efeito de LasR sobre a transcrição dos genes *phzA1* e *phzA2*. A linhagem PA14 e o mutante *lasR* foram cultivados em triplicata em meio A de King a 37°C com agitação e amostras foram coletadas principalmente ao longo da fase estacionária de crescimento. O gráfico é representativo de três experimentos independentes e as barras de erro mostram o desvio padrão obtido para cada linhagem testada.

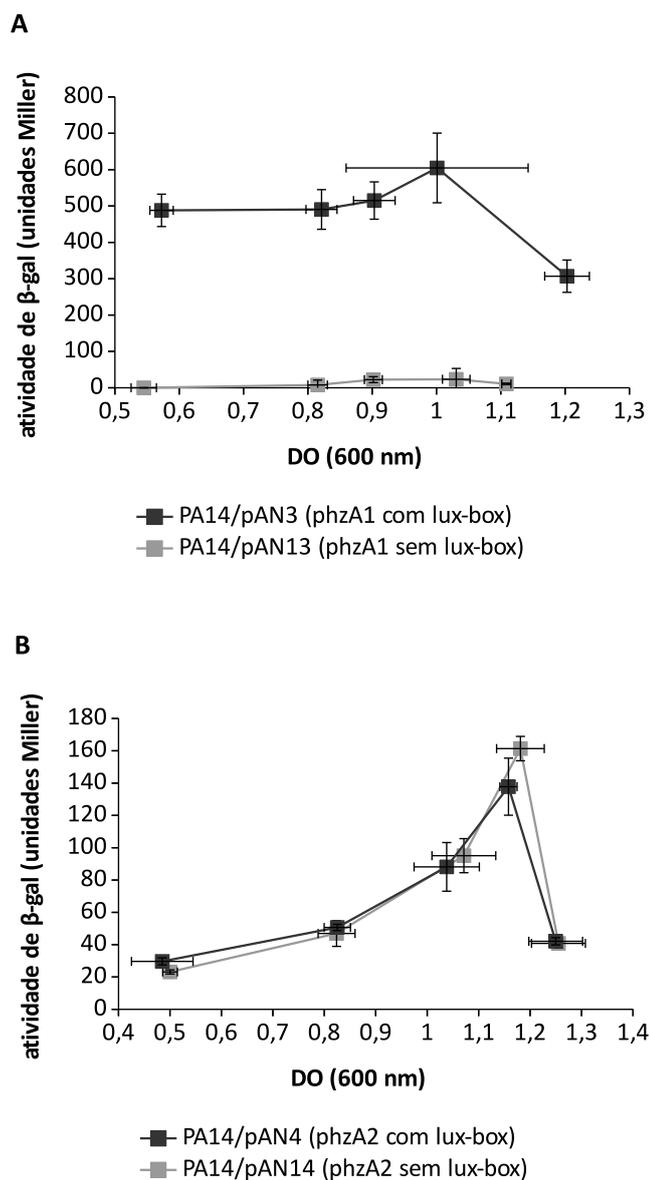


Figura 36. Importância do *lux-box* na expressão dos operons *phz*. Ensaio de atividade da enzima β-galactosidase foram realizados com a linhagem PA14 contendo as fusões de transcrição *phzA1-lacZ* na presença e na ausência do *lux-box*, pAN3 e pAN13, respectivamente (A). O mesmo foi feito com a fusão de transcrição *phzA2-lacZ*, pAN4 e pAN14 (B). O gráfico é representativo de experimentos independentes e as barras de erro mostram o desvio padrão obtido para cada linhagem testada.

Recentemente, Cabeen (2014) mostrou que a produção de piocianina pelo mutante *lasR* em fase estacionária tardia acontece devido a uma desrepressão do operon *phz1*. Na linhagem selvagem, a transcrição de *phz1* é reprimida pela proteína RsaL. RsaL é um regulador negativo conhecido por reprimir o sistema QS. Desempenha um importante papel na homeostase do sistema *las* por se ligar na região promotora do gene *lasI*, prevenindo a síntese de C12 e a ativação de genes alvos mediada por LasR. Além disso, RsaL é responsável pela regulação direta de outros 130 genes, incluindo *phz1*. A transcrição de *rsaL*, por sua vez,

é dependente de LasR (de Kievit *et al.*, 1999; Rampioni *et al.*, 2007, 2009). Na ausência de LasR, a transcrição de *rsaL* é abolida e isso resulta na desrepressão da transcrição de *phz1* em fase estacionária (Cabeen, 2014), que corrobora o fenótipo observado neste trabalho. Porém, nenhuma informação em relação a *phz2* e sua dependência de LasR consta na literatura até o presente e mais estudos são necessários para esclarecer esse ponto da regulação dos genes responsáveis pela síntese de piocianina.

5 CONCLUSÕES

- Ensaios de RT-PCR mostraram que apesar de *kerV* estar muito próximo aos genes vizinhos *rnhA* e *dnaQ*, esses genes não fazem parte de uma única unidade transcricional.
- Como esperado, D12 produz níveis elevados de piocianina, que resultam na cor verde mais intensa de suas culturas e fortemente sugere o envolvimento de KerV nos sistemas regulatórios de *P. aeruginosa*.
- A expressão de *kerV* parece ser induzida pelo regulador transcricional MvfR.
- KerV parece exercer um efeito positivo na expressão de *mvfR*, sugerindo um mecanismo de retroalimentação positiva.
- Os operons *phz* responsáveis pela síntese de piocianina são reprimidos por KerV, não estando claro se essa repressão ocorre apenas em nível transcricional, em nível pós-transcricional ou em ambos.
- A expressão de *rsmA* é levemente induzida por KerV, porém não foi detectada nenhuma influência de KerV sobre os pequenos RNAs RsmY e Rsm.
- Os inícios de transcrição de ambos operons *phz* foram determinados e foram encontradas prováveis sequências consenso para proteínas reguladores importantes, como os reguladores transcricionais do tipo LuxR e a proteína RsmA.
- A proteína recombinante His₆-RsmA foi expressa e purificada e usada para realização de ensaios de imunoblotting, mas não foi possível detectar diferenças entre a expressão de RsmA em PA14 e D12.
- Ensaios de *gel shift* usando a proteína recombinante His₆-RsmA mostraram que essa proteína se liga diretamente na sequência líder dos genes *phzA1* e *phzA2*, elucidando a maneira pela qual KerV exerce sua influência na expressão desses genes.
- A proteína His₆-RsmA foi ainda capaz de se ligar na região 5' não traduzida do gene *kerV*, apontando mais um elemento na regulação da expressão da proteína KerV.

- Os operons *phz* são diferencialmente regulados na linhagem PA14, visto que na ausência de *phz1*, *phz2* é desreprimido levando a um aumento na produção de piocianina. O contrário é visto no mutante *phz2*, onde a síntese do pigmento é ainda menor do que a vista para a linhagem selvagem.
- O mutante *lasR* é capaz de produzir piocianina quando submetido a um tempo de crescimento prolongado, sendo que a ativação de *phz1* é responsável por essa produção. O operon *phz2* não foi expresso no mutante *lasR*, mostrando que *phz2* é dependente de LasR indiretamente.

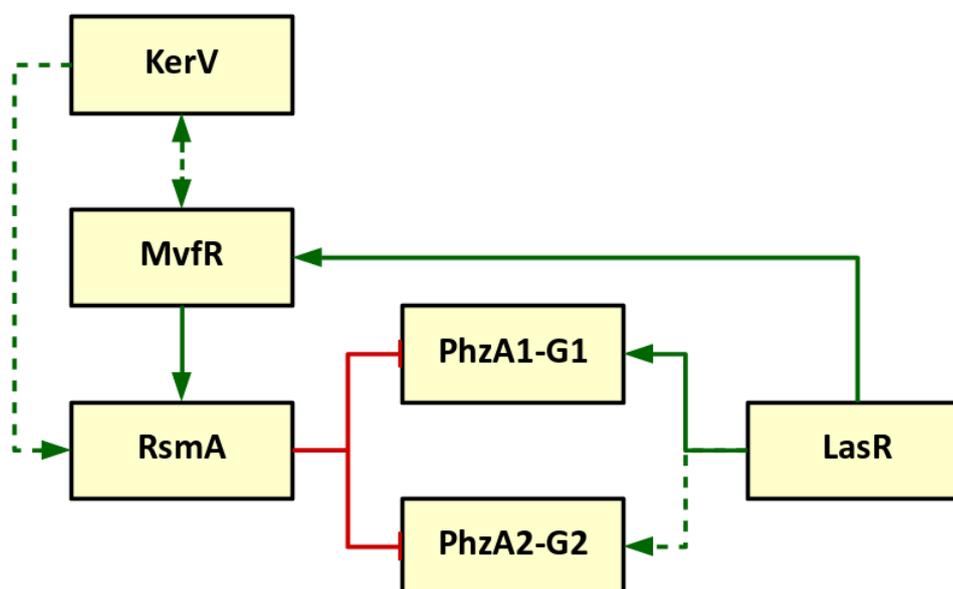


Figura 37. Esquema ilustrado das conclusões obtidas neste trabalho. As setas verdes indicam ativação da expressão gênica, enquanto as setas vermelhas indicam repressão da expressão gênica. As linhas tracejadas denotam uma regulação indireta, enquanto as linhas sólidas denotam uma regulação direta.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- An, D., Apidianakis, Y., Boechat, A. L., Baldini, R. L., Goumnerov, B. C. e Rahme, L. G. (2009). The pathogenic properties of a novel and conserved gene product, KerV, in Proteobacteria. *PLoS ONE*, 4(9):e7167.
- Apidianakis, Y., Mindrinos, M. N., Xiao, W., Lau, G. W., Baldini, R. L., Davis, R. W. e Rahme, L. G. (2005). Profiling early infection responses: *Pseudomonas aeruginosa* eludes host defenses by suppressing antimicrobial peptide gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(7):2573--2578.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingstone, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J. e Struhl, K. (1996). *Current protocols in molecular biology*. John Wiley and Sons, New York.
- Balasubramanian, D., Schneper, L., Kumari, H. e Mathee, K. (2013). A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Nucleic Acids Res*, 41(1):1--20.
- Brencic, A. e Lory, S. (2009). Determination of the regulon and identification of novel mRNA targets of *Pseudomonas aeruginosa* RsmA. *Mol. Microbiol.*, 72(3):612--632.
- Burrowes, E., Baysse, C., Adams, C. e O'Gara, F. (2006). Influence of the regulatory protein RsmA on cellular functions in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, as revealed by transcriptome analysis. *Microbiology (Reading, Engl.)*, 152(Pt 2):405--418.
- Cabeen, M. T. (2014). Stationary Phase-Specific Virulence Factor Overproduction by a *lasR* Mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE*, 9(2):e88743.
- Cao, H., Baldini, R. L. e Rahme, L. G. (2001a). Common mechanisms for pathogens of plants and animals. *Annu Rev Phytopathol*, 39:259--284.
- Cao, H., Krishnan, G., Goumnerov, B., Tsongalis, J., Tompkins, R. e Rahme, L. G. (2001b). A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98(25):14613--14618.
- Chen, W. P. e Kuo, T. T. (1993). A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Res.*, 21(9):2260.
- Choi, K.-H., Mima, T., Casart, Y., Rholl, D., Kumar, A., Beacham, I. R. e Schweizer, H. P. (2008). Genetic tools for select-agent-compliant manipulation of *Burkholderia pseudomallei*. *Appl Environ Microbiol*, 74(4):1064--1075.
- Choi, K.-H. e Schweizer, H. P. (2006). mini-Tn7 insertion in bacteria with single *attTn7* sites: example *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Protoc*, 1(1):153--161.
- Coggan, K. A. e Wolfgang, M. C. (2012). Global regulatory pathways and cross-talk control *Pseudomonas aeruginosa* environmental lifestyle and virulence phenotype. *Curr Issues Mol Biol*, 14(2):47--70.
- de Kievit, T., Seed, P. C., Nezezon, J., Passador, L. e Iglewski, B. H. (1999). RsaL, a novel repressor of virulence gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 181(7):2175--2184.
- Dekimpe, V. e Déziel, E. (2009). Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhIR regulates LasR-specific factors. *Microbiology (Reading, Engl.)*, 155(Pt 3):712--723.

- Déziel, E., Gopalan, S., Tampakaki, A. P., Lépine, F., Padfield, K. E., Saucier, M., Xiao, G. e Rahme, L. G. (2005). The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting *lasRI*, *rhlRI* or the production of *N*-acyl-L-homoserine lactones. *Mol. Microbiol.*, 55(4):998--1014.
- Déziel, E., Lépine, F., Milot, S., He, J., Mindrinos, M. N., Tompkins, R. G. e Rahme, L. G. (2004). Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101(5):1339--1344.
- Drenkard, E. (2003). Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect.*, 5(13):1213--1219.
- Essar, D. W., Eberly, L., Hadero, A. e Crawford, I. P. (1990). Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *J. Bacteriol.*, 172(2):884--900.
- Foster, P. L. e Marinus, M. G. (1992). Levels of epsilon, an essential replication subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase III, are controlled by heat shock proteins. *J. Bacteriol.*, 174(23):7509--7516.
- Fuqua, C. (2006). The QscR quorum-sensing regulon of *Pseudomonas aeruginosa*: an orphan claims its identity. *J. Bacteriol.*, 188(9):3169--3171.
- Hazan, R., He, J., Xiao, G., Dekimpe, V., Apidianakis, Y., Lesic, B., Astrakas, C., Déziel, E., Lépine, F. e Rahme, L. G. (2010). Homeostatic interplay between bacterial cell-cell signaling and iron in virulence. *PLoS Pathog.*, 6(3):e1000810.
- He, J., Baldini, R. L., Déziel, E., Saucier, M., Zhang, Q., Liberati, N. T., Lee, D., Urbach, J., Goodman, H. M. e Rahme, L. G. (2004). The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101(8):2530--2535.
- Heeb, S. e Haas, D. (2001). Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 14(12):1351--1363.
- Hernandez, M. E. e Newman, D. K. (2001). Extracellular electron transfer. *Cell. Mol. Life Sci.*, 58(11):1562--1571.
- Heurlier, K., Williams, F., Heeb, S., Dormond, C., Pessi, G., Singer, D., Cámara, M., Williams, P. e Haas, D. (2004). Positive control of swarming, rhamnolipid synthesis, and lipase production by the posttranscriptional RsmA/RsmZ system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.*, 186(10):2936--2945.
- Hoang, T. T., Karkhoff-Schweizer, R. R., Kutchma, A. J. e Schweizer, H. P. (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.
- Ikeno, T., Fukuda, K., Ogawa, M., Honda, M., Tanabe, T. e Taniguchi, H. (2007). Small and rough colony *Pseudomonas aeruginosa* with elevated biofilm formation ability isolated in hospitalized patients. *Microbiol. Immunol.*, 51(10):929--938.
- Juhas, M., Eberl, L. e Tümmler, B. (2005). Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environ. Microbiol.*, 7(4):459--471.
- Juhas, M., Wiehlmann, L., Huber, B., Jordan, D., Lauber, J., Salunkhe, P., Limpert, A. S., von Götz, F., Steinmetz, I., Eberl, L. e Tümmler, B. (2004). Global regulation of quorum sensing and virulence by VqsR in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading, Engl.)*, 150(Pt 4):831--841.

- Kay, E., Humair, B., Déneraud, V., Riedel, K., Spahr, S., Eberl, L., Valverde, C. e Haas, D. (2006). Two GacA-dependent small RNAs modulate the quorum-sensing response in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 188(16):6026--6033.
- King, E. O., Ward, M. K. e Raney, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin. Med.*, 44(2):301--307.
- Klockgether, J., Cramer, N., Wiehlmann, L., Davenport, C. F. e Tümmler, B. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* genomic structure and diversity. *Front Microbiol.*, 2:150.
- Kukavica-Ibrulj, I., Bragonzi, A., Paroni, M., Winstanley, C., Sanschagrín, F., O'Toole, G. A. e Levesque, R. C. (2008). In vivo growth of *Pseudomonas aeruginosa* strains PAO1 and PA14 and the hypervirulent strain LESB58 in a rat model of chronic lung infection. *J. Bacteriol.*, 190(8):2804--2813.
- Lau, G. W., Ran, H., Kong, F., Hassett, D. J. e Mavrodi, D. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice. *Infect. Immun.*, 72(7):4275--4278.
- Lee, D. G., Urbach, J. M., Wu, G., Liberati, N. T., Feinbaum, R. L., Miyata, S., Diggins, L. T., He, J., Saucier, M., Déziel, E., Friedman, L., Li, L., Grills, G., Montgomery, K., Kucherlapati, R., Rahme, L. G. e Ausubel, F. M. (2006). Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biol.*, 7(10):R90.
- Lesic, B., Lépine, F., Déziel, E., Zhang, J., Zhang, Q., Padfield, K., Castonguay, M.-H., Milot, S., Stachel, S., Tzika, A. A., Tompkins, R. G. e Rahme, L. G. (2007). Inhibitors of pathogen intercellular signals as selective anti-infective compounds. *PLoS Pathog.*, 3(9):1229--1239.
- Li, Y., Du, X., Lu, Z. J., Wu, D., Zhao, Y., Ren, B., Huang, J., Huang, X., Xu, Y. e Xu, Y. (2011). Regulatory feedback loop of two *phz* gene clusters through 5'-untranslated regions in *Pseudomonas* sp. M18. *PLoS ONE*, 6(4):e19413.
- Liang, H., Deng, X., Ji, Q., Sun, F., Shen, T. e He, C. (2012). The *Pseudomonas aeruginosa* global regulator VqsR directly inhibits QscR to control quorum-sensing and virulence gene expression. *J. Bacteriol.*, 194(12):3098--3108.
- Liberati, N. T., Urbach, J. M., Miyata, S., Lee, D. G., Drenkard, E., Wu, G., Villanueva, J., Wei, T. e Ausubel, F. M. (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. e Schmittgen, T. D. (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., Cannon, C. L. e Pier, G. B. (2000). Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect.*, 2(9):1051--1060.
- Mahajan-Miklos, S., Rahme, L. G. e Ausubel, F. M. (2000). Elucidating the molecular mechanisms of bacterial virulence using non-mammalian hosts. *Mol. Microbiol.*, 37(5):981--988.
- Mavrodi, D. V., Blankenfeldt, W. e Thomashow, L. S. (2006). Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. biosynthesis and regulation. *Annu Rev Phytopathol.*, 44:417--445.
- Mavrodi, D. V., Bonsall, R. F., Delaney, S. M., Soule, M. J., Phillips, G. e Thomashow, L. S. (2001). Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.*, 183(21):6454--6465.
- Meireles, D. A. (2011). *Estudo da função do gene kerV de Pseudomonas aeruginosa*. Tese de Doutorado, Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo, São Paulo.

- Miller, J. H.** (1972). *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Parsons, J. F., Greenhagen, B. T., Shi, K., Calabrese, K., Robinson, H. e Ladner, J. E.** (2007). Structural and functional analysis of the pyocyanin biosynthetic protein PhzM from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry*, 46(7):1821--1828.
- Pesci, E. C., Pearson, J. P., Seed, P. C. e Iglewski, B. H.** (1997). Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 179(10):3127--3132.
- Pessi, G. e Haas, D.** (2000). Transcriptional control of the hydrogen cyanide biosynthetic genes *hcnABC* by the anaerobic regulator ANR and the quorum-sensing regulators LasR and RhlR in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 182(24):6940--6949.
- Pessi, G., Williams, F., Hindle, Z., Heurlier, K., Holden, M. T., Cámara, M., Haas, D. e Williams, P.** (2001). The global posttranscriptional regulator RsmA modulates production of virulence determinants and *N*-acylhomoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 183(22):6676--6683.
- Potvin, E., Sanschagrín, F. e Levesque, R. C.** (2008). Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 32(1):38--55.
- Price-Whelan, A., Dietrich, L. E. P. e Newman, D. K.** (2007). Pyocyanin alters redox homeostasis and carbon flux through central metabolic pathways in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J. Bacteriol.*, 189(17):6372--6381.
- Rahme, L. G., Stevens, E. J., Wolfort, S. F., Shao, J., Tompkins, R. G. e Ausubel, F. M.** (1995). Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science*, 268(5219):1899--1902.
- Rahme, L. G., Tan, M. W., Le, L., Wong, S. M., Tompkins, R. G., Calderwood, S. B. e Ausubel, F. M.** (1997). Use of model plant hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94(24):13245--13250.
- Ramos, J.** (2004). *Pseudomonas: genomics, life style and molecular architecture*, volume 1. Springer US.
- Rampioni, G., Schuster, M., Greenberg, E. P., Bertani, I., Grasso, M., Venturi, V., Zennaro, E. e Leoni, L.** (2007). RsaL provides quorum sensing homeostasis and functions as a global regulator of gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.*, 66(6):1557--1565.
- Rampioni, G., Schuster, M., Greenberg, E. P., Zennaro, E. e Leoni, L.** (2009). Contribution of the RsaL global regulator to *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation. *FEMS Microbiol. Lett.*, 301(2):210--217.
- Ren, B., Shen, H., Lu, Z. J., Liu, H. e Xu, Y.** (2014). The *phzA2-G2* Transcript Exhibits Direct RsmA-Mediated Activation in *Pseudomonas aeruginosa* M18. *PLoS ONE*, 9(2):e89653.
- Romeo, T., Vakulskas, C. A. e Babitzke, P.** (2013). Post-transcriptional regulation on a global scale: form and function of Csr/Rsm systems. *Environ. Microbiol.*, 15(2):313--324.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. e Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Schell, M. A.** (1993). Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.*, 47:597--626.

- Schubert, M., Lapouge, K., Duss, O., Oberstrass, F. C., Jelesarov, I., Haas, D. e Allain, F. H.-T.** (2007). Molecular basis of messenger RNA recognition by the specific bacterial repressing clamp RsmA/CsrA. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 14(9):807--813.
- Schuster, M. e Greenberg, E. P.** (2006). A network of networks: quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Med. Microbiol.*, 296(2-3):73--81.
- Schuster, M. e Greenberg, E. P.** (2007). Early activation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* reveals the architecture of a complex regulon. *BMC Genomics*, 8:287.
- Schuster, M., Urbanowski, M. L. e Greenberg, E. P.** (2004). Promoter specificity in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing revealed by DNA binding of purified LasR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101(45):15833--15839.
- Silby, M. W., Winstanley, C., Godfrey, S. A. C., Levy, S. B. e Jackson, R. W.** (2011). *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiol Rev*, 35(4):652--680.
- Simon, R., Priefer, U. e Puhler, A.** (1983). A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Nat Biotech*, 1(9):784--791.
- Sonnleitner, E., Schuster, M., Sorger-Domenigg, T., Greenberg, E. P. e Bläsi, U.** (2006). Hfq-dependent alterations of the transcriptome profile and effects on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.*, 59(5):1542--1558.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G. K., Wu, Z., Paulsen, I. T., Reizer, J., Saier, M. H., Hancock, R. E., Lory, S. e Olson, M. V.** (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406(6799):959--964.
- Studier, F. e Moffatt, B. A.** (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*, 189(1):113--130.
- Wade, D. S., Calfee, M. W., Rocha, E. R., Ling, E. A., Engstrom, E., Coleman, J. P. e Pesci, E. C.** (2005). Regulation of *Pseudomonas* quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 187(13):4372--4380.
- Wagner, V. E. e Iglewski, B. H.** (2008). *P. aeruginosa* biofilms in CF infection. *Clin Rev Allergy Immunol*, 35(3):124--134.
- Wagner, V. E., Li, L.-L., Isabella, V. M. e Iglewski, B. H.** (2007). Analysis of the hierarchy of quorum-sensing regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Anal Bioanal Chem*, 387(2):469--479.
- Wei, X., Huang, X., Tang, L., Wu, D. e Xu, Y.** (2013). Global control of GacA in secondary metabolism, primary metabolism, secretion systems, and motility in the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* M18. *J. Bacteriol.*, 195(15):3387--3400.
- Westbrock-Wadman, S., Sherman, D. R., Hickey, M. J., Coulter, S. N., Zhu, Y. Q., Warrenner, P., Nguyen, L. Y., Shawar, R. M., Folger, K. R. e Stover, C. K.** (1999). Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump contributing to aminoglycoside impermeability. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43(12):2975--2983.
- Whiteley, M. e Greenberg, E. P.** (2001). Promoter specificity elements in *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing-controlled genes. *J. Bacteriol.*, 183(19):5529--5534.

- Whiteley, M., Lee, K. M. e Greenberg, E. P.** (1999). Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96(24):13904--13909.
- Whiteley, M., Parsek, M. R. e Greenberg, E. P.** (2000). Regulation of quorum sensing by RpoS in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 182(15):4356--4360.
- Wiehlmann, L., Munder, A., Adams, T., Juhas, M., Kolmar, H., Salunkhe, P. e Tümmler, B.** (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., Lam, D. K. W., Fleming, L., Lo, R., Whiteside, M. D., Yu, N. Y., Hancock, R. E. W. e Brinkman, F. S. L.** (2011). *Pseudomonas* Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes. *Nucleic Acids Res.*, 39(Database issue):D596--600.
- Xiao, G., Déziel, E., He, J., Lépine, F., Lesic, B., Castonguay, M.-H., Milot, S., Tampakaki, A. P., Stachel, S. E. e Rahme, L. G.** (2006a). MvfR, a key *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity LTTR-class regulatory protein, has dual ligands. *Mol. Microbiol.*, 62(6):1689--1699.
- Xiao, G., He, J. e Rahme, L. G.** (2006b). Mutation analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* *mvfR* and *pqsABCDE* gene promoters demonstrates complex quorum-sensing circuitry. *Microbiology (Reading, Engl.)*, 152(Pt 6):1679--1686.
- Zuker, M.** (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.*, 31(13):3406--3415.

SÚMULA CURRICULAR

1 Dados pessoais

Nome: Ana Paula Barbosa do Nascimento

Local e Data de Nascimento: Santos - SP, 24 de agosto de 1981

Endereço eletrônico: apbn@usp.br, ana.pbn@gmail.com

2 Formação acadêmica

2.1 Graduação

Centro Universitário Lusíada (UNILUS), Santos - SP. **Bacharelado em Ciências Biológicas - Modalidade Médica (Biomedicina).**

2.2 Pós-graduação

Doutorado direto em Ciências Biológicas (Bioquímica).

Um novo gene de *Pseudomonas aeruginosa* envolvido em percepção de quórum.
Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo - SP.
Fevereiro de 2008 até o presente, sob supervisão da Professora Doutora Regina Lúcia Baldini. Agências financiadoras CAPES e FAPESP.

2.2.1 Monitoria

Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE), Departamento de Bioquímica, USP. Março a julho de 2013. Disciplina QBQ105 - Bioquímica e Biologia Molecular, sob a supervisão do Professor Doutor Manuel Troyano Pueyo.

3 Ocupação

Bosista de Doutorado Direto:

- CAPES, junho a setembro de 2008.
- FAPESP, outubro de 2008 a janeiro de 2014.

4 Publicações

4.1 Resumos em congressos

- **NASCIMENTO, A. P. B.;** BALDINI, R. L.. Análise das regiões regulatórias dos operons *phz* de *Pseudomonas aeruginosa*. In: 27^o Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013, Natal. Anais do 27^o Congresso Brasileiro de Microbiologia 2013, 2013.
- **NASCIMENTO, A. P. B.;** BALDINI, R. L.. Effect of KerV on the posttranscriptional regulatory system Gac-Rsm in *Pseudomonas aeruginosa*. In: ASM Conference on Prokaryotic Cell Biology and Development, 2012, Montreal. ASM Conference on Prokaryotic Cell Biology and Development, 2012.
- **NASCIMENTO, A. P. B.;** BALDINI, R. L.. Efeito de KerV no sistema de regulação pós-transcricional Gac-Rsm de *Pseudomonas aeruginosa*. In: II Congresso Institucional do Instituto de Química, 2012, Guarujá. II Congresso Institucional do Instituto de Química, 2012.
- **NASCIMENTO, A. P. B.;** BALDINI, R. L.. Efeito de KerV sobre a regulação dos operons de síntese de piocianina em *Pseudomonas aeruginosa*. In: 56^o Congresso Brasileiro de Genética, 2010, Guarujá. 56^o Congresso Brasileiro de Genética, 2010.
- BALDINI, R. L.; **NASCIMENTO, A. P. B.;** DEKIMPE, V.; DEZIEL, E.; RAHME, L. G.. A new player in the *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing circuitry. In: 108th American Society for Microbiology General Meeting, 2008, Boston. 108th American Society for Microbiology General Meeting, 2008.
- BALDINI, R. L.; **NASCIMENTO, A. P. B.;** DEZIEL, E.; APIDIANAKIS, Y.; RAHME, L. G.. Um novo gene de *Pseudomonas aeruginosa* envolvido em patogenicidade. In: 52^o Congresso Brasileiro de Genética, 2006, Foz do Iguaçu. 52^o Congresso Brasileiro de Genética, 2006.