



**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E BIOLÓGICAS**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FUNCIONAL DE PA0657, UMA  
PROTEASE ATP-DEPENDENTE de *Pseudomonas aeruginosa*

**Franciele Maria Zanol**

Caxias do Sul

2013

**Franciele Maria Zanol**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FUNCIONAL DE PA0657, UMA  
PROTEASE ATP-DEPENDENTE de *Pseudomonas aeruginosa***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação  
em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul,  
visando à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

**Orientador:** Prof. Dr. Jomar Pereira Laurino

**Co-orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Longaray Delamare

Caxias do Sul

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Universidade de Caxias do Sul  
UCS - BICE - Processamento Técnico

Z33c Zanol, Franciele Maria  
Caracterização molecular e funcional de PA0657, uma protease ATP-  
dependente de *Pseudomonas aeruginosa* / Franciele Maria Zanol. – 2013.  
101 f. : il. ; 30 cm

Apresenta bibliografia.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa  
de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2013.  
Orientador: Prof. Dr. Jomar Pereira Laurino ; Coorientador: Profa.  
Dra. Ana Paula Longaray Delamare.

1. *Pseudomonas aeruginosa*. 2. Bactérias gram-negativas. 3.  
Proteínas. 4. Biotecnologia. I. Título.

CDU 2.ed.: 579.84

Índice para o catálogo sistemático:

1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	579.84
2. Bactérias gram-negativas	579.84
3. Proteínas	577.112.4
4. Biotecnologia	57.08

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária  
Ana Guimarães Pereira – CRB 10/1460

**Franciele Maria Zanol**

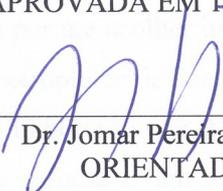
**Caracterização molecular e funcional de PA0657, uma protease ATP-dependente de  
*Pseudomonas aeruginosa***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Jomar Pereira Laurino

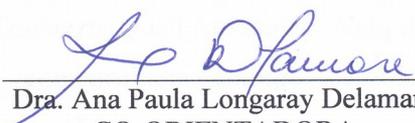
Co-orientador: Dra. Ana Paula Longaray  
Delamare

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 16 DE DEZEMBRO DE 2013.



---

Dr. Jomar Pereira Laurino  
ORIENTADOR



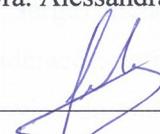
---

Dra. Ana Paula Longaray Delamare  
CO-ORIENTADORA



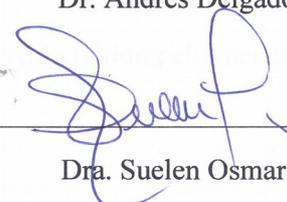
---

Dra. Alessandra Mattos Saliba



---

Dr. Andrés Delgado Cañedo



---

Dra. Suelen Osmarina Paesi

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

Ao Professor Dr. Jomar Pereira Laurino, meu orientador, pelos importantes ensinamentos tanto científicos como pessoais, pela constante disponibilidade e dedicação empregadas neste trabalho e por despertar em mim, ainda mais, o interesse pela ciência. Obrigada pelo carinho, pelos conselhos, incentivo e, principalmente, pela convivência e amizade ao longo desses anos de trabalho.

A Professora Dra. Ana Paula Longaray Delamare, minha co-orientadora, pela oportunidade, sugestões e apoio na realização deste trabalho.

Ao bolsista de iniciação científica Mauricio Schiavo pelo constante auxílio e prestatividade.

Ao meu colega e amigo Jucimar Zacaria pela incansável disposição em me ouvir, me auxiliar e discutir comigo inúmeros resultados.

A Luciana Touguinha por me acolher junto ao LBVM e, especialmente, pela amizade, incentivo, motivação e pelo exemplo de dedicação e persistência.

A todos os colegas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Microbiologia Aplicada pela colaboração e pela convivência e, em especial, as minhas amigas Evanise Visentini, Angélica Onzi, Fabíola Toniazzo, Queli Montanari, Valquíria Reis e Ronize dos Santos, pelo companheirismo e por compartilhem comigo desabafos, experiências, momentos de frustração, alegria e descontração.

A pesquisadora Cláudia Laurino pelas sugestões, colaboração e por tantas vezes abrir as portas da sua casa para que pudéssemos trabalhar com mais tranquilidade.

Aos professores Dr. Sérgio Echeverrigaray e Dra. Suelen Paesi por todas as observações, sugestões e considerações referentes a este trabalho.

A Universidade de Caxias do Sul e ao PPG em Biotecnologia pelo apoio e pela oportunidade.

Ao Professor Dr. Aldo Dillon pelo incentivo.

A Lucimara Serafini, secretária do PPG, pela eficiência e cordialidade em tratar de assuntos pertinentes.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio na concessão de bolsa de pós-graduação.

A minha família, especialmente aos meus pais Enio e Maria Luiza, por serem meus maiores incentivadores e por acreditarem que sou capaz. Vocês são exemplo e inspiração para mim. Aos meus irmãos Fabiano e Carine, pela amizade, parceria e companheirismo. Obrigada por vocês existirem e estarem sempre por perto. Amo muito vocês.

A Deus por permitir que chegasse até aqui e por fazer tudo possível em minha vida, guiando meus passos e iluminando meus caminhos.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivos Gerais.....	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 Características Gerais e Importância Clínica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	4
3.2 Fatores Sigma e Regulação da Expressão Gênica em <i>P. aeruginosa</i> .....	10
3.2.1 Fator Sigma 32 ( <i>rpoH</i> ) em <i>P. aeruginosa</i> .....	17
3.3 Proteases AAA+ (ATPases Associadas à diversas Atividades celulares).....	20
3.3.1 Protease FtsH ( <i>filamentation temperature-sensitive</i> ) AAA+.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1 Análises de bioinformática do gene PA0657 de <i>P. aeruginosa</i> O1.....	24
4.2 Linhagens bacterianas e condições de cultivo.....	24
4.3 Procedimentos moleculares relacionados à amplificação e clonagem do gene PA0657 de <i>P. aeruginosa</i> .....	26
4.3.1 Extração de DNA genômico de <i>P. aeruginosa</i> .....	26

4.3.2 Amplificação do gene PA0657 de <i>P. aeruginosa</i> .....	27
4.3.3 Separação e visualização dos segmentos amplificados.....	28
4.3.4 Construção dos vetores pJL01 e pJL02.....	28
4.3.4.1 Construção do vetor pJL01.....	28
4.3.4.2 Construção do vetor pJL02.....	30
4.3.4.3 Preparação de células de <i>E. coli</i> competentes com cloreto de cálcio e transformação por choque térmico.....	31
4.3.4.4 Preparação de células de <i>E. coli</i> eletrocompetentes e transformação por eletroporação.....	32
4.3.4.5 Confirmação da obtenção dos plasmídeos recombinantes.....	33
<b>4.4 Procedimentos relacionados à purificação e expressão da proteína recombinante em <i>E. coli</i>.....</b>	<b>35</b>
4.4.1 Expressão e purificação da proteína recombinante em <i>E. coli</i> .....	35
4.4.2 Quantificação de proteína total por Coomassie Azul Brilhante.....	37
4.4.3 Avaliação da proteína recombinante por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	37
4.4.4 Avaliação da proteína recombinante através de Western-Blot.....	38
<b>4.4.5 Avaliação da atividade enzimática (ATPase) da proteína recombinante purificada PA0657.....</b>	<b>38</b>
<b>4.5 Procedimentos relacionados à avaliação da expressão da proteína PA0657 e sua influência na modulação de genes de resposta ao choque térmico.....</b>	<b>39</b>
4.5.1 Preparação de células de <i>P. aeruginosa</i> O1 eletrocompetentes e transformação por eletroporação.....	39
4.5.2 Recombinação homóloga e exclusão do vetor.....	40

<b>4.5.3 Realização do choque térmico empregando a linhagem rompida e a linhagem selvagem de <i>P. aeruginosa</i> O1.....</b>	<b>41</b>
<b>4.5.4 Extração do RNA total da linhagem rompida e da linhagem selvagem de <i>P. aeruginosa</i> O1.....</b>	<b>41</b>
<b>4.5.5 Síntese de cDNA a partir do RNA total obtido da linhagem rompida e da linhagem selvagem de <i>P. aeruginosa</i> O1.....</b>	<b>42</b>
<b>4.5.6 Avaliação da expressão de genes relacionados ao choque térmico nas linhagens rompida e selvagem de <i>P. aeruginosa</i> O1.....</b>	<b>42</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>5.1. Análises computacionais – bioinformática.....</b>	<b>44</b>
5.1.1 Análise da sequência gênica de PA0657 e identificação dos domínios da proteína.....	44
5.1.2 Alinhamento das sequências proteicas PA0657 de <i>P. aeruginosa</i> e FtsH de <i>E. coli</i> .....	48
<b>5.1.3 Modelagem tridimensional da proteína codificada pelo gene PA0657 em relação ao Ftsh de <i>E. coli</i> K12.....</b>	<b>49</b>
<b>5.2 Clonagem do gene PA0657 de <i>P. aeruginosa</i> e expressão heteróloga da proteína recombinante.....</b>	<b>54</b>
<b>5.3 Determinação da atividade enzimática da proteína recombinante.....</b>	<b>59</b>
<b>5.4 Clonagem do gene PA0657 de <i>P. aeruginosa</i> e ruptura gênica por recombinação homóloga.....</b>	<b>63</b>
<b>5.5 Avaliação da expressão de genes envolvidos na resposta a condições de estresse celular em <i>P. aeruginosa</i> O1.....</b>	<b>73</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>83</b>
<b>7. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>84</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>85</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Linhagens bacterianas, características fenotípicas e referência ou origem..	25
<b>Tabela 2.</b> Sequências correspondentes a cada <i>primer</i> , tamanho do amplicon e finalidade de sua utilização.....	27
<b>Tabela 3:</b> Genes avaliados por meio de qRT-PCR com suas respectivas funções; <i>primers</i> utilizados, sequências e tamanho dos fragmentos obtidos.....	43

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Domínios conservados dos 4 grupos de fatores sigma da família $\sigma^{70}$ . Adaptado de Rodrigue <i>et al.</i> (2006).....	14
<b>Figura 2.</b> Estrutura e organização dos domínios AAA <sup>+</sup> . Adaptado de Hanson & Whiteheart (2005).....	21
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática do plasmídeo PinPoint <sup>TM</sup> Xa-1.....	29
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática do plasmídeo pKnockout-G (Windgassen <i>et al.</i> , 2000).....	30
<b>Figura 5.</b> Região promotora do gene PA0657.....	45
<b>Figura 6.</b> Domínios funcionais conservados presentes na ORF PA0657 de <i>P. aeruginosa</i> segundo o CDD.....	46
<b>Figura 7.</b> Domínios funcionais conservados presentes na ORF PA0657 de <i>P. aeruginosa</i> segundo o CDD.....	47
<b>Figura 8.</b> Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína PA0657 de <i>P. aeruginosa</i> e da proteína Ftsh de <i>E. coli</i> K12.....	48
<b>Figura 9.</b> Modelagem <i>in silico</i> da proteína PA0657.....	50
<b>Figura 10.</b> Modelagem <i>in silico</i> da estrutura terciária da proteína PA0657 de <i>P. aeruginosa</i> O1.....	51
<b>Figura 11.</b> Gráfico de Ramachandran exemplificando a estereoquímica dos aminoácidos presentes na proteína PA657 de <i>P. aeruginosa</i> de acordo com a distribuição dos ângulos <i>phi</i> e <i>psi</i> .....	52
<b>Figura 12.</b> Gráfico de Ramachandran de PA0657 em relação a fita modelo de FtsH de <i>E. coli</i> K12.....	53
<b>Figura 13.</b> Amplificação dos produtos de PCR referentes aos transformantes clonados em vetor de expressão PinPoint <sup>TM</sup> Xa-1 em gel de agarose 0,8% com TBE 1X.....	55
<b>Figura 14.</b> Representação esquemática do segmento gênico PA0657 inserido no plasmídeo PinPoint <sup>TM</sup> Xa-1.....	56
<b>Figura 15.</b> Expressão heteróloga em <i>E. coli</i> da proteína expressa pelo gene PA0657 de <i>P. aeruginosa</i> avaliada em SDS-PAGE 10%.....	58

<b>Figura 16.</b> Avaliação da atividade ATPásica da proteína recombinante PA0657 na presença dos cofatores $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ , $\text{Mn}^{2+}$ , $\text{Fe}^{3+}$ e $\text{Zn}^{2+}$ .....	59
<b>Figura 17.</b> Avaliação da atividade nucleotidásica da proteína recombinante e da apirase na presença de adenosina trifosfato (ATP) e $\text{Zn}^{2+}$ .....	61
<b>Figura 18.</b> A- Avaliação da atividade ATPásica da proteína recombinante PA0657 em diferentes concentrações de $\text{Zn}^{2+}$ .....	62
<b>Figura 19.</b> Amplificação do gene PA0657 por PCR a partir do DNA genômico de <i>P. aeruginosa</i> utilizando primers p20-p21.....	64
<b>Figura 20.</b> Amplificação do fragmento gênico PA0657 de <i>P. aeruginosa</i> inserido em plasmídeo pKnockout G.....	65
<b>Figura 21.</b> Representação esquemática do segmento gênico PA0657 p20-p21 inserido no plasmídeo pKnockout G.....	66
<b>Figura 22.</b> Representação geral do nocaute gênico PA0657 de <i>P. aeruginosa</i> por recombinação homóloga simples com uso do plasmídeo “suicida” pJL02.....	67
<b>Figura 23.</b> Confirmação da ruptura do gene PA0657 de PAO1.....	68
<b>Figura 24.</b> Isolado de <i>P. aeruginosa</i> O1 selvagem apresentando e isolados que apresentaram ruptura gênica do segmento gênico PA0657 crescidos em meio cetrimida.....	70
<b>Figura 25.</b> A- Isolado de <i>P. aeruginosa</i> O1 selvagem e isolados que apresentaram ruptura gênica do segmento gênico PA0657, crescidos em meio de cultura LB acrescido de gentamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).....	71
<b>Figura 26.</b> Expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ ) do gene PA0657 antes do choque térmico, 5 e 30 minutos após a exposição da linhagem selvagem PA0657 e da linhagem rompida PA0657::GmR I à estresse térmico de 50 °C.....	74
<b>Figura 27.</b> Expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ ) do gene <i>dnaK</i> antes do choque térmico, 5 e 30 minutos após a exposição da linhagem selvagem PA0657 e da linhagem rompida PA0657::GmR I à estresse térmico de 50°C.....	76
<b>Figura 28.</b> Expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ ) do gene <i>dnaJ</i> antes do choque térmico, 5 e 30 minutos após a exposição da linhagem selvagem PA0657 e da linhagem rompida PA0657::GmR I à estresse térmico de 50°C.....	77

**Figura 29.** Expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) do gene *groEL* antes do choque térmico, 5 e 30 minutos após a exposição da linhagem selvagem PAO657 e da linhagem rompida PA0657::GmR I à estresse térmico de 50°C..... 78

**Figura 30.** Expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) do gene *groES* antes do choque térmico, 5 e 30 minutos após a exposição da linhagem selvagem PAO657 e da linhagem rompida PA0657::GmR I à estresse térmico de 50°C..... 79

**Figura 31.** Expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) do gene *algU* antes do choque térmico, 5 e 30 minutos após a exposição da linhagem selvagem PAO657 e da linhagem rompida PA0657::GmR I à estresse térmico de 50°C..... 80

## LISTA DE ABREVIATURAS

AAA<sup>+</sup>- ATPases Associadas à diversas Atividades celulares.

ADP- Adenosina Difosfato.

AMP- Adenosina Monofosfato.

ATP- Adenosina Trifosfato.

BacPP- *Bacterial Promoter Prediction*.

BLAST-P- *Basic Local Alignment Search Tool Protein*.

BSA- *Bovine Serum Albumin*.

CDD- Base de Dados de Domínios Conservados.

cDNA- *Complementary Deoxiribonucleic Acid*.

CDTA- *1,2 Cycloxylenedinitrilotetraacetic acid*.

CFTR- Canal Regulador de Condutância Transmembrana.

CIP- *Calf Intestinal Phosphatase*.

DEPC- Dietilpirocarbonato.

DNA- *Deoxiribonucleic Acid*.

dNTP- *Deoxynucleotide Triphosphates*.

D.O.- Densidade Óptica.

DTT- *Dithiotreitol*.

ECF- Fator  $\sigma$  de Função Extracitoplasmática.

EDTA- Ácido Etilenodiaminotetracético.

EF2- Fator 2 de Elongação.

FtsH- *Filamentation Temperature-Sensitive*.

HflB- *High Frequency of Lysogeny*.

HRP- *Horseradish Peroxidase*.

HSPs- *Heat Shock Proteins*.

KDa- *Kilodalton*.

LB - Luria Bertani.

LPS- Lipopolissacarídeo de parede celular.

M-MLV- *Moloney Murine Leukemia Virus*.

NAD- *Nicotinamide Adenine Dinucleotide*.

NCBI - *National Collection of Industrial Bacteria.*

ORFs- *Open Reading Frames.*

PAO1- *Pseudomonas aeruginosa* O1.

pb- Pares de bases.

PCR- *Polymerase Chain Reaction.*

Pi- Fosfato inorgânico.

qRT-PCR- *quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction.*

RNA- *Ribonucleic Acid.*

rRNA- *Ribosomal Ribonucleic Acid.*

SDS-PAGE- *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis.*

SOC- *Super Optimal Broth.*

TBE- Tris-Borato-EDTA.

TCA- *Tri Chloro Acetic Acid.*

UDG- *Uracil DNA Glycosylase.*

UV- Ultra Violeta.

## RESUMO

Uma característica associada à capacidade de *Pseudomonas aeruginosa* sobreviver e disseminar-se frente a situações adversas encontradas no ambiente e no organismo de hospedeiros é a regulação de genes de resposta a condições de estresse celular, que incluem o evento de choque térmico. A exposição do microrganismo a um ambiente de alta temperatura resulta na indução da síntese de proteínas específicas, representadas por chaperonas e proteases, que conferem um aumento da viabilidade celular microbiana em condições consideradas letais. Presume-se que o gene PA 0657 de *P. aeruginosa* O1 possa estar associado à indução ou supressão do processo transcricional de genes envolvidos na resposta ao choque térmico. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a função do gene PA0657 de *P. aeruginosa* O1. Para isso, análises bioinformáticas foram realizadas e o gene foi clonado e expresso em sistema bacteriano, produzindo uma proteína recombinante que foi purificada e caracterizada enzimaticamente. Além disso, uma linhagem de *P. aeruginosa* O1 com o gene PA0657 rompido por recombinação homóloga foi construída, sendo submetida, juntamente com a linhagem selvagem, a uma condição de estresse térmico, permitindo que a expressão de diversos genes associados ao evento de choque térmico pudessem ser avaliadas por qRT-PCR. Os resultados mostraram que a proteína recombinante PA0657 foi capaz de degradar adenosina trifosfato (ATP), dependente do íon  $Zn^{2+}$ . Foi possível verificar também que a linhagem rompida perdeu a capacidade de produzir o pigmento piocianina quando crescida em meio cetrimida e não apresentou seu fenótipo mucóide. Em análise *in silico* observou-se que a região promotora do gene PA0657 é dependente de  $\sigma^{32}$  e a análise de expressão gênica evidenciou uma diminuição de expressão do gene *rpoH* na linhagem selvagem de PAO1 após choque térmico, sendo este gene significativamente expresso na linhagem rompida. Observou-se também um acentuado aumento na expressão do gene *algU*, nestas mesmas condições, na linhagem selvagem PAO1, com ausência de expressão na linhagem rompida. É possível concluir, dessa forma, que o gene PA0657 exerce participação importante no processo de regulação de resposta ao choque térmico e está relacionado com a conversão do fenótipo mucóide.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*, proteínas de choque térmico, chaperonas, sigma 32.

## ABSTRACT

A feature associated with the ability of *Pseudomonas aeruginosa* survive and dissemination in adverse conditions found in the environment and in hosts' organisms is a specific genes regulation of stress response, including heat shock event. The exposure of microorganisms to a high temperature environment results in the induction of synthesis of specific proteins, represented by chaperones and proteases, conferring an increase of the microbial cell viability under conditions considered lethal. It is presumed that the PA0657 gene of *P. aeruginosa* O1 can be related to the induction or suppression of transcriptional process of genes that are involved in a response to heat shock. In this context, the aim of this work was to characterize the function of the PA0657 gene of *P. aeruginosa* O1. In this way, bioinformatic analyzes were performed and the gene was cloned and expressed in bacterial system, producing recombinant protein which was purified and enzymatically characterized. Moreover, the PA0657 gene of *P. aeruginosa* O1 strain was disrupted by homologous recombination. The wild type strain and the disrupted strain were submitted to a thermal stress and the expression of various genes associated with heat shock event could be evaluated by qRT-PCR. The results showed that the PA0657 recombinant protein was capable of degrading adenosine triphosphate (ATP) in a Zn<sup>2+</sup> dependent manner. It was also verified that the disrupted strain lost its ability to produce pyocyanin pigment when grown on cetrimide means and its mucoid phenotype. It was possible to find in computational analysis that the promoter region of the PA0657 gene is dependent on  $\sigma^{32}$ . The gene expression analysis showed a decrease in expression of the *rpoH* gene in the wild type strain after heat shock, this gene is significantly expressed in the disrupted strain. A significant increase in expression of the *algU* gene was observed, on the wild type strain with absence of expression in the disrupted strain. Therefore, it was possible to conclude that the PA0657 gene acts in the regulatory process of thermal shock response and is related to the conversion of the mucoid phenotype.

Keywords : *Pseudomonas aeruginosa* , heat shock proteins , chaperones , sigma 32.

## 1 INTRODUÇÃO

*Pseudomonas aeruginosa* é caracterizada como um bacilo Gram-negativo não fermentador de glicose amplamente distribuído no solo, ambientes aquáticos, em plantas e animais. Está associada a infecções comunitárias e nosocomiais, sendo considerado um dos principais patógenos causadores de infecções hospitalares e apresentando uma enorme gama de mecanismos de resistência a diversos antimicrobianos.

Em vista disso, esse microrganismo representa um grande risco à saúde de pacientes imunodeprimidos, portadores de fibrose cística, pacientes com grandes queimaduras, com infecção urinária em uso de cateteres, sondas e tubo endotraqueal. Em pacientes debilitados, a infecção por *P. aeruginosa* pode facilmente resultar em graves septicemias, uma vez que este microrganismo corresponde a uma das espécies mais virulentas dentre os bacilos Gram-negativos.

A *P. aeruginosa* apresenta genoma relativamente grande e uma complexidade genética que permite que a bactéria se adapte a diversos ambientes e cresça em condições menos favoráveis. Uma característica que pode estar relacionada ao fato desta bactéria conseguir sobreviver e disseminar-se frente a situações adversas encontradas no ambiente e no organismo de hospedeiros consiste na ativação de genes específicos de resposta a condições de estresses, que incluem o evento de choque térmico. A regulação da expressão gênica ocorre por meio de fatores sigmas alternativos e garante o aumento da viabilidade celular do microrganismo em condições consideradas letais.

A exposição do microrganismo a um ambiente de alta temperatura resulta na ativação do fator sigma 32 ( $\sigma^{32}$ ), responsável pela indução da síntese de proteínas de choque térmico, representadas pelas chaperonas e proteases. Estas proteínas são responsáveis, respectivamente, por reparar o dano potencial causado a proteína devido à exposição ao calor, garantindo sua correta conformação, e por remover proteínas desnaturadas, na impossibilidade de uma reestruturação proteica adequada.

Uma classe importante de proteases celulares é representada pela proteína FtsH, a qual integra a família de proteínas denominadas AAA (Atpases Associadas à diversas Atividades celulares). Esta proteína é considerada essencial para a viabilidade da bactéria e está associada

à regulação da resposta ao choque térmico, através da degradação do fator  $\sigma^{32}$  em temperaturas normais de crescimento.

Presume-se que o gene PA0657 possa estar associado à indução ou supressão do processo transcricional de proteínas envolvidas com o evento de choque térmico. Neste contexto, a caracterização do gene PA0657 em *P. aeruginosa* irá possibilitar uma melhor compreensão das funções bioquímicas e moleculares do mesmo, relacionando o papel da proteína codificada pelo gene como fator de virulência e o envolvimento deste no processo de transcrição de proteínas em resposta a condições de estresse, como o evento de choque térmico.

Visto que esta bactéria é uma constante preocupação em infecções nosocomiais e por se tratar de um microrganismo com grande capacidade patogênica e cujas infecções são de difícil tratamento devido à presença de inúmeros mecanismos de resistência a antimicrobianos, estudos como este poderão contribuir para descoberta de novos alvos terapêuticos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem por objetivo estudar a função do gene PA0657 de *Pseudomonas aeruginosa* a fim de caracterizar suas funções bioquímicas e interações moleculares durante situações de estresse celular.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Realizar análises *in silico* da proteína correspondente ao gene PA0657.
- Clonar em vetor de expressão a região codificadora do gene PA0657.
- Avaliar a capacidade da proteína recombinante de degradar nucleotídeos trifosfatados e determinar as condições favoráveis para a atividade enzimática da proteína recombinante.
- Realizar a ruptura do segmento gênico PA0657 relativo a esta provável “protease ATP dependente” em *P. aeruginosa* O1.
- Avaliar a expressão dos genes *alguU*, *dnaJ*, *dnaK*, *groEL*, *groES* e *rpoH*, envolvidos na resposta ao choque térmico e a relação desses genes com a atividade da proteína PA0657.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Características Gerais e Importância Clínica de *Pseudomonas aeruginosa*

O gênero *Pseudomonas* pertence à família *Pseudomonaceae* e compreende, em sua grande maioria, um grupo de microrganismos de vida livre que podem ser considerados eventuais causadores de doenças em espécies vegetais e animais, incluindo o homem. O gênero é composto por espécies clinicamente importantes que incluem as espécies fluorescentes *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* e não fluorescentes *P. stutzeri*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. alcaligenes* e *P. mendocina* (Todar, 2004).

*P. aeruginosa* é a principal espécie de interesse clínico do gênero, sendo caracterizada como um bacilo Gram-negativo aeróbio, capaz de se desenvolver de forma semelhante em ambientes desprovidos de oxigênio na presença de nitrato utilizado como aceptor final de elétrons. Trata-se de um microrganismo incapaz de obter energia através do processo de fermentação, utilizando a via oxidativa para degradar glicose e outros carboidratos (Sader *et al.*, 2001; Zavascki *et. al.*, 2006).

Em relação à morfologia, esta bactéria apresenta-se como um bastonete reto ou curvilíneo, com tamanho variando entre 0,5 e 0,7 µm de espessura e 1,5 e 3,0 µm de comprimento. Move-se através de flagelos polares e caracteriza-se fisiologicamente por possuir a enzima citocromo-c e produzir indofenol oxidase (Trabulsi & Lincopan, 2008).

*P. aeruginosa* apresenta a capacidade de produzir distintos pigmentos hidrossolúveis difusíveis no meio de cultivo, tais como a piocianina e a pioverdina que se caracterizam por conferir cor azul e verde fluorescente, respectivamente. Alguns isolados podem, eventualmente, produzir os pigmentos piorrubina, de cor vermelha, e piomelanina, de coloração marrom a preta (Polac, 2000). Dentre estes pigmentos, o mais comum é a piocianina, sendo exclusivamente produzido por esta espécie bacteriana (Merino, 2007).

Os isolados de *P. aeruginosa* são facilmente identificados em meios de cultivo devido à morfologia das colônias, ao odor de fruta característico e à produção de pigmentos. Desenvolvem-se bem entre 37 °C e 42 °C, não toleram pH ácido e a identificação bioquímica engloba reações de oxidase, indofenol e arginina-hidrolase positivas, capacidade de utilizar citrato e oxidar glicose e xilose (Gillardi, 1981; Polac, 2000).

A *P. aeruginosa* apresenta distribuição ubíqua e pode ser encontrada no solo, água e plantas. Corresponde a um importante microrganismo oportunista humano capaz de provocar infecções quando mecanismos de defesa locais ou gerais do hospedeiro apresentam-se desregulados. Esta bactéria corresponde ao principal bacilo Gram-negativo não fermentador isolado de amostras clínicas, sendo considerado um dos mais frequentes agentes causadores de infecções nosocomias (Lautenback *et. al.*, 2006; Trabulsi & Lincopan, 2008). Além de ser considerado um patógeno modelo de oportunismo em humanos, este microrganismo é responsável por uma ampla variedade de doenças que engloba desde infecções superficiais de pele até septicemias fatais, sobretudo em pacientes imunossuprimidos (Burns *et al.*, 1990; Kiska & Gillian, 2003).

Dentre as infecções adquiridas na comunidade por pacientes que não apresentam imunossupressão destacam-se a foliculite e a otite externas, normalmente relacionadas ao contato com água contaminada (Kiska & Gillian, 2003). Este microrganismo está ainda associado a diversas infecções primárias de pele, principalmente em queimaduras, podendo estar envolvido com quadros de bacteremias decorrentes de queimaduras mais graves (Japoni *et al.*, 2009).

Casos de pneumonia comunitária causadas por *P. aeruginosa* já foram relatados e estão associados a indivíduos que apresentam doença pulmonar crônica. No entanto, a pneumonia comunitária corresponde à doença de maior prevalência entre pacientes que se apresentam imunossuprimidos e em portadores de fibrose cística (Henderson *et al.*, 1992; Schuster *et al.*, 1994).

Estudos apontam que *P. aeruginosa* está entre os cinco principais microrganismos causadores de pneumonia, bacteremia e infecções do trato urinário e de feridas cirúrgicas no ambiente nosocomial (Veesenmeyer *et al.*, 2009).

Por ser um importante agente etiológico frequentemente relacionado a infecções nosocomiais, *P. aeruginosa* representa um grave problema em hospitais, podendo comprometer a condição de pacientes com leucemia aguda, pacientes com grandes queimaduras, pacientes com infecção urinária em uso de cateteres, que utilizam sondas e tubos endotraqueais e imunossupressos em geral, aumentando as possibilidades de infecções generalizadas que podem resultar em sepses fulminantes (Dong *et al.*, 2008).

Sabe-se que *P. aeruginosa* corresponde ao principal microrganismo isolado de pacientes com infecções respiratórias agudas que foram submetidos à ventilação mecânica e de pacientes com infecções respiratórias crônicas, além de ser a espécie bacteriana mais prevalente em infecções do trato respiratório de portadores de fibrose cística (Wiener-Kronish, 2006; Lipuma, 2010).

A fibrose cística corresponde a uma doença hereditária autossômica recessiva onde os indivíduos acometidos apresentam mutações no gene do canal regulador de condutância transmembrana (CFTR), que leva a uma falha no transporte intracelular de cloreto, acarretando na produção anormal de um muco que obstrui pulmões e outros órgãos (Hutchison *et al.*, 1999; Hentzer *et al.*, 2003).

Pacientes portadores de fibrose cística costumam estar colonizados por *P. aeruginosa* e apresentam uma taxa de sobrevivência menor, sendo a doença pulmonar crônica, acompanhada por processos infecciosos e inflamatórios que resultam na deterioração progressiva da função pulmonar e insuficiência respiratória, a principal causa de mortalidade associada a esta enfermidade (Knowles *et al.*, 1986).

*P. aeruginosa* é considerada uma das espécies mais virulentas entre os bacilos Gram-negativos não fermentadores e entre os fatores de virulência que contribuem para esta característica destacam-se a presença de adesinas, a produção de alginato, a produção de enzimas, de leucocidina e de outras toxinas. Estes fatores de virulência são classificados em fatores celulares e extracelulares (Head *et al.*, 2004).

Os fatores de virulência celulares compreendem os flagelos, fímbrias e as endotoxinas. Os flagelos correspondem a apêndices de superfície que conferem motilidade ao microrganismo e as fímbrias, também conhecidas como pili, contribuem para a aderência da bactéria aos glicolipídeos GM-1, constituintes de membrana das células epiteliais do hospedeiro (Kipnis *et al.*, 2006).

O lipopolissacarídeo de parede celular (LPS) corresponde a um dos principais fatores de virulência celulares, sendo responsável por características endotóxicas do patógeno e podendo desencadear no hospedeiro a síndrome do choque séptico, cujos sintomas compreendem febre, leucopenia ou leucocitose, coagulação intravascular disseminada e anomalias metabólicas, através da liberação de mediadores da resposta inflamatória (Ferreira,

2005). O LPS também auxilia o microrganismo no processo de adesão às células do hospedeiro e contribui para a classificação do sorogrupo desta bactéria (Kipnis *et al.*, 2006).

Dentre os fatores de virulência extracelulares destaca-se o exopolissacarídeo alginato. Este exopolissacarídeo favorece a adesão bacteriana às superfícies das células epiteliais, principalmente células pulmonares, atua como fator antifagocitário, confere uma alta tolerância à ação de anticorpos, dificulta a difusão de antibióticos e está relacionado com o fenótipo mucóide característico de algumas bactérias (Bryan, 1983; Head *et al.*, 2004, Lincopan *et al.*, 2004).

Em pacientes com fibrose cística que apresentam infecções pulmonares de repetições causadas por *P. aeruginosa* observa-se uma hiperprodução de alginato, responsável por uma modificação nas características deste patógeno que passa a se apresentar como um bacilo encapsulado altamente mucóide (Blondel *et al.*, 2007; Hentzer *et al.*, 2003).

O alginato está envolvido também na formação de biofilmes, caracterizados como sendo aglomerados de células bacterianas envolvidas por uma matriz de polímeros extracelulares que auxiliam a bactéria na adesão a superfícies e a substratos bióticos ou abióticos (Hogardt *et al.*, 2004). O biofilme representa uma forma de proteção do microrganismo, permitindo que ele sobreviva em ambientes hostis e protegendo-o da ação do sistema imunológico do hospedeiro, além de impedir a difusão de agentes antimicrobianos (Head *et al.*, 2004).

Outro importante fator de virulência em *P. aeruginosa* está relacionado à produção de proteases extracelulares como a elastase A e elastase B. As proteases correspondem a uma classe de enzimas responsáveis pela hidrólise parcial ou total de determinadas proteínas, atuando internamente na cadeia de polipeptídeos e sendo classificadas de acordo com seu sítio ativo nos subgrupos serina, cisteína, ácido aspártico e metaloproteases (Chen *et al.*, 2003). Em *P. aeruginosa*, as proteases favorecem o estabelecimento do microrganismo através de dano tecidual, contribuindo para o processo invasivo e patogenicidade deste microrganismo (Zivkovic *et al.*, 2010).

A elastase B é uma metaloprotease que contém um íon zinco em seu sítio ativo, sendo responsável por degradar elastina e colágeno e inativar componentes do sistema imunológico do hospedeiro como a imunoglobulina G, atuando após a ação da protease elastase A, que possui uma serina em seu sítio ativo (Bever *et al.*, 1988; Lincopan *et al.*, 2004).

A elastina corresponde a um dos principais componentes estruturais do tecido pulmonar e, devido a isso, a produção de elastase A, elastase B e demais proteases alcalinas por *P. aeruginosa* é considerada um importante agravante nos casos de pneumonias provocadas por este microrganismo. Os danos ao tecido pulmonar e vasos sanguíneos resultantes da degradação da elastina, decorrentes da ação combinada destas enzimas, favorece a disseminação desta bactéria a partir de sítios isolados da infecção (Heck *et al.*, 1986; Lincopan *et al.*, 2004).

Outro fator de virulência com importância evidenciada em *P. aeruginosa* corresponde a exotoxina A, sendo considerado um dos principais fatores de patogenicidade da espécie (Murray *et al.*, 2010). Trata-se de uma proteína termolábil produzida por grande parte das cepas que causam infecção clínica, apresentando mecanismo de ação semelhante ao da toxina diftérica produzida por *Corynebacterium diphtheriae* e ao da toxina Shiga, produzida por *Shigella dysenteriae*. A exotoxina A atua inibindo a síntese proteica através do bloqueio da elongação da cadeia de peptídeos nas células eucarióticas por meio da transferência de ADP-ribose do NAD para o fator 2 de elongação (EF-2), resultando na inativação do processo de biossíntese proteica e consequente morte celular (Levinson *et al.*, 2011).

A exotoxina A está associada à invasão bacteriana, necrose tecidual e imunossupressão. Contribui ainda para a dermonecrose em lesões decorrentes de queimaduras, lesões da córnea em infecções oculares e está relacionada a danos teciduais em infecções pulmonares crônicas (Murray *et al.*, 2010).

Outros fatores de virulência extracelulares que contribuem para o processo invasivo de *P. aeruginosa* e interferem no sistema imunológico do hospedeiro podem ser citados, tais como as fosfolipases C, leucocidinas e piocianinas. As fosfolipases C são responsáveis por hidrolisar fosfolipídios de membrana e destruir o surfactante pulmonar, contribuindo para que as infecções agudas e crônicas causadas por *P. aeruginosa* se estabeleçam. As leucocidinas e piocianinas, por sua vez, correspondem, respectivamente, a uma citotoxina que inibe a função de neutrófilos e linfócitos e a uma substância que apresenta atividade bactericida, impedindo a proliferação de diversas espécies de microrganismos, além de catalisar a produção de superóxido e peróxido de hidrogênio, que apresentam propriedades citotóxicas em células eucarióticas (Hassett *et al.*, 1992; Win *et al.*, 2006).

Por ser tratar de uma bactéria com destacada importância clínica e que apresenta características que incluem mecanismos de resistência a antimicrobianos, capacidade de se adaptar aos mais diversos ambientes e possuir uma vasta gama de fatores de patogenicidade, muitos estudos são conduzidos a fim de compreender ainda mais o comportamento de *P. aeruginosa* como patógeno humano oportunista.

Em grande parte dos estudos genéticos e funcionais relacionados ao metabolismo e fisiologia em *Pseudomonas* a linhagem de *P. aeruginosa* O1 (PAO1) é utilizada como referência. Esta bactéria foi inicialmente isolada de uma ferida cirúrgica na Austrália, em 1954 e teve seu genoma completo sequenciado por um consórcio liderado por Stover e colaboradores (2000), correspondendo a um dos maiores genomas bacterianos já sequenciados (Holloway *et al.*, 1979; Klockgether *et al.*, 2010). O genoma da PAO1 apresenta-se com 6,3 milhões de pares de base, contendo 5.570 *open reading frames* (ORFs). Sua complexidade genética aproxima-se da observada no eucarioto *Saccharomyces cerevisiae*, cujo genoma codifica cerca de 6.200 proteínas (Ball *et al.*, 2000).

Atualmente quatro genomas completos de *P. aeruginosa* estão anotados, incluindo o de PAO1 (Stover *et al.*, 2000), sendo que o sequenciamento de mais de dez genomas relacionados a outras linhagens desta espécie já estão em andamento ([www.pseudomonas.com/viewAllGenomes.do](http://www.pseudomonas.com/viewAllGenomes.do)).

A aparente ausência de duplicações gênicas recentes indica que o tamanho do genoma de *P. aeruginosa* está associado à sua grande diversidade gênica e funcional. Estas características podem ocorrer devido a adaptações evolutivas que permitem a este microrganismo crescer em diversos ambientes, habituar-se a condições menos favoráveis e resistir a uma variedade de substâncias antimicrobianas (Stover *et al.*, 2000).

Os organismos procariotos apresentam mecanismos de resistência a antimicrobianos, os quais podem ser intrínsecos ou adquiridos. Muitos destes mecanismos estão associados à frequente exposição da bactéria aos antimicrobianos comumente utilizados em hospitais (Frost *et al.*, 2005).

Um enfoque bastante frequente em diversos estudos é a avaliação dos efeitos de concentrações subletais de agentes antimicrobianos na expressão de diferentes genes em microrganismos, uma vez que bactérias respondem a doses subletais alterando seu perfil de expressão gênica. Linares e colaboradores (2006) mostraram que a exposição de *P.*

*aeruginosa* a doses subletais de norfloxacina, tetraciclina e tobramicina podem induzir a formação de biofilmes e promover a expressão de determinantes de virulência. Por outro lado, o contato do microrganismo com o peptídeo antimicrobiano LL-37 pode ocasionar a supressão na expressão de genes essenciais para a formação de biofilmes (Overhage *et al.*, 2008).

Em estudo recente, Kindrachuk e colaboradores (2011) avaliaram os efeitos da exposição a concentrações letais, inibitórias e sub-inibitórias de tobramicina sobre a expressão gênica de *P. aeruginosa* e comprovaram que concentrações distintas deste antimicrobiano podem causar diferentes impactos sobre a expressão gênica da bactéria. Os autores observaram que a exposição de *P. aeruginosa* a concentrações letais de tobramicina resultaram em uma rápida alteração na expressão de possíveis genes de resistência a aminoglicosídeos, favorecendo a adaptação do microrganismo a estas condições. De acordo com o estudo, a capacidade da bactéria em sobreviver a concentrações elevadas do antimicrobiano pode estar associada a um aumento na expressão de genes de resposta ao choque térmico que conferem uma proteção de curto prazo contra concentrações letais deste aminoglicosídeo.

### **3.2 Fatores Sigma e Regulação da Expressão Gênica em *P. aeruginosa***

Os fatores sigma ( $\sigma$ ) constituem uma classe de proteínas cuja associação com o núcleo da RNA-polimerase possibilita a formação de um mecanismo para respostas celulares mediadas pelo redirecionamento do início da transcrição. Além disso, esses fatores contêm grande parte dos determinantes para reconhecimento de promotores e contribuem para a separação da dupla fita de DNA durante o processo transcricional (Kazmierczak *et al.*, 2005; Sachdeva *et al.*, 2009).

É conhecido o fato de organismos procariotos, principalmente os que apresentam crescimento rápido, possuírem um fator  $\sigma$  primário responsável pela transcrição de genes importantes para o metabolismo celular - genes *housekeeping*- sendo, desta forma, considerados essenciais para a sobrevivência dos microrganismos (Sachdeva *et al.*, 2009; Pátek & Nesvera, 2011).

Outra característica de procariotos é o genoma capaz de codificar um número variável de fatores  $\sigma$  alternativos não essenciais, que reconhecem promotores de genes ativados em

resposta a estímulos específicos como condições de estresse, escassez de nutrientes, transição de fases de crescimento ou diferenciação morfológica. Além disso, fatores  $\sigma$  alternativos apresentam a capacidade de afetar direta ou indiretamente a virulência de bactérias patogênicas (Helmann, 2002; Kazmierczak *et al.*, 2005; Pátek & Nesvera, 2011).

O primeiro fator  $\sigma$  foi descrito inicialmente em 1969, como uma subunidade da RNA polimerase de *Escherichia coli* necessária para o reconhecimento do promotor (Burgess *et al.*, 1969). Posteriormente, com a descoberta de que o processo de esporulação em *Bacillus subtilis* é controlado por uma cascata de fatores  $\sigma$  alternativos, verificou-se que uma mesma bactéria poderia apresentar múltiplos fatores  $\sigma$  (Losick & Pero, 1981).

Atualmente, sabe-se que em procariotos o número de fatores  $\sigma$  pode variar de um único gene, como ocorre em *Mycoplasma genitalium*, dois genes, como os presentes no Gram-positivo *Streptococcus pyogenes*, cujo habitat se restringe à orofaringe humana, a mais de 60 genes, como os encontrados em outra bactéria Gram-positiva, a *Streptomyces coelicolor*, que apresenta um habitat altamente variável em termos de nutrientes, estresses e comunidade microbiana competitiva (Gruber & Gross, 2003; Mittenhuber, 2002; Sachdeva *et al.*, 2009).

Sabe-se ainda que o número de fatores  $\sigma$  de um microrganismo, de modo geral, aumenta proporcionalmente ao tamanho do seu genoma e que bactérias capazes de sofrer diferenciação tendem a apresentar uma maior proporção de fatores  $\sigma$  alternativos por tamanho de genoma, quando comparadas com patógenos obrigatórios ou comensais (Sachdeva *et al.*, 2009).

Além do principal fator sigma, o  $\sigma^{70}$  ou rpoD, as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas apresentam fatores sigma alternativos. Inicialmente os fatores  $\sigma$  bacterianos foram agrupados em duas famílias estrutural, funcional e fisiologicamente distintas, denominadas família do  $\sigma^{54}$  e  $\sigma^{70}$ , classificadas com base na similaridade de sequência, organização estrutural e mecanismos de ação (Wosten, 1998; Pátek & Nesvera, 2011; Sachdeva *et al.*, 2009).

Os fatores da família  $\sigma^{54}$  são assim classificados devido a sua similaridade com o fator  $\sigma$  de 54 kDa de *E. coli*, responsável pela regulação do metabolismo de nitrogênio. Necessitam tanto de ATP quanto da ação de um acentuador para serem capazes de exercer sua função,

sendo considerados relativamente raros, já que não possuem representantes em nenhuma bactéria Gram-positiva cujo genoma apresenta alto conteúdo de G+C (Sachdeva *et al.*, 2009).

O fator  $\sigma^{54}$ , também denominado  $\sigma^N$ , em grande parte das espécies que o possuem, está envolvido nos processos de assimilação de nitrogênio, motilidade, transporte de nutrientes, formação de pili, sinalização célula-célula e tolerância ao zinco. Os fatores  $\sigma$  dessa família reconhecem as regiões promotoras -12 e -24 para ativar a transcrição gênica (Kazmierczak *et al.*, 2005; Potvin *et al.*, 2008).

Já os fatores  $\sigma$  da família  $\sigma^{70}$  são assim classificados devido a sua similaridade com o fator  $\sigma$  primário de 70 kDa, também de *E. coli*, sendo encontrados em todas as espécies bacterianas (Sachdeva *et al.*, 2009). As eubactérias possuem ao menos um fator  $\sigma$  principal ou primário pertencente a esta família, responsável pela ativação da transcrição de grande parte dos genes constitutivos (*housekeeping*), através do reconhecimento das regiões promotoras -10 e -35 (Sachdeva *et al.*, 2009). O fator  $\sigma^A$  de *Bacillus subtilis* e o fator  $\sigma^{70}$  codificado pelo gene *rpoD* de *E. coli* são exemplos de fatores  $\sigma$  reguladores da transcrição de genes essenciais às respectivas espécies (Helmann, 2002; Kazmierczak *et al.*, 2005).

Grande parte dos fatores  $\sigma$  de bactérias pertencentes à família  $\sigma^{70}$  é dividida em vários grupos e subgrupos relacionados filogeneticamente (Helmann, 2002). De modo geral, o agrupamento dos fatores  $\sigma$  de acordo com as suas funções correlaciona-se com as relações filogenéticas entre as suas estruturas proteicas (Kazmierczak *et al.*, 2005). De acordo com esse modo de classificação, é possível afirmar que os fatores  $\sigma$  que compõe a família dos  $\sigma^{70}$  correspondem a proteínas modulares, compostas por até quatro regiões de sequências conservadas, as quais podem ser divididas em sub-regiões e contribuem para a ligação do fator  $\sigma$  ao cerne da RNA polimerase (Rodrigue *et al.*, 2006; Pátek & Nesvera, 2011).

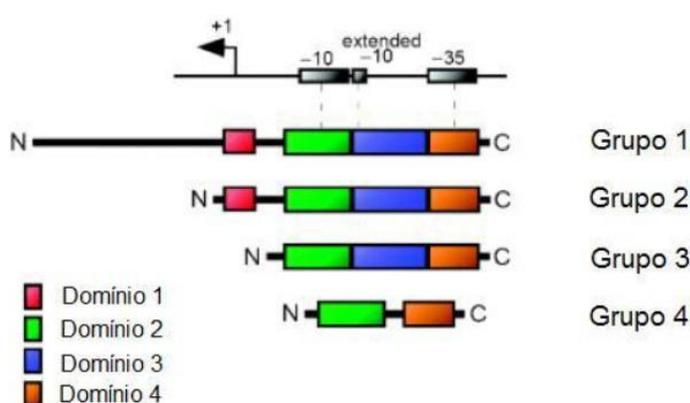
De acordo com sua estrutura, função e com base nos domínios proteicos, os fatores  $\sigma$  pertencentes à família  $\sigma^{70}$  podem ser separados em quatro grupos (figura 1). O primeiro grupo é composto pelos fatores  $\sigma$  primários e inclui  $\sigma^{70}$  de *E. coli* e seus ortólogos, correspondendo a proteínas essenciais responsáveis pela transcrição de grande parte dos genes *housekeeping*. São, dessa forma, essenciais para a viabilidade celular e apresentam os domínios 1, 2, 3 e 4 (Loneto *et al.*, 1994; Manganeli *et al.*, 2004; Rodrigue *et al.*, 2006; Sachdeva *et al.*, 2009).

O grupo 2 inclui fatores  $\sigma$  que, apesar da alta similaridade com os fatores  $\sigma$  primários, não são considerados essenciais para a sobrevivência bacteriana em condições normais. Os

fatores melhores caracterizados desse grupo estão envolvidos na transcrição de genes de resposta ao estresse e de genes necessários a sobrevivência bacteriana na fase estacionária de crescimento, sendo o fator  $\sigma^{38}$  codificado pelo gene *rpoS* de *E. coli* o membro mais estudado deste grupo (Loneto *et al.*, 1994; Manganelli *et al.*, 2004; Rodrigue *et al.*, 2006; Sachdeva *et al.*, 2009).

O grupo 3, por sua vez, é composto por fatores  $\sigma$  mais divergentes em relação aos fatores  $\sigma$  do primeiro grupo e correspondem a proteínas menores, já que apresentam somente as regiões conservadas 2, 3 e 4 em sua estrutura. Os fatores deste grupo apresentam funções que incluem resposta ao choque térmico, biossíntese de flagelo e esporulação (Loneto *et al.*, 1994; Manganelli *et al.*, 2004; Rodrigue *et al.*, 2006; Sachdeva *et al.*, 2009).

Por último o grupo 4, também conhecido como subfamília de fatores  $\sigma$  de função extracitoplasmática (ECF), que corresponde ao maior e mais heterogêneo dentre os quatro grupos que compõem a família do  $\sigma^{70}$ . Esse grupo engloba um grande número de fatores pequenos, uma vez que apresentam apenas as regiões conservadas 2 e 4 em sua estrutura, responsáveis pela expressão de genes cujos produtos exercem uma variedade de funções em resposta a sinais extracelulares específicos, como a presença de proteínas desnaturadas ou de moléculas tóxicas, mudanças na osmolaridade, limitação de nutrientes e os estresses oxidativos e de superfícies. Além disso, vários destes fatores estão envolvidos na regulação de componentes importantes para a virulência de bactérias patogênicas (Loneto *et al.*, 1994; Manganelli *et al.*, 2004; Rodrigue *et al.*, 2006; Sachdeva *et al.*, 2009).



**Figura 1.** Domínios conservados dos 4 grupos de fatores sigma da família  $\sigma^{70}$ . Adaptado de Rodrigue *et al.*, (2006).

Sob condições fisiológicas normais, são majoritariamente expressos os genes essenciais para a sobrevivência e o crescimento bacteriano, os quais possuem promotores que são reconhecidos por fatores  $\sigma$  pertencentes ao grupo 1 da família  $\sigma^{70}$ . Entretanto, a exposição a determinados estímulos ambientais pode alterar a transcrição gênica através de um mecanismo no qual a subunidade  $\sigma$  primária ligada ao cerne da RNA polimerase é substituída por um fator  $\sigma$  alternativo, de modo a ativar a expressão de um conjunto específico de genes envolvidos na resposta adaptativa necessária (Helmann, 2002; Kazmierczak *et al.*, 2005).

Os fatores  $\sigma$  alternativos podem ser inseridos em três classes distintas, de acordo com a função que exercem: fatores  $\sigma$  responsáveis por ativar mecanismos gerais de resposta ao estresse, os quais apresentam grande similaridade estrutural com os fatores  $\sigma$  primários; fatores  $\sigma$  associados a alterações morfológicas do microrganismo, como a formação de flagelos e esporulação; e fatores  $\sigma$  de função extracitoplasmática, os quais estão envolvidos na ativação de mecanismos de adaptação às mudanças no periplasma, na membrana da bactéria e no ambiente extracelular (Potvin *et al.*, 2008; Kazmierczak *et al.*, 2005).

Os aspectos básicos para compreensão das características e funções dos fatores  $\sigma$  foram inicialmente descritos em *E. coli*, que apresenta sete subunidades  $\sigma$ : o  $\sigma$  primário  $\sigma^{70}$  (RpoD), responsável pela ativação da transcrição da maioria dos genes essenciais ao crescimento exponencial de bactérias e seis fatores  $\sigma$  alternativos, representados por  $\sigma^{28}$  (FliA),  $\sigma^{32}$  (RpoH),  $\sigma^{38}$  (RpoS),  $\sigma^{54}$  (RpoN),  $\sigma^{24}$  (RpoE) e  $\sigma^{\text{FecI}}$  (Grigorova *et al.*, 2006; Potvin *et al.*, 2008).

Em extensa análise do genoma de *P. aeruginosa* O1, é possível observar a presença de aproximadamente 550 fatores transcricionais e 24 possíveis fatores  $\sigma$ , sendo que destes 24 fatores  $\sigma$ , 19 são considerados fatores  $\sigma$  associados à expressão de genes de função extracitoplasmática (ECF) (Potvin *et al.*, 2008).

Em *P. aeruginosa* são destacados a presença dos fatores  $\sigma^{70}$  (RpoD),  $\sigma^{32}$  (RpoH),  $\sigma^{28}$  ou FliA (RpoF),  $\sigma^{38}$  ou  $\sigma^S$  (RpoS),  $\sigma^{54}$  ou  $\sigma^N$  (RpoN); dos fatores  $\sigma$  ECF PvdS, SigX,  $\sigma^E$  ou  $\sigma^{22}$  (AlgU), além de e um conjunto composto por outros membros do grupo das ECFs, alguns estando associados ao transporte de ferro (Potvin *et al.*, 2008).

O fator  $\sigma^{70}$ , em *P. aeruginosa*, é conhecido ainda como RpoD e apresenta uma vasta homologia com o  $\sigma^{70}$  de *E. coli*, sugerindo que esses dois fatores  $\sigma$  apresentem funções similares (Potvin *et al.*, 2008; Llamas *et al.*, 2009).

A transcrição do gene *rpoD* ocorre através dos promotores  $P_C$  e  $P_{HS}$ , sendo que o primeiro controla a síntese constitutiva do mRNA tanto na fase estacionária de crescimento quanto em condições de estresse, como as observadas no evento de choque térmico. Já o promotor  $P_{HS}$  é responsável pela regulação transitória da transcrição do gene após condições de choque térmico (Aramaki & Fujita, 1999; Potvin *et al.*, 2008).

Entre os fatores  $\sigma$  de função extracitoplasmática reportados, destaca-se o fator homólogo de  $\sigma^E$  da bactéria *P. aeruginosa* (gene *algU*), envolvido na biossíntese do exopolissacarídeo alginato, considerado um dos principais fatores de virulência dessa bactéria (Potvin *et al.*, 2008).

Observa-se que a sequência de aminoácidos que compõe o fator AlgU apresenta 79% de similaridade com aquela relacionada ao fator  $\sigma^E$  de *E. coli*, responsável pelo crescimento do microrganismo em temperaturas elevadas e relacionado ao choque térmico, sugerindo funções semelhantes na expressão desse gene em *P. aeruginosa*, em resposta a condições de estresses (Potvin *et al.*, 2008). Em *P. aeruginosa*, AlgU é destacado principalmente pela sua importância no processo de conversão do fenótipo não mucóide para o mucóide em pacientes com fibrose cística, sobretudo em situações de estresse que incluem o tratamento com antibióticos, alta osmolaridade, limitações nutricionais e liberação de intermediários reativos de oxigênio a partir de leucócitos polimorfonucleares (Pulcrano *et al.*, 2012).

A síntese do alginato, responsável pela característica mucóide conferida à bactéria em infecções que acometem grande parte de pacientes portadores de fibrose cística, é um evento complexo que envolve uma série de genes, sendo o promotor *algD* e o fator anti- $\sigma$  MucA os elementos chave do processo de regulação da expressão gênica associada a este fenótipo.

Neste microorganismo, existem quatro genes (*mucABCD*) especialmente envolvidos na expressão do fenótipo mucóide, sendo que mutações no gene *mucA* são consideradas um dos principais mecanismos associados ao processo de conversão para a forma mucóide (Potvin *et al.*, 2008; Pulcrano *et al.*, 2012).

Sabe-se que o fator  $\sigma$  alternativo AlgU atua como um regulador positivo na produção de alginato e como regulador negativo no processo de motilidade associada a flagelos, em *P.*

*aeruginosa* (Tart *et al.*, 2005). Pulcrano e colaboradores (2012) observaram que mutações no gene *mucA* são responsáveis pela expressão elevada do operon e produção acentuada de alginato, influenciando a motilidade e contribuindo para a colonização e sobrevivência do microrganismo nos sítios de infecção, visto que o alginato constitui um dos principais fatores de virulência deste microrganismo.

### 3.2.1 Fator Sigma 32 (*rpoH*) em *P. aeruginosa*

O fator sigma alternativo  $\sigma^{32}$ , codificado pelo gene *rpoH*, é responsável por regular de forma positiva a expressão de genes associados ao evento de choque térmico, o qual corresponde a um mecanismo de resposta celular e homeostática frente a condições de estresses que levam a prejuízos conformacionais de proteínas (Schumann, 2007).

A resposta ao choque térmico é induzida por aumentos de temperatura, sendo comum entre os organismos. Ocorre quando células que usualmente crescem em temperaturas mais baixas são transferidas para um ambiente de alta temperatura, resultando num rápido e transitório aumento na síntese de um conjunto específico de proteínas, conhecidas como proteínas de choque térmico (HSPs- do inglês *Heat Shock Proteins*) e representadas por chaperonas e proteases, responsáveis, respectivamente, por reparar o dano potencial causado as proteínas devido à exposição ao calor e degradar proteínas desnaturadas que não foram reparadas de forma adequada (Fenton & Horwich, 2003; Rosen & Ron, 2002; Schumann, 2007).

O mecanismo de resposta ao choque térmico é amplamente estudado em procariotos. Em *E. coli*, a expressão dos genes HSPs é regulada de forma positiva pelo fator  $\sigma^{32}$  ( $\sigma^H$ ), codificado pelo gene *rpoH* e conhecido como fator sigma de choque térmico, responsável por mediar a resposta ao aumento de temperatura de 30°C para 42°C (Potvin, 2008).

Quando as células de *E. coli* são expostas a essas variações de temperatura, a RNA-polimerase associada ao fator  $\sigma^{32}$  reconhece promotores específicos de genes de choque térmico, transcrevendo-os (Narberhaus, 1999). Esses genes codificam para chaperonas moleculares que apresentam função de auxiliar outras proteínas na obtenção de sua conformação apropriada. Em *E. coli* já foram relatadas a presença de mais de 20 HSPs, incluindo as chaperonas DnaK, DnaJ, GrpE, GroEL e GroEs e a protease FtsH (Potvin, 2008).

A breve transcrição dos genes de choque térmico é controlada pela regulação da síntese, atividade e estabilidade de  $\sigma^{32}$ , através de mecanismos de retroalimentação que incorporam informações sobre a temperatura e o estado de dobramento de proteínas na célula (Arsene *et al.*, 2000; El-Samad *et al.*, 2005).

Em *P. aeruginosa*, o gene *rpoH* apresenta 61% de similaridade com o  $\sigma^H$  ( $\sigma^{32}$ ) de *E. coli*, sendo sua transcrição dependente do fator sigma de função extracitoplasmática (ECF) AlgU, cujas funções estão associadas a biossíntese do alginato e resposta ao choque térmico e estresse oxidativo (Hermann, 2002; Potvin, 2008; Rowley *et al.*, 2006). O processo de choque térmico apresenta um comportamento semelhante em *P. aeruginosa* e *E. coli*, onde há um aumento nos níveis de transcrição do gene *rpoH* frente a alterações de temperatura de 30°C para 42°C. Os níveis elevados na expressão do gene após choque térmico estão relacionados ao aumento da síntese e estabilidade da proteína, normalmente instável, codificada pelo gene *rpoH* (Kindrachuk *et al.*, 2011; Potvin *et al.*, 2008).

Observa-se que as sequências de grande parte das HSPs são altamente conservadas, apresentando funções similares em todos os organismos (Morimoto, 1998). Este grupo de proteínas é composto principalmente por chaperonas como, por exemplo, DnaK e GroEL; ou proteases dependentes de ATP, que incluem Lon, FtsH, ClpAp e ClpXP, exercendo importante papel no enovelamento, agrupamento, transporte e reparo de proteínas, tanto em condições de estresse quanto em condições normais (Schumann, 2007).

As chaperonas moleculares são proteínas responsáveis por interagir, estabilizar e auxiliar outras proteínas a adquirirem conformação correta, sendo expressas de forma acentuada após condições de estresse que incluem o evento de choque térmico, sendo, dessa forma, conhecidas como HSPs. Estas proteínas estão envolvidas em múltiplas funções celulares que incluem o dobramento de proteínas desnaturadas por estresse, montagem oligomérica, transporte de proteínas intracelulares e auxílio na degradação proteolítica (Vabulas *et al.*, 2010; Van Drie; 2011; Hartl *et al.*; 2009).

As chaperoninas correspondem a uma família bastante conservada de chaperonas moleculares expressas após calor e vários outros tipos de estresses, a fim de manter a integridade e viabilidade celular e auxiliar polipeptídeos nascentes a assumirem sua conformação tridimensional correta. Trata-se de uma estrutura de aproximadamente 800 kDa constituída por dois anéis e uma cavidade interna na qual as proteínas substratos são

totalmente encapsulas para poder adquirir novamente sua conformação correta (Peng *et al.*, 2011; Vabulas *et al.*, 2010; Yenari *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2002). Dividem-se em dois grupos com estruturas semelhantes, mas com sequências remotamente relacionadas. As chaperoninas que integram o grupo I, também designadas chaperoninas Hsp60, estão presentes em bactérias (GroEL), mitocôndrias (Hsp60) e cloroplastos (Cnp60) e atuam em parceria com as proteínas Hsp10 (GroES), que correspondem a anéis compostos por subunidades de 10 kDa e que agem como um interruptor de GroEL, controlada pela ATPase desta própria proteína. São constituídas por sete subunidades de aproximadamente 60 kDa por anel e consistem em três domínios: o domínio equatorial ATPase, responsável por formar o principal contato inter-subunidades; o domínio apical, que expõem resíduos de aminoácidos hidrofóbicos para ligação do substrato em direção ao centro do anel, e o domínio intermediário, cuja função é conectar os domínios equatorial e apical (Peng *et al.*, 2011; Vabulas *et al.*, 2010).

O grupo II encontra-se presente no reino Archaea e no citosol de células eucarióticas, sendo constituído por chaperoninas que atuam de forma independente da proteína de Hsp10, já que, embora apresentem estrutura semelhante à GroEL, possuem o domínio apical com extensão especializada da  $\alpha$ -hélice que substitui a função de GroES (Hartl & Hayer-Hartl, 2009; Peng *et al.*, 2011).

Na regulação dos níveis de  $\sigma^{32}$ , em temperaturas normais de crescimento, as chaperonas DnaK, DnaJ e GrpE são responsáveis por sequestrar este fator sigma, impedindo sua ligação ao cerne da RNA-polimerase e direcionando-o para proteólise mediada por FtsH. A elevação da temperatura causa o acúmulo de proteínas desnaturadas que se ligam às chaperonas DnaK/ DnaJ/ GrpE, resultando na liberação e estabilização do  $\sigma^{32}$  e conduzindo a uma associação deste fator com a RNA polimerase e direcionamento para promotores específicos dos genes de choque térmico (Arsene *et al.*, 2000; Yura & Nakahigashi, 1999).

Quando os níveis de chaperonas livres aumentam, há um controle de retroalimentação negativa na estabilidade e atividade de  $\sigma^{32}$ , que é novamente sequestrado, sendo inativado e degradado, resultando em um desligamento da resposta ao choque térmico e garantindo um controle na expressão de genes de choque térmico com base na quantidade de proteínas desnaturadas presentes na célula. Estudos demonstraram que a maquinaria das chaperoninas

GroES/GroEL também exerce funções na regulação da atividade e estabilidade de  $\sigma^{32}$  em *E. coli* (Guisbert *et al.*, 2004).

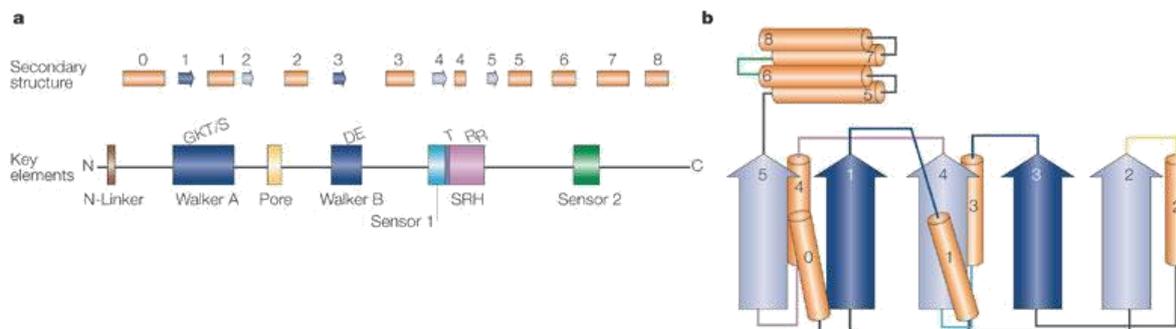
### 3.3 Proteases AAA<sup>+</sup> (ATPases Associadas à diversas Atividades celulares)

Um importante mecanismo envolvido na regulação da expressão gênica é a degradação de proteínas celulares via proteases celulares. Dentre as proteases envolvidas nesse processo, existe um grupo pertencente à família de proteínas denominadas AAA (ATPases Associadas à diversas Atividades celulares), que se destacam por atuarem como proteases e como chaperonas moleculares (Adam & Osterseizer, 2001; Langer, 2000; Baker & Sauer, 2012).

Membros pertencentes à família das proteínas AAA podem ser encontrados em todos os reinos e estão envolvidos em diferentes processos do metabolismo celular, incluindo transporte de proteínas, divisão celular, formação de peroxissomo, e principalmente, degradação de proteínas de membrana presentes nas bactérias, mitocôndrias e cloroplastos (Langer, 2000; Lupas & Martin, 2002; Wendler *et al.*, 2012).

Uma ampla gama de proteínas que apresentam o domínio AAA<sup>+</sup> e correspondem a uma subfamília do grupo das ATPases já foram cristalografadas e tiveram suas estruturas estudadas. Baseando-se nesses estudos, puderam ser definidos dois subdomínios do domínio AAA: N-terminal ( $\alpha/\beta$  Rossman) e um C-terminal ( $\alpha$ -hélices) (Figura 2). O subdomínio  $\alpha/\beta$  Rossman é caracterizado pela inserção de  $\beta_4$ , entre  $\beta_1$  e  $\beta_3$  distinguido, dessa forma, o domínio AAA de outros domínios de ligação a nucleotídeos. Além disso, a ausência de fitas adjacentes a  $\beta_2$  é característico desse subdomínio. Na sua região N-terminal encontra-se um motivo denominado de N-linker, responsável pela ligação ao anel de adenina, sendo este parte do domínio de ligação da AAA, que conecta este domínio a outros domínios não AAA.

A análise da dinâmica molecular aponta que N-linker é flexível e pode promover alterações dependentes de nucleotídeos para outras partes da proteína AAA.



**Figura 2.** Estrutura linear (A) e organização da topologia geral (B) dos domínios AAA<sup>+</sup>. Adaptado de Hanson & Whiteheart (2005).

O domínio AAA<sup>+</sup> é formado também pelos motivos altamente conservados Walker A (GxxxxGK[T/S], onde x representa qualquer aminoácido) e Walker B (hhhhDE, onde h representa aminoácidos hidrofóbicos), sendo estes domínios responsáveis, respectivamente, pela ligação e hidrólise do nucleotídeo (Rappas *et al.*, 2006).

O motivo Walker A está contido em uma volta da conformação proteica, conhecida como P-loop (Ogura & Wilkinson, 2001), sendo esta região (P-loop) responsável pela direta interação que ocorre entre um resíduo de lisina do motivo Walker A e o  $\gamma$ -fosfato do ATP (Hanson & Whiteheart 2005). No motivo Walker B (LhhhhD), o resíduo de aspartato é responsável pela interação com o magnésio e o resíduo de glutamato é responsável pela interação com a água; elementos que correspondem a fatores essenciais para a hidrólise do ATP (Hanson & Whiteheart 2005; Schumacher *et al.*, 2006; ).

As proteínas AAA<sup>+</sup> possuem ainda um domínio conservado, localizado na região C-terminal do motivo Walker B e denominado região de homologia secundária (SRH), o qual é composto por dois elementos estruturais específicos: região sensora I e dedos de arginina (Figura 3). Os resíduos de aminoácidos da região sensora I posicionam-se entre os motivos Walker A e B, interagindo com Walker B e  $\gamma$ -fosfato do ATP. Nos dedos de arginina das proteínas da família AAA<sup>+</sup>, dois resíduos de arginina podem ser encontrados e estão envolvidos na hidrólise de nucleotídeos e/ou propagação de mudanças conformacionais para a forma de hexâmero (Langer, 2000; Hanson & Whiteheart, 2005; Wendler *et al.*, 2012).

As proteínas da família AAA<sup>+</sup> formam uma estrutura hexamérica que confere características particulares de sua atividade biológica, como o posicionamento do sítio de

ligação do ATP na interface das subunidades com a holoenzima (Hanson & Whiteheart, 2005; Wendler *et al.*, 2012). De acordo com este arranjo estrutural, uma cavidade central é formada, expondo aminoácidos da região entre os motivos Walker A e B na superfície do poro, que são responsáveis pela ligação do substrato. Mutações nestes aminoácidos afetam a ligação e processamento do substrato, sem afetar a oligomerização ou a atividade de ATPase (Yamada-Inagawa *et al.*, 2003).

Na região C-terminal do subdomínio  $\alpha$ -hélices, encontra-se a região sensora II. Um resíduo de arginina deste motivo participa diretamente da interação com o  $\gamma$ -fosfato do ATP (Langer, 2000).

### 3.3.1 Protease FtsH (*filamentation temperature-sensitive*) AAA<sup>+</sup>

Bactérias Gram-negativas representam um modelo de estudos fisiológicos e funcionais de proteases AAA<sup>+</sup>. Um exemplo é a bactéria *E. coli*, que apresenta cinco proteases AAA<sup>+</sup> muito bem caracterizadas: ClpXP, ClpAP, HslUV, Lon e FtsH. Todas essas proteases apresentam funções celulares importantes, porém, dentre elas, destaca-se a proteína FtsH (*filamentation temperature-sensitive*), que tem sua importância evidenciada por ser essencial à viabilidade da bactéria (Langklotz *et al.*, 2012).

Em *E. coli*, a FtsH é representada por uma proteína integral de membrana de aproximadamente 71 kDa, composta por dois segmentos transmembrana (TM1 e TM2) em sua região N-terminal, seguido por um domínio citoplasmático (C-terminal), contendo uma cópia do módulo AAA e um motivo conservado de ligação ao Zn<sup>2+</sup> (HEXXH), responsável pelo sítio catalítico da proteólise (Tomayasu *et al.*, 1993; Langklotz *et al.*, 2012).

Várias funções tem sido atribuídas à proteína FtsH, tais como: controle da resposta ao choque térmico, atuando através da proteólise do fator  $\sigma^{32}$ ; influência no processo de infecção viral por meio da degradação das proteínas CII e CIII (ativadores transcricionais) do fago  $\lambda$ , que são de extrema importância nas etapas de estabelecimento da lisogenia; atuação como chaperona molecular, influenciando na montagem e disposição de diversas proteínas que exercem papel importante na biossíntese do lipopolissacarídeo (LPS), por meio da proteólise da enzima LpxC, responsável por catalisar o processo de síntese do lipídeo A constituinte do LPS (Langklotz *et al.*, 2012).

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Análises de Bioinformática do Gene PA0657 de *P. aeruginosa* O1**

As sequências gênicas e protéicas foram obtidas após busca no banco de dados do NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). A análise comparativa das sequências e a predição dos polipeptídios resultantes foi realizada com o auxílio do programa BioEdit 7.0.

A comparação e procura de sequências homólogas à ORF0657 foi realizada para identificação dos ortólogos dos genes que apresentam maiores graus de similariedade, com auxílio do programa computacional BLAST-P, disponível on-line no NCBI. Os resultados foram expressos na forma de tabela com valores obtidos para os genes encontrados nas diferentes bactérias Gram-negativas.

O alinhamento das sequências proteicas foi realizado através do programa computacional ClustalX, como auxiliar dentro dos programas BioEdit 7.0. Para a modelagem 3D da proteína em estudo foram utilizadas as facilidades dos programas disponíveis no ambiente Expsy (Swiss-Prot).

Para análise da região promotora da sequência gênica PA0657, foi utilizado o software BacPP (*Bacterial Promoter Prediction*), que permite a previsão e a classificação das sequências de promotores bacterianos e possibilita separar as sequências promotoras de acordo com o fator sigma por elas reconhecidas.

### **4.2 Linhagens Bacterianas e Condições de Cultivo**

No presente estudo empregou-se um conjunto de bactérias apresentadas na Tabela 1. Estas linhagens estão depositadas no banco de microrganismos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Microbiologia Aplicada do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul.

**Tabela1.** Linhagens bacterianas, características fenotípicas e referência ou origem.

<b>Linhagem</b>	<b>Característica</b>	<b>Referência ou Origem</b>
<i>E. coli</i> JM109	<i>recA 1, endA 1, gyrA 96, thi, hsdR 17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>), supE44,relA 1, λ<sup>-</sup>, Δ(lac-proAB), [F<sup>+</sup>,traD 36, proAB, lacI<sup>q</sup> ZΔM15]</i>	Yanisch-Perron, C. <i>et al.</i> , 1985.
<i>E. coli</i> DH5α	F <sup>+</sup> endA1glnV44 thi-1 <i>recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17 (r<sub>k</sub>-m<sub>k</sub><sup>+</sup>), λ<sup>-</sup> F<sup>+</sup> mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i>	Invitrogen
<i>P. aeruginosa</i> O1	Linhagem selvagem isolada de uma ferida cirúrgica em 1954.	(Holloway <i>et al.</i> , 1979)
<i>P. aeruginosa</i> 07	Linhagem selvagem	Isolada de ambiente aquático.
<i>P. aeruginosa</i> 169	Linhagem com segmento PA0657 rompido	Isolada de paciente com fibrose cística.

As amostras bacterianas utilizadas neste trabalho foram mantidas em meio Luria Bertani (LB) constituído por triptona 10 g/L; NaCl 10 g/L; extrato de levedura 5 g/L e 2% de ágar quando meio sólido (Sambrook *et al.*, 2001). Estes microrganismos foram mantidos em temperatura ambiente e repicados a cada 60 dias para a renovação e manutenção deste banco. O meio SOC formado por triptona 20 g/L; extrato de levedura 5 g/L; NaCl 0,5 g/L; KCl 2,5 mM; com pH ajustado para 7,0 e adição de MgCl<sub>2</sub> a uma concentração final de 7 mM e glicose a uma concentração de 20 mM (Sambrook *et al.*, 2001), foi utilizado em algumas manipulações. Além destes meios de cultura, também foram utilizados os meios 2YT (triptona 16 g/l, NaCl 5 g/L, extrato de levedura 10 g/L, 2% ágar quando meio sólido e 0,67% para meio semi-sólido), e o meio mínimo M9 (Na<sub>2</sub>HPO 12,8 g/l, KH<sub>2</sub>PO 3 g/L, NaCl 0,5 g/L, NH<sub>4</sub>Cl 1 g/L e glicose 4 g/L).

O meio Cetrimida constituído por digestão enzimática de gelatina 20 g/L; MgCl<sub>2</sub> 1,4 g/L; KCl 10 g/L; cetrimida (brometo de cetiltrimetilamônio) 0,3 g/L; agar 13,6 g/L; glicerol 10 ml/l; pH 7,2, foi utilizado como meio confirmatório para crescimento das linhagens de *P. aeruginosa*.

### 4.3 Procedimentos Moleculares Relacionados à Amplificação e Clonagem do Gene PA0657 de *P. aeruginosa*

#### 4.3.1 Extração de DNA genômico de *P. aeruginosa*

O DNA genômico foi extraído utilizando kit de extração Qiagen-*DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen®), de acordo com as instruções do fabricante, com pequenas modificações. Brevemente, uma alíquota de 2,0 mL da cultura de *P. aeruginosa*, crescida *overnight* em meio LB, foi centrifugada à temperatura ambiente por quatro minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi removido e o *pellet* foi ressuscitado em 180 µL de tampão ATL acrescido de 25 µL de solução de proteinase K sendo a suspensão incubada em banho-maria modelo CT- 248 (Cientec), sob a temperatura de 56°C, por 60 minutos, até completa lise celular. Posteriormente 4 µL de solução de RNase A (100 mg/mL) (Invitrogen®) foram adicionados a cada tubo e estes foram incubados por dois minutos à temperatura ambiente. A seguir, 200 µL de tampão AL foram adicionados e misturados por *vortex* e, em seguida, uma alíquota de 200 µL de etanol 96% foi acrescida à suspensão. O lisado foi aplicado sobre a membrana da coluna Qiagen e centrifugado, em centrífuga modelo 5804R (Eppendorf), a 13.000 rpm por 30 segundos. A coluna foi lavada com tampões AW1 seguido do AW2 e centrifugada durante 30 segundos a 13.000 rpm após a primeira lavagem e durante 3 minutos, a 13.000 rpm, após a segunda lavagem. Então, a coluna foi inserida em um tubo de 1,5 mL e foram adicionados 100 µL de tampão AE diretamente sobre a membrana; a suspensão foi incubada à temperatura ambiente durante um minuto e, após, centrifugada durante 45 segundos, a 13.000 rpm, para eluição do DNA.

Para avaliar integridade e a qualidade do DNA extraído foi realizada eletroforese horizontal em gel de agarose 0,8%, corado com GelRed, utilizando tampão 1x TBE (50 mM Tris; 50 mM ácido bórico; 2,5mM EDTA; pH 8,3). A quantificação do DNA extraído foi feita através de avaliação espectrofotométrica em espectrofotômetro Libra S11/S12 (Biochrom®), em comprimento de onda de 260nm e 280nm, de acordo com a técnica de Sambrook e colaboradores (2001). O DNA extraído foi armazenado a -20 °C até o momento de sua utilização.

### 4.3.2 Amplificação do Gene PA0657 de *P. aeruginosa*

O DNA genômico extraído foi utilizado como molde para amplificar a ORF 0657 e outros fragmentos correspondentes a esta região. As sequências dos *primers* e seus respectivos fragmentos amplificados podem ser observados na Tabela 2. A sequência correspondente ao genoma de *P. aeruginosa* e sua anotação completa pode ser observada no site [www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com).

A reação de amplificação do gene PA0657 para as clonagens nos vetores pKnockout G e PinPoint™ Xa-1 (Promega ®) foi realizada em um volume final de 25µL, constituídos de 2µM de cada *primer*, 8 mM de DNTPs (Invitrogen®); 0,75U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®); 2 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen®); 2,5 µL tampão PCR [20 mM Tris-HCl pH8,0; 0,1 mM EDTA; 1 mM DTT; 50% (v/v) glicerol] (Invitrogen®) e DMSO 5%.

**Tabela 2.** Sequências correspondentes a cada *primer*, tamanho do amplicon e finalidade de sua utilização.

<i>Primer</i>	Seqüência do <i>Primer</i> (5'-3')	Amplicon	Função
p10f p11r *	AGCAGGAAACGGTTCGATG GTCAAGCTGATCCTGATCGAGT	627pb	Confirmar clonagem em vetor pKnockout G.
p20f p21r	ATCTTGCAGAACAGACAGTCCAT CTGAGCTTCGAGTACGACACC	803pb	Amplificar fragmento de 803pb para clonagem no vetor pKnockoutG.
p30f * p31r	GCAGCAGGTGGTGAAGAAC GAATTGTTCTTCGTCGACCTG	658pb	Confirmar clonagem em vetor pKnockout G.
p40f p41r	GTACCCTGCTGACCTGGATG CTTTCAGTTCTTCCC GCAAG	771pb	Confirmar clonagem em vetor pKnockout G.
pATPasef pPinr	CGACATTCGCGACCTCGGCC GGTTGACCGGCGGATCCTCGC	1510pb	Amplificar fragmento de 1510pb para clonagem em vetor PinPoint Xa-1.
Vic1f Vic2r	GGAAAGGCCATCAAGTTGGTATC AGATCGACCTGATCAACCAGG	600pb	Identificação e confirmação da espécie bacteriana.

\* *Primers* utilizados para a realização do sequenciamento visando confirmar o rompimento do gene em estudo. Regiões sublinhadas nos *primers* pATPasef e pPinr, correspondem aos sítios de clivagem das enzimas *NruI* e *BamHI*, respectivamente.

As amplificações foram realizadas em termociclador Veriti® 96 Well-Thermal Cycler (Applied Biosystems™), programado para 4 minutos a 94 °C, seguido por 35 ciclos de 15 segundos a 94 °C para desnaturação das fitas de DNA, 45 segundos a 55 °C para anelamento de cada um dos *primers*, 60 segundos a 72 °C para extensão do DNA correspondente aos amplicons a serem clonados no vetor pKnockoutG, ou 90 segundos a 72 °C para extensão do DNA correspondente aos amplicons a serem clonados no vetor PinPoint™ Xa-1. Ao final dos 35 ciclos, foi realizada uma extensão suplementar por 10 minutos a 72 °C e as amostras mantidas a 4 °C por 15 minutos.

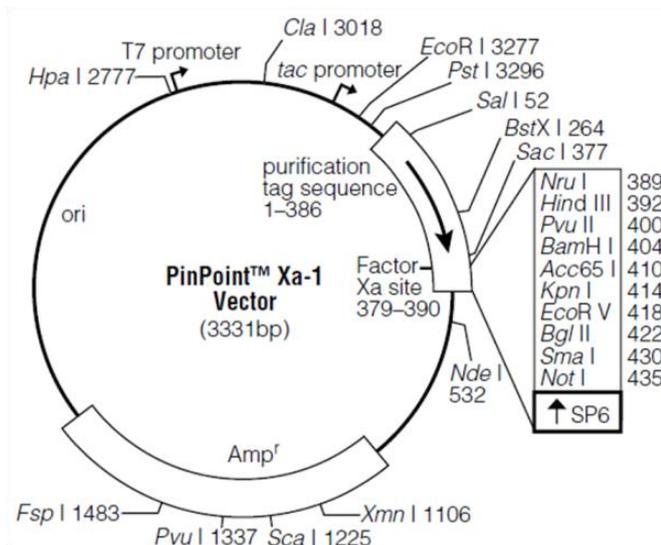
### **4.3.3 Separação e Visualização dos Segmentos Amplificados**

Para a constatação da obtenção dos fragmentos com massas moleculares corretas correspondentes à amplificações relacionadas ao gene PA0657, os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese (3V/cm), em gel horizontal de agarose 1,5% em tampão TBE (89 mM Tris, 89 mM de ácido bórico e 8 mM de EDTA), acrescido de solução de GelRed™. Como tampão de corrida utilizou-se o TBE 1X. Os produtos amplificados foram visualizados sob transiluminador UV (Uvitec, Modelo SXT 40M). O padrão de massa molecular DNA de fago λ clivado com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII* foi incluído nos géis para a determinação da massa molecular das bandas obtidas.

### **4.3.4 Construção dos Vetores pJL01 e pJL02**

#### **4.3.4.1 Construção do Vetor pJL01**

Com a finalidade de obter uma proteína de fusão recombinante, o fragmento de DNA correspondente a amplificação por reação de polimerase em cadeia (PCR) da região codificadora do gene de PA0657 de *P. aeruginosa* foi clonado no vetor PinPoint™ Xa-1 (Figura 3). Os *primers* utilizados para esta amplificação apresentavam em sua sequência sítios para as enzimas de restrição *NruI* e *BamHI*, possibilitando uma clonagem sítio dirigida.



**Figura 3.** Representação esquemática do plasmídeo PinPoint™ Xa-1.

Utilizando este vetor, é possível expressar uma proteína de fusão onde a fração amino-terminal da proteína recombinante gera uma cauda possível de ser biotinilada, e nesta fração reside a proteína de interesse (PA0657).

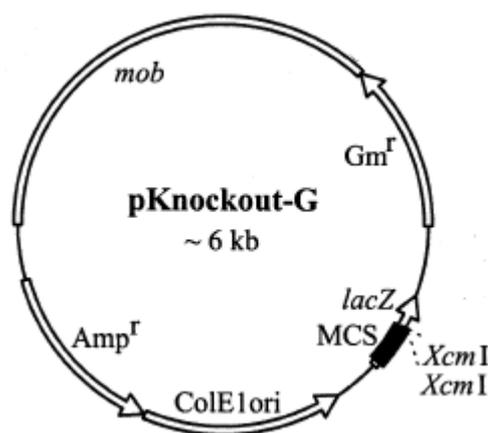
Para o procedimento de clonagem do fragmento correspondente ao gene PA0657 no vetor PinPoint™ Xa-1, 0,5µg a 1,0µg do vetor foram submetidos à clivagem com 5U das enzimas de restrição *Nru*I e *Bam*HI. O fragmento obtido através de amplificação via PCR foi, igualmente submetido à clivagem com estas mesmas enzimas de restrição. Para a retirada das enzimas de restrição, o fragmento de DNA foi separado em gel de agarose 0,8%. A porção de agarose contendo o fragmento foi recortada do gel e adicionada de 250 µL de “*Gel Solubilizer*” (NaCl 6 M, Tris-HCl 50 mM pH 8,0, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 0,05% e CDTA 10 mM) e incubado a 64<sup>0</sup>C por 10 minutos. Foram adicionados 5 µL de resina (Sephaglass BP® 20% p/v suspensa em: NaCl 6 M; Tris-HCl 50 mM pH 8,0; Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 0,05% e CDTA 10 mM). A solução foi homogeneizada, incubada por 5 minutos a temperatura ambiente, centrifugada a 14.000rpm por 10 segundos e o sobrenadante foi desprezado. Foram adicionados 40 µL de “*Wash Buffer*” (Tris-HCl 20 mM pH8,0; CDTA 1 mM; NaCl 0,1 mM e etanol 75%) ao *pellet* e homogeneizado. A suspensão foi centrifugada a 14.000 rpm por 10 segundos e o sobrenadante desprezado. Este passo foi repetido por duas vezes. O precipitado da última lavagem foi secado por 5 minutos, e após foram adicionados 20 µL do tampão de eluição

(Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM). O fragmento purificado foi então submetido ao processo de ligação.

A reação de ligação foi realizada em um volume de 20  $\mu$ L. Foram utilizados 4  $\mu$ L de tampão de ligase 5x (Tris-HCl 0,25 M pH 7,6; MgCl<sub>2</sub> 50 mM; DTT 5 mM; PEG-8.000 25%), 1  $\mu$ L de T4 DNA ligase 1 U/ $\mu$ L (Invitrogen®), e 0,1 a 0,3  $\mu$ g de vetor. O fragmento a ser ligado ao vetor foi adicionado a uma concentração molar cinco vezes maior que a do vetor. A reação foi incubada a 16 °C *overnight*. Alíquotas desta mistura foram utilizadas posteriormente para os procedimentos de transformação por eletroporação.

#### 4.3.4.2 Construção do vetor pJL02

Com a finalidade de obter um plasmídeo recombinante capaz de realizar a ruptura do segmento gênico de *P. aeruginosa* PA0657, um fragmento correspondente a parte deste gene foi clonado em vetor pKnockout-G (Figura 5). Este vetor não apresenta origem de replicação em *P. aeruginosa*, sendo considerado um “vetor suicida” satisfatório. Os *primers* utilizados para a amplificação do fragmento do gene PA0657 estão descritos na Tabela 2. O novo vetor construído foi denominado pJL02.



**Figura 4.** Representação esquemática do plasmídeo pKnockout G ( Windgassen *et al.*, 2000).

Para a clonagem envolvendo parte do gene PA0657 no vetor pKnockout G, 0,5 µg a 1,0 µg do vetor foram submetidos à clivagem com 5 U da enzima *XcmI*. Neste caso específico, um procedimento de desfosforilação foi realizado. Para tanto, uma alíquota do vetor pknockout G linearizado foi submetido ao tratamento com 1 µL de fosfatase alcalina (CIP- *Calf Intestinal Phosphatase*) (Biolabs®), seguindo as recomendações do fabricante. Após o tratamento uma extração com fenol foi realizada e o vetor desfosforilado foi então precipitado empregando acetato de sódio/ etanol e ressuspendido em água deionizada. A reação de ligação foi realizada em um volume de 20 µL. Para o procedimento de ligação, foram utilizados 4 µL de tampão de ligase 5x (Tris-HCl 0,25 M pH7,6; MgCl<sub>2</sub> 50 mM; DTT 5 mM; PEG-8.000 25%), 1 µL de T4 DNA ligase 1 U/µL (Invitrogen®), e 0,1 a 0,3 µg de vetor pKnockout G. O fragmento a ser ligado ao vetor foi adicionado a uma concentração molar cinco vezes maior que a do vetor. A reação foi incubada a 16 °C por 18 horas. Alíquotas desta mistura foram utilizadas posteriormente para os procedimentos de transformação por choque térmico.

#### **4.3.4.3 Preparação de células de *E. coli* competentes com cloreto de cálcio e transformação por choque térmico**

A obtenção de células competentes para transformação empregando CaCl<sub>2</sub> foi realizada a partir de uma cultura de *E.coli* DH5α, cultivada em meio LB por 16 a 18 horas a 37 °C, sob agitação horizontal a 200 rpm. Posterior a este período de incubação, 1 mL foi inoculado em 100 ml de meio LB e incubado a 37°C, com agitação constante até atingir uma densidade óptica (A<sub>600nm</sub>) de 0,3. A cultura foi centrifugada a 3.200 x g, por dez minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em 25 mL de solução CaCl<sub>2</sub> 100 mM a 4° C e incubadas no gelo por vinte minutos. Uma nova centrifugação a 3.200 x g por dez minutos, a 4° C, foi realizada e as células foram novamente ressuspendidas em 5 ml de solução CaCl<sub>2</sub> 100 mM gelada e incubadas, no gelo, por uma hora. Posteriormente, foi realizada uma centrifugação nas mesmas condições anteriores e o sobrenadante foi descartado. Finalmente, as células foram ressuspendidas em 5 mL de solução CaCl<sub>2</sub> 100 mM, glicerol 15%, fracionadas em alíquotas de 200 µl e mantidas a -80 °C até o momento de sua utilização.

Para a transformação, uma alíquota de 2 µL de DNA plasmidial (pJL02) foi misturada com células competentes de *E. coli* DH5α e a mistura foi incubada no gelo por trinta minutos. Posteriormente as células foram mantidas a 42 °C durante um minuto, seguidas por incubação no gelo por 2 minutos. Após o choque térmico, 1 mL de meio SOC foi acrescentado às suspensões, com posterior incubação a 37 °C, por uma hora. As células foram centrifugadas em microcentrífuga, a 13.000 x g por um minuto, ressuspensas em 300 µL de meio SOC, semeadas em meio LB suplementado com ágar (2%), contendo ampicilina a uma concentração de 100 µg/mL. As placas contendo os transformantes foram incubadas por dezesseis horas, a 37 °C, e as colônias que apresentaram crescimento foram selecionadas.

#### **4.3.4.4 Preparação de células de *E. coli* eletrocompetentes e transformação por eletroporação**

Em 500 mL de meio LB, foram inoculados 5 mL de uma pré-cultura de *E. coli* JM109 crescidas a 37 °C, por 16 a 18h em meio LB. As células foram crescidas com agitação de 300 rpm até que a cultura atingisse uma densidade óptica ( $A_{600nm}$ ) de 0,5 a 0,7 e incubadas no gelo por 15 a 30 minutos. A cultura gelada foi, então, centrifugada por vinte minutos a 3.200 x g, em centrífuga refrigerada modelo 5804 R (Eppendorf), a 4°C. O sobrenadante foi totalmente retirado, e as células, ressuspensas em 300 mL de glicerol 10% estéril a 4 °C. A suspensão foi centrifugada como anteriormente e o precipitado foi ressuspensado em 150 mL de glicerol 10% a 4 °C. Procedeu-se a nova centrifugação, o sobrenadante foi novamente descartado e as células foram ressuspensas em 20 mL de glicerol 10%. O mesmo passo de centrifugação foi realizado novamente para coletar as células, as quais foram então ressuspensas em um volume final de 1 a 2 mL de glicerol 10% e mantidas a 4 °C. As células foram fracionadas em alíquotas de 40 µL e congeladas a -80 °C para posterior utilização.

Para a transformação, alíquotas de 40 µL de *E. coli* JM109 foram descongeladas sob refrigeração e adicionado 3 µL de DNA plasmidial (pJL01), incubando-se no gelo por um minuto. As constantes elétricas utilizadas para a eletroporação foram: capacitância, 25 µF; resistência, 200 mW e tensão, 2,5 kV (uma vez que foram utilizadas cubetas de 0,2 cm). A suspensão de células foi transferida para o fundo de uma cubeta gelada e colocada na câmara do eletroporador Gene Pulser XCell (Bio-Rad Laboratories, Inc.), sendo o pulso elétrico

gerado. Após o pulso, a cubeta foi imediatamente retirada da câmara e as células foram coletadas com 1 mL de meio SOC. A suspensão foi transferida para um tubo de ensaio e incubada a 37 °C, por uma hora. Após esse tempo, as culturas foram transferidas para tubos de microcentrífuga e as células foram então centrifugadas a 13.000 x g por três minutos em microcentrífuga modelo Mikro 120 (Hettich Zentrifugen), ressuspendidas em 300 µL de meio SOC e semeadas em meio LB contendo ampicilina a uma concentração de 100 µg/mL. As placas contendo os transformantes foram incubadas por dezesseis horas, a 37 °C, e as colônias que apresentaram crescimento foram selecionadas.

#### **4.3.4.5 Confirmação da obtenção dos plasmídeos recombinantes**

Para verificar a obtenção dos plasmídeos recombinante pJL01 e pJL02, as células bacterianas foram submetidas a extração de DNA plasmidial utilizando o método de lise alcalina. Para a realização deste procedimento uma colônia isolada da bactéria transformada com o plasmídeo de interesse, foi inoculada em 2 mL de meio LB, acrescido de 100 µg/mL de ampicilina. Essas bactérias foram crescidas a 37 °C, com agitação, durante dezesseis horas. Após, um volume de 1,5 mL das culturas foi transferido para tubos de microcentrífuga e centrifugado a 12.000 x g, por um minuto. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspendidas em 200 µL de tampão GTE e 300 µL de solução de lise (NaOH 200 mM, SDS 1%); a suspensão foi misturada através de inversão e armazenada no gelo durante cinco minutos. Em seguida, foram adicionados 300 µL de acetato de potássio (3M, pH 4,8), misturando-se, novamente, por inversão. O tubo foi incubado no gelo por quinze minutos e centrifugado durante dez minutos, a 12.000 x g, obtendo-se o sobrenadante contendo o DNA que foi transferido para novo tubo, ao qual foram adicionado 2 µL de RNase A (20 µg/mL), sendo incubado a 37 °C, em bloco térmico modelo Lac DB-100, por vinte minutos. Posteriormente, foi adicionado um volume de isopropanol 100%, sendo realizada nova centrifugação a 12.000 x g, durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e procedeu-se com uma lavagem do *pellet* de DNA plasmidial, adicionando-se 500 µL de etanol 70%. O precipitado foi seco à temperatura ambiente por 15 minutos e iniciou-se o processo de purificação de DNA.

A fim de dissolver o *pellet*, foram adicionados 32  $\mu\text{L}$  de água deionizada Milli-Q e, logo após, visando a precipitação do DNA plasmidial, foram acrescentados 8  $\mu\text{L}$  de NaCl ( 4 M ) e 40  $\mu\text{L}$  de solução 13% PEG8000. Após homogeneização, a amostra foi armazenada no gelo por vinte minutos e centrifugada a 12.000 x g, durante 15 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e procedeu-se com uma lavagem do *pellet*, adicionando-se 500  $\mu\text{L}$  de etanol 70%.

Nas mesmas condições, foi realizada nova centrifugação e o sobrenadante foi descartado. O DNA foi seco em temperatura ambiente e ressuspendido em um volume de 20 a 50  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O deionizada e armazenado a -20 °C.

Após a extração do DNA plasmidial, estas foram submetidas a análises confirmatórias da inserção. Para isso os vetores foram clivados com enzimas de restrição específicas e seu perfil eletroforético foi avaliado. PCR empregando *primers* de interesse também foram realizadas e avaliadas mediante eletroforese. Além disso, os vetores recombinantes (pJL01 e pJL02) foram submetidos a sequenciamento de DNA, de modo a confirmar se a sequência amplificada por PCR corresponde ao fragmento esperado, além de certificar se o fragmento de DNA foi inserido de forma correta no vetor. O sequenciamento foi realizado no Laboratório de Identificação Genética (LIG) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (RS) utilizando *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*. Os produtos gerados foram submetidos à eletroforese capilar em Analisador Genético *Applied Biosystems* Modelo 3130XL, sendo que as sequências foram avaliadas por meio do *Software BioEdit Sequence Alignment Editor*.

#### **4.4 Procedimentos Relacionados à Purificação e Expressão da Proteína Recombinante em *E. coli***

##### **4.4.1 Expressão e purificação da proteína recombinante em *E. coli***

Uma colônia resultante da transformação com o vetor pJL01 foi crescida em 3 mL de meio LB líquido acrescido de 50  $\mu\text{g/mL}$  de ampicilina, por 16 horas a 37 °C sob 150 rpm de agitação.

Esta cultura foi inoculada em um novo cultivo de 50 mL de meio LB contendo ampicilina (50 ug/mL) e biotina (0,05 mM), a 37 °C sob agitação de 150 rpm, até atingir uma densidade óptica de aproximadamente 0.6 ( $A_{600nm}$ ). Após atingir a DO desejada, foi adicionado IPTG (isopropil-b-D-tiogalactosídeo) a uma concentração final de 3 mM, sendo a indução da expressão da proteína realizada por quatro horas, a 37 °C sob agitação de 150 rpm.

Posteriormente, os cultivos foram centrifugados durante 10 minutos, a 11.000 rpm, a 4 °C; o precipitado foi ressuscitado em solução salina e novamente centrifugado nas mesmas condições. A seguir, as células foram lisadas em duas etapas: o precipitado bacteriano foi ressuscitado em 1,5 mL de tampão de lise Tris-HCl, constituído de 50 mM de Tris base, 10% glicerol e 1% de Triton-X 100, pH 8,0, sendo acrescido à solução 100 µg de lisozima para a digestão da parede celular bacteriana. A reação foi incubada no gelo durante 30 minutos.

A suspensão celular foi submetida à lise física utilizando-se o sonicador Sonic 500 Dismembrator (Fisher Scientific). O processo de sonicação foi realizado empregando-se 10 ciclos de 15 segundos, com intervalos de 15 segundos. A seguir, foi adicionado 100 µg de RNase (Invitrogen®) sobre o lisado, que foi mantido no gelo por 30 minutos. A amostra foi, então, centrifugada por 15 minutos, 10.000 rpm, a 4 °C, visando a separação do *pellet* e do sobrenadante, para posterior purificação.

Para análise da expressão, ambas as frações, sobrenadante e *pellet*, foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, conforme descrito na seção 4.3.3.

Após a avaliação da expressão da proteína recombinante, iniciou-se o processo de purificação do *pellet* e do sobrenadante, de formas separadas.

Procedeu-se com o protocolo de purificação nativa onde, em um volume de 1,5 mL de sobrenadante de cultura bacteriana lisada, foram acrescidos 300 µL de resina SoftLink™ Soft Release Avidin Resin (Promega®). A reação de ligação da proteína recombinante à resina de avidina ocorreu durante 4 horas à temperatura ambiente.

Posteriormente, a suspensão foi submetida à centrifugação a 500 x g durante 5 minutos; o sobrenadante foi descartado restando apenas a resina. Em seguida, duas lavagens com 3 mL de solução de lise, foram realizadas mediante centrifugação a 500 x g durante 5 minutos, a fim de remover o máximo possível de proteínas não ligadas à resina.

Após as lavagens, a resina foi ressuspensa em tampão de eluição contendo 600 µL de tampão Hepes (0,5 M) pH 7,0 e biotina (5 mM), permanecendo em agitação por 16 horas. Novamente a mistura foi centrifugada a 4 °C, durante 5 minutos a 500 x g para precipitação da resina, sendo o sobrenadante retirado e estocado em solução 1:1 de 50% de glicerol para análise através de SDS-PAGE.

Em seguida, foi utilizado o protocolo para purificação da proteína retida em corpúsculos de inclusão (*pellet*). Este protocolo iniciou-se com o tratamento do *pellet* através da adição de 1,5 mL de uma solução contendo trealose (1 M) e imidazol (50 mM), pH 8,0. O *pellet* foi submetido a novo processo de sonicação, empregando-se três ciclos de 10 segundos, com intervalos de 10 segundos. Após, aplicou-se ao *pellet* os mesmos procedimentos de purificação destinados ao sobrenadante, descritos anteriormente.

Após a purificação, as amostras resultantes foram reunidas em um volume final de 2,4 mL, sendo este concentrado em um tubo tipo Centricon com 30 kDa de MWCO (*molecular weight cut-off*) de poro. A seguir foi realizada uma lavagem utilizando 4 mL de tampão Hepes (20 mM). A amostra final obtida foi concentrada em 120 µL de tampão Hepes (20 mM) e alíquotas de 30 µL da proteína foram armazenadas a -20 °C para posterior utilização.

As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (1976) empregando kit (Bio-Rad®) e analisadas por SDS-PAGE 10%, coradas com azul de Coomassie.

Com a finalidade de confirmar a purificação e a incorporação de biotina da proteína recombinante foi realizado Western-Blot. O mesmo foi revelado utilizando estreptavidina conjugada com HRP (*horseradish peroxidase*) (Invitrogen®), conforme protocolo do fabricante.

#### **4.4.2 Quantificação de Proteína Total por Coomassie Azul Brillante**

A amostra de proteína foi diluída em água para um volume final de 20 µL e, ao extrato diluído, foi adicionado 200 µL de solução de Coomassie azul brilhante: 10 mg Coomassie Brilliant Blue G (Sigma, B-0770) foram dissolvidos em 5 ml etanol 95%. Adicionou-se 10 mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> e o volume foi completado para 100 ml com água deionizada. A solução foi filtrada em papel de filtro grosso (250gr) e guardada a 4 °C em frasco escuro.

Após a adição de Coomassie Azul brilhante, a absorvância a 620 nm foi determinada por espectrofotometria e a concentração da proteína foi definida contra uma curva padrão de 1 a 10 µg de BSA. Este método corresponde a uma modificação de Bradford, 1976.

#### **4.4.3 Avaliação da Proteína Recombinante por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Os extratos proteicos e as proteínas purificadas foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, preparado de acordo com protocolo descrito por Sambrook e colaboradores (2001), a 30 mA, em uma temperatura de 4 °C, utilizando o sistema Mini-PROTEAN® (Bio-Rad).

As amostras foram diluídas em tampão de aplicação [Tris 100mM pH 6,8; glicerol 20% (v/v); azul de bromofenol 0,2% (p/v); SDS 4%; β-mercaptoetanol 200 mM] e aplicadas no gel vertical já submerso no tampão de corrida [Tris-HCl 50 mM; glicina; 150 mM e SDS 0,1% (p/v)].

Após o término da corrida, o gel foi retirado do sistema e corado com solução de Coomassie [etanol 40% (v/v) e Coomassie R-250 a 0,25% (p/v)] por 16 horas. Após, o gel foi descorado em solução etanol 40% (v/v) e ácido acético 10% (v/v) até percepção visível das bandas.

#### **4.4.4 Avaliação da Proteína Recombinante através de Western-Blot**

Após separação das proteínas em SDS-PAGE as mesmas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond-C Extra Amersham) por 2 horas em transferidor (Mini-PROTEAN®) a 1 Ampère em tampão Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM, metanol 20% (Towbin e cols., 1979). A membrana foi bloqueada com leite desnatado Molico 10% por 30 minutos, lavado com água bi-destilada diversas vezes, e incubada com Streptavidina-Peroxidase (Invitrogen), em diluição 1:2000 em TBS-Tween por 1 hora com agitação. A membrana foi lavada com TBS-Tween e em seguida lavada extensivamente com água para retirar todo detergente.

Para a detecção por quimioluminescência seguiu-se com duas lavagens da membrana por 5 minutos em tampão carbonato de sódio 15 mM, bicarbonato de sódio 35 mM, e incubação com uma mistura de iguais quantidades da solução de detecção 1 e solução de detecção 2 (ECL<sup>TM</sup>, Western blotting detection reagents - Amersham Life Science) por 1 minuto. O excesso de solução de detecção foi retirado e a membrana colocada dentro de um filme de transparência dobrado. A membrana foi exposta a um filme de raio-X por até 5 minutos e este último revelado.

#### **4.4.5 Avaliação da Atividade Enzimática (ATPase) da Proteína Recombinante Purificada PA0657**

As condições ótimas para a hidrólise de trifosfato de adenosina (ATP) foram estabelecidas para a proteína recombinante purificada: 1 µg da proteína purificada foi adicionada a um tampão de reação (KCl 5 mM, NaCl 120 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, ZnCl<sub>2</sub> 5 mM, Glicose 10 mM, Hepes 20 mM, para volume final de 0,2 mL em pH 7,4) a 37 °C, durante os tempos de 0, 120 e 240 minutos, sendo a incubação iniciada pela adição do nucleotídeo (ATP) em uma concentração final de 1 mM. A reação foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético 10% (p/v) refrigerado. As amostras foram mantidas no gelo por 10 minutos e, posteriormente, foi realizada a determinação do fosfato inorgânico (Pi) (Chan *et al.*, 1986). A atividade específica foi expressa como nmol de Pi liberado. min<sup>-1</sup>. mg de proteína<sup>-1</sup>. O controle de hidrólise enzimática para as reações foi obtido utilizando a enzima apirase de batata (Sigma<sup>®</sup>).

#### **4.5 Procedimentos relacionados à avaliação da expressão da proteína PA0657 e sua influência na modulação de genes de resposta ao choque térmico**

Para a obtenção de mutantes de *P. aeruginosa* O1 que tivessem o gene PA0657 inativado, com o objetivo de comparar o fenótipo e comportamento do mutante com a linhagem selvagem durante situação de estresse celular, foi utilizada a técnica de substituição do gene por recombinação homóloga, onde o gene de interesse é previamente modificado pela inserção de um cassete contendo o gene de resistência à gentamicina. Para isso, linhagens de

*P.aeruginosa* O1 eletrocompetentes foram submetidas à transformação por eletroporação com o plasmídeo recombinante pJL02.

#### **4.5.1 Preparação de células de *P. aeruginosa* O1 eletrocompetentes e transformação por eletroporação**

Após os procedimentos de confirmação das clonagens, o vetor pJL02 foi transferido para a linhagem selvagem de *P. aeruginosa* PAO1. Para isto, uma colônia isolada de *P. aeruginosa* O1 foi inoculada em 25 mL de meio LB, e crescida a 37 °C *overnight*, em agitação constante de 300 rpm. A partir dessa pré-cultura, 10 mL foram inoculados em 500 mL de LB e crescidos nas mesmas condições descritas anteriormente, até que a cultura atingisse uma densidade óptica de 0,5  $A_{600nm}$ . Após, a cultura foi incubada no gelo por 10 minutos e, então, centrifugada por 10 minutos a 2.300 x g, em centrífuga refrigerada modelo 5804 R (Eppendorf), a 4 °C.

O sobrenadante foi totalmente retirado, e as células, ressuspensas em 250 mL de tampão SMEB (1 mM HEPES, pH 7,0; 0,1 mM MgCl<sub>2</sub>, 300 mM sacarose), a 4 °C. O mesmo passo de centrifugação foi realizado novamente para coletar as células, as quais foram então ressuspensas em um volume de 125 mL de tampão SMEB e centrifugadas novamente, nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 12 mL de tampão SMEB. Procedeu-se uma nova centrifugação por 10 minutos a 2.300 x g, a 4 °C; o sobrenadante foi removido e as células finalmente ressuspensas em um volume final de 2,0 mL de tampão SMEB, sendo mantidas no gelo até o momento da eletroporação.

Para a transformação, 0,05 a 0,5 µg do vetor pJL02 foram adicionados a alíquotas contendo 100 µl de células de *P. aeruginosa* O1 eletrocompetentes. As mesmas foram incubadas no gelo por 10 minutos e submetidas à eletroporação em eletroporador Gene Pulser XCell (Bio-Rad Laboratories, Inc.). As constantes elétricas utilizadas para a eletroporação foram: capacitância, 25 µF; resistência, 200 mW e tensão, 2,5 kV (uma vez que foram utilizadas cubetas de 0,2 cm). A suspensão de células foi transferida para o fundo de uma cubeta gelada e colocada na câmara do eletroporador, sendo gerado o pulso elétrico. Após o pulso, a cubeta foi imediatamente retirada da câmara, e as células foram coletadas com 1 mL

de meio SOC. A suspensão foi transferida para um tubo de ensaio e incubada a 37 °C, por uma hora, com agitação de 300 rpm.

#### **4.5.2 Recombinação homóloga e exclusão do vetor**

Após o processo de transformação, as culturas foram transferidas para tubos de microcentrífuga, e as células foram então centrifugadas a 13.000 x g por três minutos, ressuspendidas em 300 µL de meio SOC e semeadas em meio LB contendo gentamicina a uma concentração de 50 µg/mL e incubadas por 16 horas a 37 °C, a fim de induzir a recombinação homóloga através da integração do vetor ao cromossomo bacteriano.

Como o vetor pJL02 não apresenta origem de replicação em *P. aeruginosa* foram realizadas, após a primeira seleção com gentamicina, dez passagens sucessivas em meio LB sem antibiótico, visando a excisão do plasmídeo. A seguir, as linhagens foram novamente selecionadas para a resistência à gentamicina, com o objetivo de verificar as colônias que retiveram o plasmídeo.

A verificação da integração do plasmídeo ao DNA cromossômico foi realizada por meio de PCR utilizando conjuntos de *primers* específicos (Tabela 2) que anelam em regiões distintas e próximas ao gene PA0657 confirmando, dessa forma, a ruptura do segmento gênico por recombinação homóloga.

#### **4.5.3 Realização do choque térmico empregando a linhagem rompida e a linhagem selvagem de *P. aeruginosa* O1**

Inicialmente, um pré-inóculo de *P. aeruginosa* O1 foi cultivado em meio LB, a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, um inóculo em meio LB ajustado para  $DO_{600nm}=0,1$  foi cultivado em incubadora com agitação orbital CT-712R (Cientec®), até atingir fase exponencial de crescimento ( $DO_{600}=0,5$ ).

A cultura foi então fracionada em dez tubos (*Eppendorf*®) contendo 1 mL de volume final de meio LB, de modo que todos os tubos atingissem temperatura de 50 °C em 1 minuto, sendo a temperatura dos tubos aferida durante todo o processo de choque térmico. Posteriormente, as culturas foram submetidas ao processo de choque térmico propriamente dito, onde as mesmas foram incubadas a 50 °C durante 1 minuto e imediatamente após,

incubadas a temperatura de 37 °C. Os respectivos tubos contendo as culturas bacterianas foram retirados imediatamente antes do processo de choque térmico e posteriormente a ele, nos seguintes tempos: 5 e 30 minutos. As amostras foram centrifugadas, o sobrenadante aspirado e as células ressuspensas em trizol (Invitrogen®) e congeladas a -80 °C, para posterior extração de RNA.

#### **4.5.4 Extração do RNA total da linhagem rompida e da linhagem selvagem de *P. aeruginosa* O1**

A extração do RNA total das amostras de *P. aeruginosa* submetidas ao processo de choque térmico foi realizada através do método TRIZOL® (Invitrogen), conforme instruções do fabricante, com algumas modificações descritas a seguir.

Inicialmente, as amostras que haviam sido ressuspensas em 1 mL de Trizol e armazenadas a -80 °C foram, então, descongeladas a temperatura ambiente. Para cada amostra foram adicionados 200 µL de clorofórmio, sendo a mistura homogeneizada em vórtex por 15 segundos e incubadas por 3 minutos, em temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 20 min, a 4 °C. Após a remoção de aproximadamente 500 µL do sobrenadante por aspiração, o mesmo foi transferido para um novo tubo, com capacidade para 1,5 mL. As amostras de RNA foram precipitadas em 500 µL de isopropanol e incubadas por 1 hora a -20 °C, sendo submetidas, posteriormente, a centrifugação por 15 minutos a 12.000 x g, a 4 °C. Após desprezar o sobrenadante, o precipitado de RNA foi lavado com 1 mL de etanol 75% gelado com centrifugação por 15 minutos a 12.000 x g, a 4 °C. Após a retirada do sobrenadante e do *pellet* já estar totalmente seco, este foi eluído em 30 µL de água deionizada Milli-Q com dietilpirocarbonato (DEPC).

Para avaliar integridade e a qualidade do RNA extraído foi realizada eletroforese horizontal em gel de agarose 0,8%, corado com GelRed, utilizando tampão 1x TBE (50 mM Tris, 50 mM ácido bórico, 2,5mM EDTA, pH 8,3). A quantificação do RNA extraído foi feita através de avaliação em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 260 nm e 280 nm, de acordo com a técnica de Sambrook e colaboradores (2001). Após a quantificação, aproximadamente 1 µg do RNA total de cada uma das amostras foi devidamente tratado com DNase I (Invitrogen®).

#### **4.5.5 Síntese de cDNA a partir do RNA total obtido da linhagem rompida e da linhagem selvagem de *P. aeruginosa* O1**

Aproximadamente 0,5 µg de RNA foram utilizados como molde para a síntese de cDNA empregando oligonucleotídeos hexaméricos randômicos e transcriptase reversa (Invitrogen®). A reação de síntese de cDNA foi realizada em um volume final de 20 µL utilizando a enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen®) de acordo com as especificações fornecidas pelo fabricante.

O cDNA foi utilizado para os ensaios de PCR quantitativo (qPCR) a fim de avaliar a expressão ou repressão de genes de choque térmico.

#### **4.5.6 Avaliação da expressão de genes relacionados ao choque térmico nas linhagens rompida e selvagem de *P. aeruginosa* O1**

Para avaliar a expressão de genes relacionados ao choque térmico, *primers* foram desenhados com auxílio do programa FastPCR e confirmados utilizando a ferramenta *primer blast* disponível no banco de dados do NCBI. A Tabela 3 apresenta a descrição dos *primers* e suas respectivas sequências.

As reações de amplificação foram realizadas utilizando Platinum® SYBR® Green qPCR Super Mix-UDG (Invitrogen™) em um volume total de 20 µL. Brevemente, a reação de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) foi constituída de 10 µL de tampão Platinum® SYBR® Green qPCR Super Mix-UDG 2x; 10 µM de cada primer; 4 µL de água DEPC e 4 µL de amostra de cDNA diluída em uma proporção de 1/100. As amplificações foram realizadas em Real-Time PCR System Applied Biosystems StepOne™ programado para os seguintes ciclos: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos correspondentes a 95 °C por 15 segundos e 60 °C por um minuto. Para garantir a especificidade da amplificação foi realizada uma curva de desnaturação com temperatura variando de 61 a 95 °C e acréscimo de 0,3 °C por ciclo.

A avaliação dos resultados foi realizada mediante análise da expressão comparativa  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . O método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  de quantificação relativa é calculado com base no  $\Delta CT$  (diferença entre o  $Ct^{amostra}$  e o  $Ct^{gene\ constitutivo}$ ), o  $\Delta\Delta CT$  é calculado pela diferença do  $\Delta Ct^{amostra}$  em relação à média do  $\Delta Ct^{controle}$  utilizado por fim para o cálculo empregando  $2^{-\Delta\Delta CT}$

**Tabela 3:** Genes avaliados por meio de qRT-PCR com suas respectivas funções; *primers* utilizados, seqüências e tamanho dos fragmentos obtidos.

Gene	Primer	Seqüência do Primer (5'-3')	Amplicon	Função
PA0657	0657f 0657r	GGTACCCTGCTGACCTGGAT ATTCGTGGAAGCGTCCCTTGC	116pb	Amplifica parte da seqüência do gene de <i>P. aeruginosa</i> em estudo.
AlgU	AlgUf AlgUr	GAAGCCCAGGACGTAGCGCA CCAGGTGGTTCTTCGCGGTG	127pb	Fator de transcrição $\sigma^{22}$ em <i>P. aeruginosa</i> , relacionado com a expressão do fenótipo mucoide.
DnaJ	dnaJf dnaJr	CTTTTACGAGGTTCTGGGGGT TTGAACTTGTCTCCTCGGCTTCC	129pb	Chaperona de resposta a choque térmico, provavelmente envolvida na replicação, recombinação, modificação e reparo, adaptação e proteção do DNA.
DnaK	dnaKf dnaKr	CATTGGCATCGACCTGGGTAC CGTTGGTGTAGGCGATGATCG	122pb	Chaperona de resposta a choque térmico, provavelmente envolvida na replicação, recombinação, modificação e reparo, adaptação e proteção do DNA.
GroEL	GroELf GroELr	TTAAGTTCGGCGATTCCGCTC AGGACTTGTCCAGAACCACGT	114pb	Chaperona envolvida com resposta a choque térmico.
GroES	GroESf GroESr	TTATCCGTCGCAGCGAGGAAG TCCAGTACACGACCGGTACCT	118pb	Chaperona envolvida com resposta a choque térmico.
GrpE	GrpEf GrpEr	CACAAGTTCGCGTGGAGAAA GGTCAGTTCATCCCTTCGC	129pb	Chaperona de resposta a choque térmico, provavelmente envolvida na replicação, recombinação, modificação e reparo, adaptação e proteção do DNA.
16S rRNA	16Sf 16Sr	AGCGTGGGGAGCAAACAGGA CCGTACTCCCCAGGCGGTC	128pb	Subunidade ribossomal expresso constitutivamente ( <i>housekeeping</i> ).
RpoH	rpoHf rpoHr	GGAAGACGCCGACTGGAGC GCAGCGTGGCCTTCTCCTC	122pb	Fator de transcrição $\sigma^{32}$ em <i>P. aeruginosa</i> responsável pela transcrição de genes envolvidos com o choque térmico.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Análises computacionais – bioinformática

#### 5.1.1 Análise da sequência gênica de PA0657 e identificação dos domínios da proteína

A identificação da sequência gênica PA0657 no genoma de *P. aeruginosa* foi realizada a partir de buscas de sequências depositadas no GenBank, mantido pelo *National Center of Biotechnology Information* (NCBI), onde foi possível selecionar a sequência de nucleotídeos e a de aminoácidos codificada pelo gene em estudo.

Com o objetivo de analisar a região promotora do gene PA0657 e identificar o fator sigma que a reconhece, uma sequência de DNA de 500 pb imediatamente anterior ao códon AUG do gene PA0657, referente à região promotora, foi submetida à análise com o software BacPP.

Este software foi desenvolvido para ser aplicado na predição, reconhecimento e caracterização de regiões promotoras procarióticas de acordo com o fator  $\sigma$  que as reconhece, permitindo classificar uma determinada sequência como promotora e fornecendo a probabilidade desta sequência ser reconhecida por determinado fator sigma (Silva *et al.*, 2011). A figura 6 mostra parte da região promotora do gene PA0657 submetida à análise com o software BacPP, destacando o segmento compreendido entre os nucleotídeos -140 e -61, que corresponde a região com maior probabilidade de ser reconhecida pelo fator  $\sigma^{32}$ . Por meio dessa análise, é possível observar que o gene PA0657 apresenta uma probabilidade acima de 70% de ser regulado pelo fator  $\sigma^{32}$ .

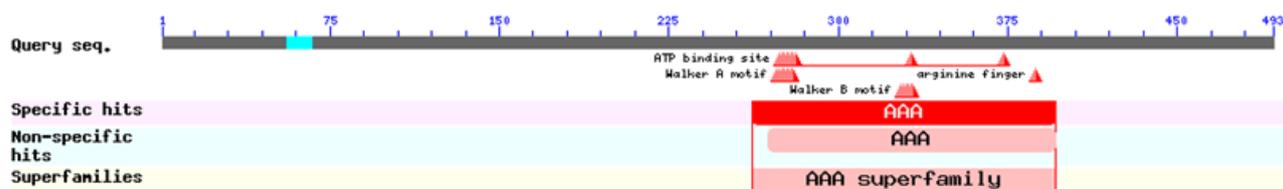
```
TCTTCGTAGAACTTGCGCGCGGGAAGTCCCGCCACGATCTTGCAGAACAGACAGTCCATGGGCGATTCTCCGGCC
```

-140 -61

**Figura 5:** Região promotora do gene PA0657.

Em bactérias Gram-negativas, o fator  $\sigma^{32}$  desempenha papel importante na resposta ao choque térmico por meio do reconhecimento de regiões promotoras responsáveis pela regulação da expressão gênica de HPS (Kobayashi *et al.*, 2011). Assim sendo, o gene PA0657 deve ser expresso em resposta ao choque térmico, regulando a ação de proteínas envolvidas na homeostase celular.

Posteriormente, a fim de conhecer a superfamília e identificar a conservação dos aminoácidos importantes para a manutenção da estrutura e função da proteína, parte da sequência codificadora do gene PA0657 foi submetida à Base de Dados de Domínios Conservados (CDD) que permitiu observar que a ORF do gene PA0657 codifica uma proteína contendo 493 aminoácidos e que esta sequência apresenta uma cópia do módulo AAA, composta pelos domínios conservados Walker A e Walker B (Figura 6).



**Figura 6.** Domínios funcionais conservados presentes na ORF PA0657 de *P. aeruginosa* segundo o CDD.

Os domínios encontrados apontam para que a proteína codificada pelo gene PA0657 faça parte da superfamília de proteínas AAA<sup>+</sup>, já que a presença dos motivos de ligação e hidrólise de ATP Walker A e Walker B, altamente conservados, seguidos de um resíduo de arginina, constituem determinantes importantes na classificação de proteínas da superfamília AAA<sup>+</sup> (Snider *et al.*, 2008; Tucker *et al.*, 2007).

O *Specific hits* representa um alto grau de confiança de que a sequência de PA0657 pertença à mesma família de proteínas que as sequências utilizadas para criar o modelo do domínio, e por conseguinte, um elevado nível de confiança para inferir a função da proteína.

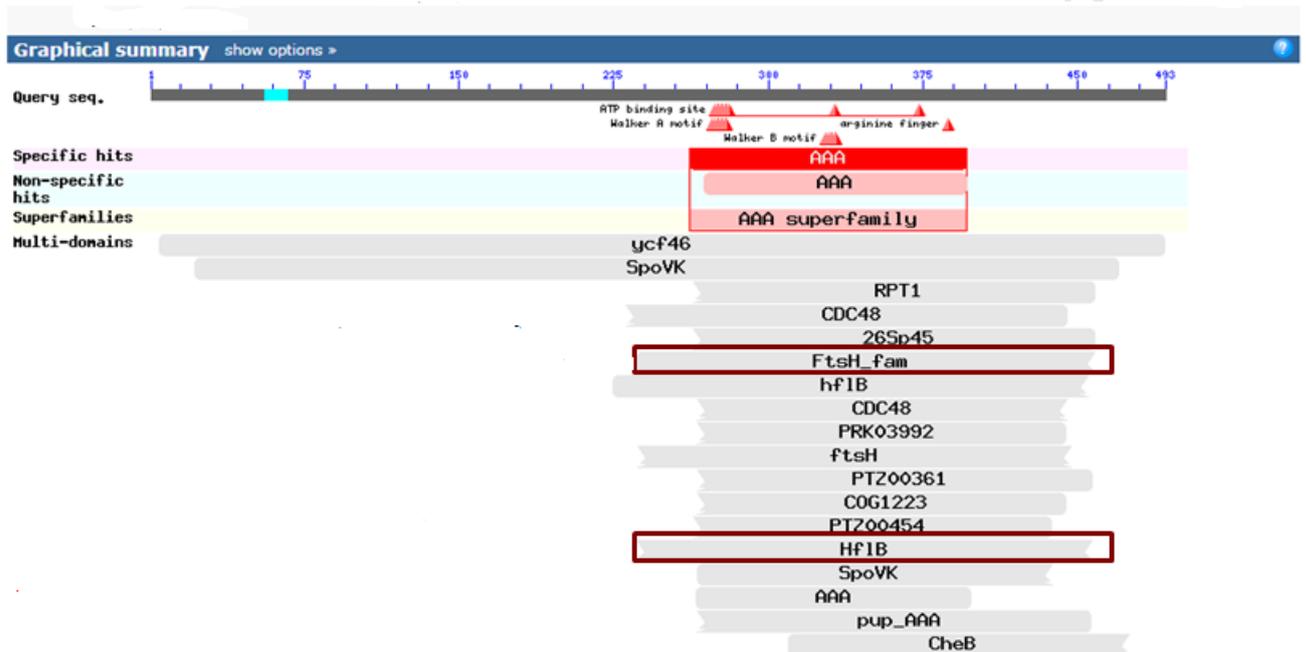
Uma superfamília é caracterizada como um conjunto de modelos de domínio conservado que geram anotação sobreposta nas sequências de mesmas proteínas. Esses modelos são assumidos para representar domínios evolutivamente relacionados e que podem ser redundantes um com o outro (Souza, 2012).

Um dos critérios que classificam proteínas como sendo proteases da superfamília AAA<sup>+</sup> é a presença de uma ou mais cópias do módulo AAA. Este módulo é constituído por um domínio de ligação ao ATP e pelos motivos conservados Walker A e Walker B (domínios ATPásicos) responsáveis, respectivamente, pela ligação e hidrólise do nucleotídeo. Existe também uma sequência de aminoácidos altamente conservada, localizada dentro do domínio ATPásico e denominada de segunda região de homologia (SRH) (Rappas *et al.*, 2006).

Dessa forma, de acordo com os dados fornecidos pelo CDD, é possível inferir, com elevado grau de confiança, que a proteína codificada pelo gene PA0657 possa assumir função de uma protease AAA, já que apresenta os domínios conservados em questão.

Além da identificação da superfamília e predição dos aminoácidos conservados importantes para a manutenção da estrutura e função da proteína, a busca por similaridade de domínios no CDD forneceu outros dados pertinentes em relação aos motivos estruturais associados à proteína em estudo e a sua relação com outras proteínas já reportadas.

Diversas proteínas conhecidas compartilham o mesmo domínio específico altamente conservado encontrado para a ORF PA0657 e, entre elas, destacamos as proteínas FtsH e HflB, caracterizadas como membros da família AAA<sup>+</sup> e que apresentam função de metaloproteases (Figura7).



**Figura 7.** Domínios funcionais conservados presentes na ORF PA0657 de *P. aeruginosa* segundo o CDD seguido de proteínas que apresentam os mesmos domínios conservados em suas seqüências de aminoácidos. Em destaque duas proteases que integram a família das AAA: a FtsH e a HflB.

Um importante membro que integra a família das AAA<sup>+</sup> corresponde a metaloprotease FtsH, a qual desempenha papel essencial na regulação de processos bioquímicos e moleculares em *E. coli*. Trata-se de uma protease ATP dependente, ancorada na membrana plasmática deste microrganismo, cujas funções principais estão associadas ao controle da resposta ao choque térmico por meio da proteólise do fator de transcrição RpoH ( $\sigma^{32}$ ) e à biossíntese do lipopolissacarídeo LPS através da degradação das enzimas chave LpxC e KdtA (Westphal *et al.*, 2012).

Outra proteína caracterizada como sendo integrante da família das AAA<sup>+</sup> é a protease HflB (*high frequency of lysogeny*), sintetizada pelo gene *hflB* em *E. coli*. Corresponde a uma proteína transmembrana, que apresenta ação proteolítica dependente de ATP e possui atividade intrínseca de chaperona molecular (Bandyopadhyay *et al.*, 2010; Inwood *et al.*, 2009).

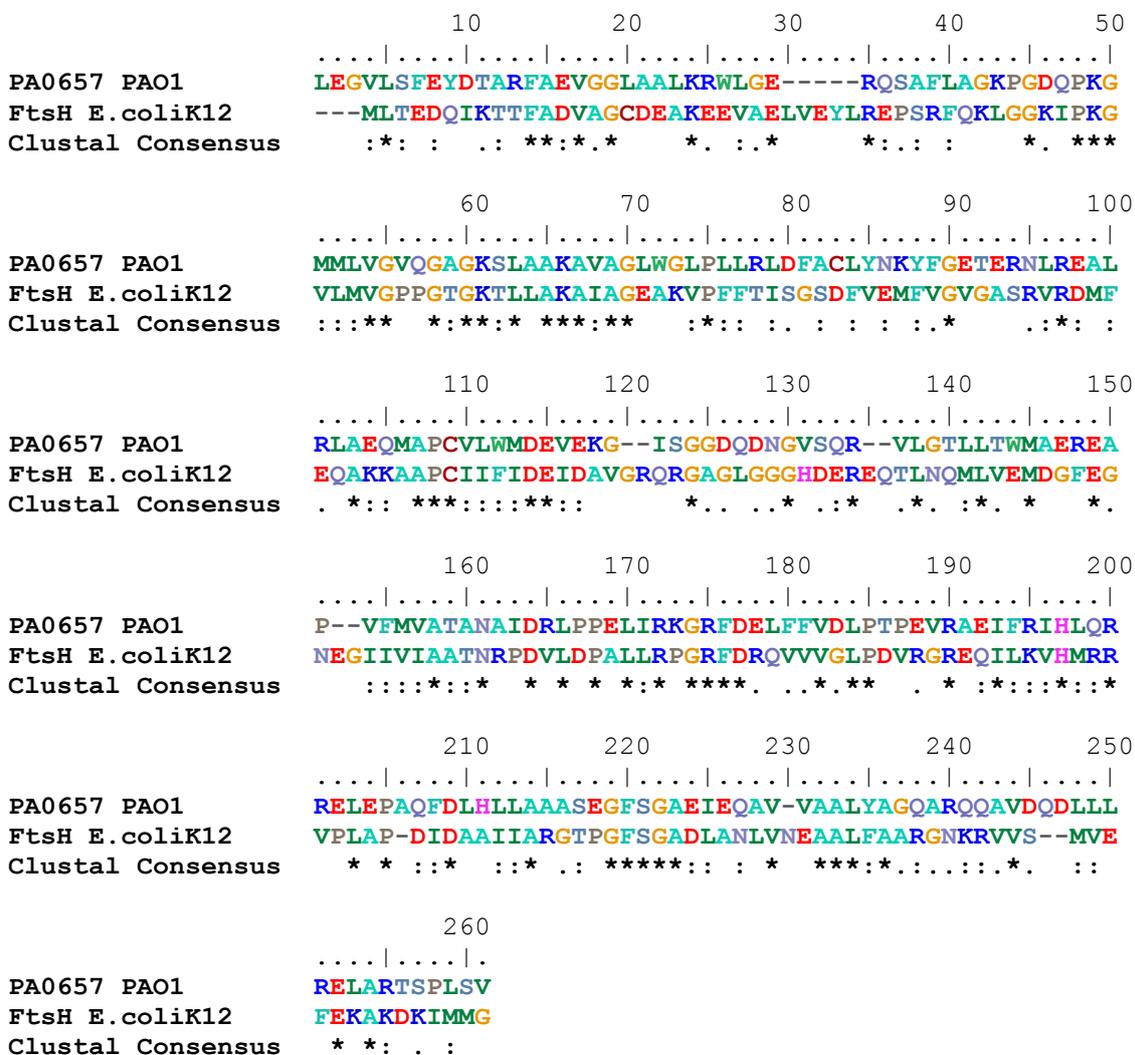
A atividade de HflB como chaperona molecular foi reportada por diversos autores. Inwood e colaboradores (2009) verificaram que essa proteína, além de atuar em eventos de estresse celular removendo proteínas danificadas por meio de proteólise, desempenha função importante como chaperona, associando-se a proteínas desnaturadas e influenciando na sua montagem e disposição.

Além disso, exerce função importante no ciclo lisogênico, atuando como protease e estando envolvida no processo de degradação do fator de transcrição CII e controlando, desta forma, o processo de lisogenia que ocorre em procariotos (Bandyopadhyay *et al.*, 2010; Kihara *et al.*, 1997).

### **5.1.2 Alinhamento das Sequências Proteicas PA0657 de *P. aeruginosa* e FtsH de *E. coli***

Tendo em vista que as proteínas PA0657 e FtsH, expressas por *P. aeruginosa* e por *E. coli*, respectivamente, apresentam os mesmos domínios estruturais conservados ao longo da sua seqüência de aminoácidos, foi realizado o alinhamento destas seqüências.

O resultado do alinhamento das sequências de aproximadamente 250 aminoácidos referentes às proteínas PA0657 e FtsH mostrou elevado grau de identidade, como apresentado na figura 8.



**Figura 8.** Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína PA0657 de *P. aeruginosa* comparada com a sequência de aminoácidos da proteína FtsH de *E. coli* K12.

É possível observar que o alinhamento proteico de PA0657 com relação de FtsH apresenta regiões com maior grau de similaridade, com homologia de 74/261 aminoácidos e destacando 65 aminoácidos com características bioquímicas semelhantes. Regiões com menor grau de identidade também foram evidenciadas, sendo observados 31 aminoácidos com

propriedades bioquimicamente semelhantes.

O resultado do alinhamento das sequências, que revelou alto grau de similaridade em termos de aminoácidos de ambas as proteínas, e a identificação dos principais motivos estruturais que são característicos das proteínas que fazem parte da família das AAA<sup>+</sup>, nos permitiram inferir a função do gene PA0657 que, aparentemente codifica uma proteína similar a FtsH de *E. coli*.

A FtsH de *E. coli* apresenta dois domínios transmembrânicos na região N-terminal que a ancora na membrana plasmática e uma cópia do módulo AAA, além de um domínio proteásico, representado pelo motivo conservado de ligação ao Zn<sup>2+</sup>, na região C-terminal, exposto ao citoplasma, compartilhando, dessa forma, com a proteína PA0657 de *P. aeruginosa* pelo menos a característica de possuir o módulo AAA (Ito & Akiyama, 2005; Langklotz *et al.*, 2012).

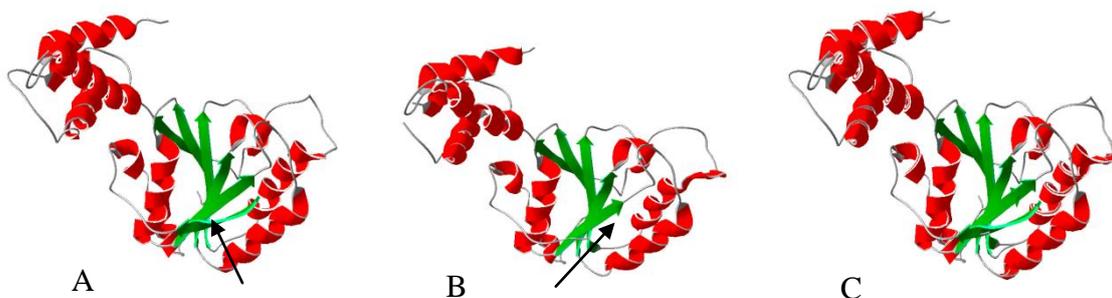
### **5.1.3 Modelagem Tridimensional da Proteína Codificada pelo Gene PA0657 em Relação ao Ftsh de *E. coli* K12**

Sabe-se que a função biológica de uma proteína está diretamente relacionada com sua estrutura, tornando assim o estudo estrutural extremamente importante em biologia molecular. Dessa forma, com o objetivo de prever a estrutura terciária da proteína codificada pelo gene PA0657 de *P. aeruginosa*, foi realizada a modelagem tridimensional por meio do programa SWISSMODEL.

Esse programa modela uma sequência de aminoácidos baseado na similaridade de uma sequência proteica já cristalografada. A comparação é feita a partir de sequências de aminoácidos das proteínas cristalografadas contidas no banco de dados DeepView/Swiss-PdbViewer com a proteína de interesse e, dessa forma, coordenadas tridimensionais para cada átomo da proteína com estrutura desconhecida são geradas pelo programa com base na estrutura tridimensional da proteína cristalografada (Sweed *et al.*, 2003).

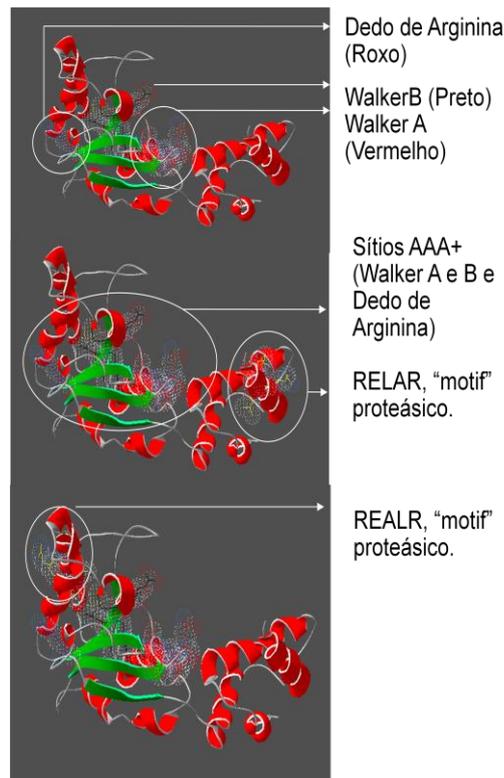
As análises de bioinformática realizadas revelaram que a proteína codificada pelo gene PA0657 de *P. aeruginosa* apresenta alto grau de homologia com a proteína Ftsh de *E. coli*. Dessa forma, uma modelagem estrutural de PA0657 foi realizada tendo como referência a proteína já cristalografada FtsH de *E. coli* K12, a fim de comparar as semelhanças entre as duas estruturas.

Na figura 09 é possível observar a estrutura de FtsH já existente obtida por cristalografia (A), o modelo da proteína PA0657 de *P. aeruginosa* (B) gerado em comparação a este, assim como os dois modelos sobrepostos (C).



**Figura 9.** Modelagem *in silico* da proteína PA0657. Em A: estrutura da proteína cristalografada de FtsH de *E. coli*; em B: modelagem da proteína PA0657 e em C: sobreposição de PA0657 e FtsH. As setas evidenciam a presença de uma sexta folha beta na FtsH e a ausência na PA0657.

A sobreposição das duas estruturas gerou um modelo tridimensional que mostrou similaridade estrutural entre ambas as proteínas. Na figura 10 estão representados os resíduos de aminoácidos que fazem parte dos domínios Walker A, Walker B e dedo de arginina, estando também evidenciados os resíduos de aminoácidos relacionados com atividade proteásica e representados pelos motivos RELAR e REALR.



**Figura 10.** Modelagem *in silico* da estrutura terciária da proteína PA0657 de *P. aeruginosa* O1.

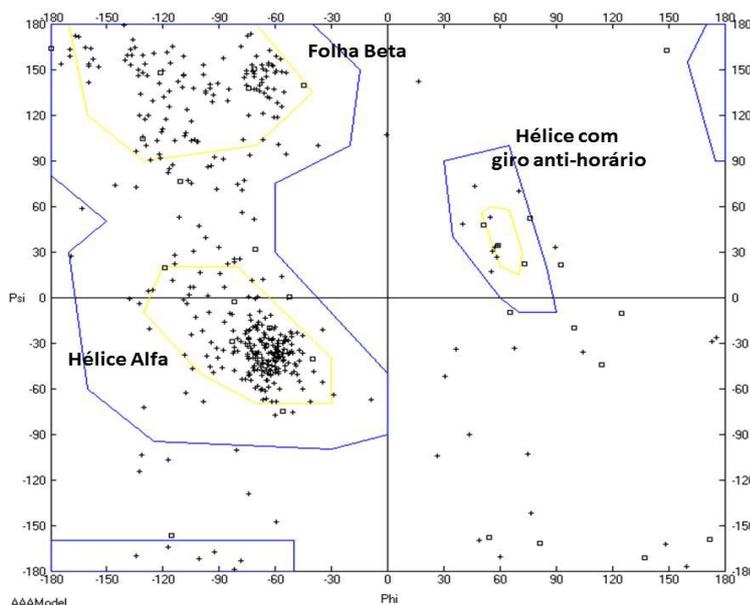
O modelo estrutural da proteína PA0657 revelou dois domínios principais, característicos de uma proteína AAA<sup>+</sup>, além da região referente ao dedo de arginina. O domínio Walker A, assim como o dedo de arginina, se concentra principalmente em hélices  $\alpha$ , enquanto que o domínio Walker B, se concentra em folhas  $\beta$ .

O processo de modelagem por homologia em 3D da proteína PA0657 foi concluído por meio da análise da confiabilidade da estrutura gerada. Um requisito básico para um modelo ser aceito é ter uma boa qualidade estereoquímica e esta qualidade pode ser avaliada por meio do gráfico de Ramachandran, que permite a validação do modelo da proteína gerada.

O gráfico de Ramachandran mostra a distribuição das combinações entre os ângulos torsionais *phi* ( $\Phi$ )- ângulo entre o carbono- $\alpha$  e o nitrogênio do grupamento amino- e *psi* ( $\Psi$ )- ângulo formado entre o carbono - $\alpha$  e o carbono do grupamento carboxil- que uma proteína pode apresentar. É considerado, dessa forma, um importante indicador da qualidade estereoquímica de uma proteína e orienta a validação da qualidade de modelos teóricos ou experimentais destas proteínas por meio da demonstração dos resíduos de aminoácidos que se

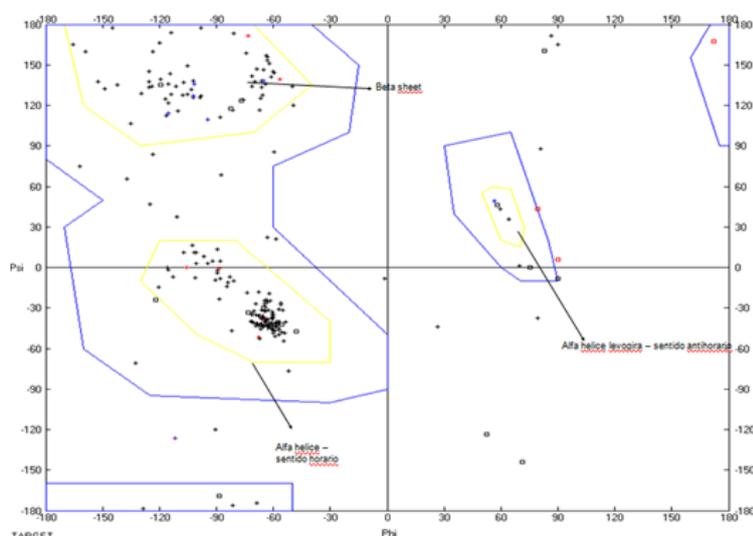
encontram nas regiões energeticamente mais favoráveis, dentre as possíveis, obtidas para os ângulos de torção (*phi* e *psi*) nas estruturas secundárias hélices  $\alpha$ , folha  $\beta$  e *loops*, respectivamente (Murray *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2002).

O modelo obtido para a proteína PA0657 de *P. aeruginosa* foi inicialmente submetido à análise da qualidade através do gráfico de Ramachandran e os resultados foram comparados com a estrutura proteica da 2qz4A Paraplegina Humana disponibilizada pelo *Protein data base*. A distribuição dos resíduos dos aminoácidos pode ser vista no gráfico de Ramachandran (figura 11) e a análise do gráfico gerado indica que o modelo obtido para a proteína PA0657 de *P. aeruginosa* é de grande qualidade estereoquímica, visto que a maior parte dos resíduos de aminoácidos adotam ângulos de torção  $\Phi$  e  $\Psi$  mais favoráveis, semelhantes ao molde utilizado.



**Figura 11.** Gráfico de Ramachandran exemplificando a estereoquímica dos aminoácidos presentes na proteína PA657 de *P. aeruginosa*.

A fim de avaliar a qualidade da estrutura proteica PA0657 de *P. aeruginosa* empregou-se gráfico de Ramachandran, comparando-a com a estrutura da proteína cristalografada FtsH de *E. coli* K12.



**Figura 12.** Gráfico de Ramachandran de PA0657 em relação a fita modelo de FtsH de *E. coli*

Avaliando o gráfico de Ramachandran gerado, percebe-se que grande parte dos resíduos de aminoácidos encontra-se localizados nas regiões mais favoráveis, evidenciando a similaridade da proteína em estudo com a proteína FtsH de *E. coli*.

Sabe-se que um modelo determina quanta informação pode ser extraída dele e que a probabilidade de que o modelo de proteína gerada seja real está diretamente relacionada com a quantidade de pontos existentes dentro da área circunscrita pela linha amarela; dessa forma, tendo em visto a grande quantidade de resíduos localizados dentro desta região do gráfico, a qualidade do modelo obtido é reforçada, uma vez que são evidenciados ainda uma pequena parte de resíduos presentes em regiões permitidas (área delimitada pelas linhas amarela e azul) e uma quantidade mínima de resíduos nas regiões desfavoráveis (demais áreas do gráfico), os quais encontram-se longe do sítio ativo da proteína e, portanto, não devem intervir na sua função.

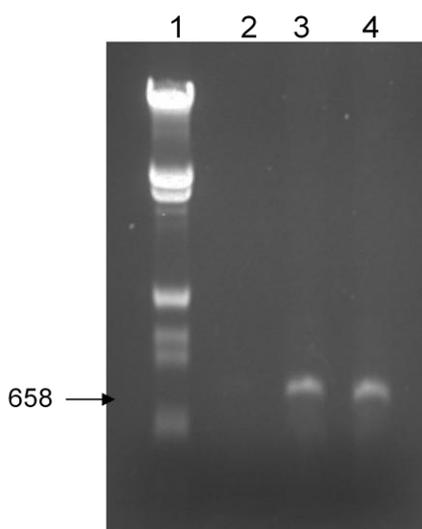
## 5.2 Clonagem do gene PA0657 de *P. aeruginosa* e expressão heteróloga da proteína recombinante

A clonagem do gene PA0657 foi realizada a partir da amplificação, por meio de PCR, do fragmento correspondente a região codificadora deste gene, utilizando os *primers* pPin e pATpase, que apresentam sítios de restrição para as enzimas *NruI* e *BamHI*, inseridas de

forma a permitir a clonagem direcional no vetor de expressão Pin Point™Xa-1(Promega). Esta amplificação gerou um fragmento de DNA de 1521 pb empregado, dessa forma, na construção propriamente dita do plasmídeo recombinante.

A clonagem prosseguiu-se com a utilização do vetor PinPoint™Xa-1 que, assim como o fragmento de PCR descrito acima, foi digerido com as enzimas *NruI* e *BamHI* para que, posteriormente, ser ligado ao inserto por ação da T4 DNA ligase. Por meio de transformação em uma linhagem de *E. coli* J0M109 eletrocompetente, clones positivos para essa construção foram obtidos.

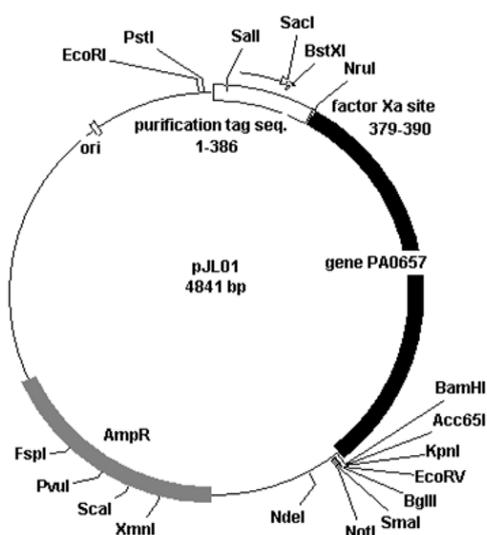
Para a confirmação da presença do inserto no plasmídeo PinPoint™Xa-1, foi realizada extração de DNA plasmidial dos transformantes de *E. coli*, selecionados de forma aleatória. Foi empregada a técnica de PCR utilizando os *primers* p30 e p31, onde observou-se que os clones recombinantes apresentavam produto de amplificação de tamanho esperado (Figura 13).



**Figura 13.** Gel de agarose 0,8% com TBE 1X mostrando a amplificação dos produtos de PCR obtidos a partir de DNA plasmidial extraído dos transformantes clonados em vetor de expressão PinPoint™Xa-1. 1- Padrão de massa molecular (DNA  $\lambda$  digerido com *Eco* RI). 2- Controle negativo (PinPoint™Xa-1); 3- Produto da reação de PCR do transformante; 4- Controle positivo da reação de PCR utilizando DNA genômico de *P. aeruginosa*. A seta indica as bandas amplificadas de 658 pb referente ao controle positivo e ao transformante.

Visando a confirmação da presença do inserto no plasmídeo PinPoint™ Xa-1, o clone que apresentou amplicon de 658 pb para o par de *primers* testado foi submetido ao sequenciamento de DNA de todo o inserto, bem como da região de clonagem do vetor.

Tendo sido confirmada a presença do inserto e verificado que o mesmo estava inserido no vetor em fase de leitura correta, o plasmídeo recombinante foi denominado pJL01 (Figura 14).



**Figura 14.** Representação esquemática do segmento gênico PA0657 inserido no plasmídeo PinPoint™ Xa-1. No plasmídeo de expressão PinPoint™ Xa-1

O plasmídeo recombinante pJL01 foi empregado, desta forma, na transformação de uma linhagem de *E. coli* JM 109 eletrocompetente a fim de obter-se a proteína de fusão em sistema heterólogo bacteriano

O crescimento foi realizado em meio LB contendo 5 mM de biotina e a expressão da proteína recombinante foi induzida por meio da adição do indutor sintético IPTG em concentração de 3 mM, durante quatro horas, a 37 °C.

Após o período de indução da expressão da proteína foi avaliado se a proteína expressa estava presente na fração solúvel ou insolúvel do extrato de *E. coli*. Para isso, utilizou-se o extrato total de *E. coli* e o extrato parcial, onde as células foram lisadas por sonicação e posteriormente centrifugadas a fim de se obter a separação das proteínas solúveis

(hidrofílicas), presentes no sobrenadante e, das proteínas insolúveis (hidrofóbicas), presentes no precipitado (conforme descrito no item 4.3.1). Verificou-se que grande parte da proteína recombinante encontrava-se armazenada na forma de corpúsculos de inclusão (insolúveis) (Figura 15).

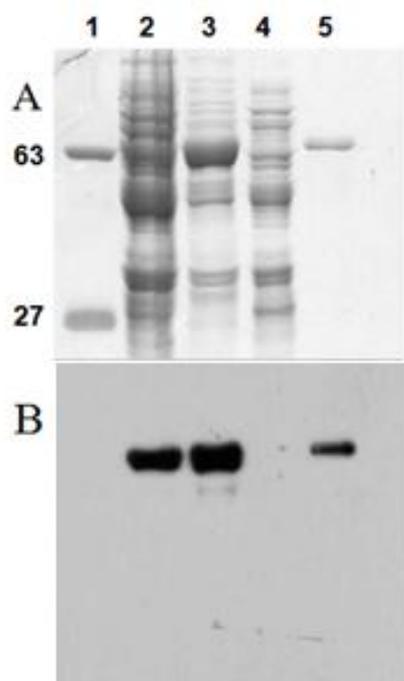
Sabe-se que os corpúsculos de inclusão são agregados de proteínas formados em ensaios de super expressão em bactérias, o que faz com que proteínas recombinantes fiquem na fração insolúvel do extrato e, dessa forma, não apresentem atividade biológica, sendo necessária a solubilização deste precipitado para uma posterior purificação (Zebisch & Strater, 2007).

Diversos trabalhos com enzimas pertencentes ao grupo das proteases ATP dependentes mostraram que, após sua expressão em sistema bacteriano, as mesmas se encontram em corpúsculos de inclusão e precisam ser parcialmente desnaturadas para a solubilização destes corpúsculos e obtenção da proteína com maior grau de pureza. (Ivanenkov *et al.*, 2003; Murphy-Piedmonte *et al.*, 2005; Zebisch & Strater, 2007).

É possível observar que a maior fração da proteína recombinante restou no precipitado, apresentando-se insolúvel (Figura 16 - coluna 3), o que reforçou a necessidade de solubilização e posterior purificação.

Assim sendo, utilizou-se um protocolo de purificação nativa para a fração solúvel da proteína. Para a fração insolúvel foram utilizados os agentes solubilizantes trealose e imidazol, com o objetivo de desfazer a fração insolúvel e promover a ligação da proteína à resina de avidina, que permitiu a obtenção da proteína purificada.

O sistema de purificação empregando o SoftLink<sup>TM</sup> Soft Release Avidin Resin (Promega®), seguido de concentração em único tubo tipo Centricon, mostrou-se uma escolha acertada. Conforme ilustrado na Figura 15- coluna 5, é possível observar a presença de uma proteína recombinante com massa molecular esperada de aproximadamente 65 kDa e elevado grau de purificação.



**Figura 15:** Expressão heteróloga em *E. coli* da proteína expressa pelo gene PA0657 de *P. aeruginosa* avaliada por meio de SDS-PAGE 10% corado com coomassie blue. A) Linha 1- MW (63 kDa e 27 kDa). 2- Extrato total de *E. coli* JM109 expressando a enzima recombinante; 3- Corpúsculo de inclusão; 4- Sobrenadante do lisado; 5- Enzima purificada do corpúsculo de inclusão (65 kDa). B) *Western-blotting* revelado com estreptavidina/peroxidase.

Esse método de purificação é considerado uma técnica eficiente, pois a ligação entre biotina e avidina é muito rápida e uma vez formada não é afetada por extremos de pH, solventes orgânicos ou outros agentes desnaturantes, sendo um importante sistema de purificação empregado em pesquisas e processos de purificação de proteínas (Driegen *et al.*, 2005).

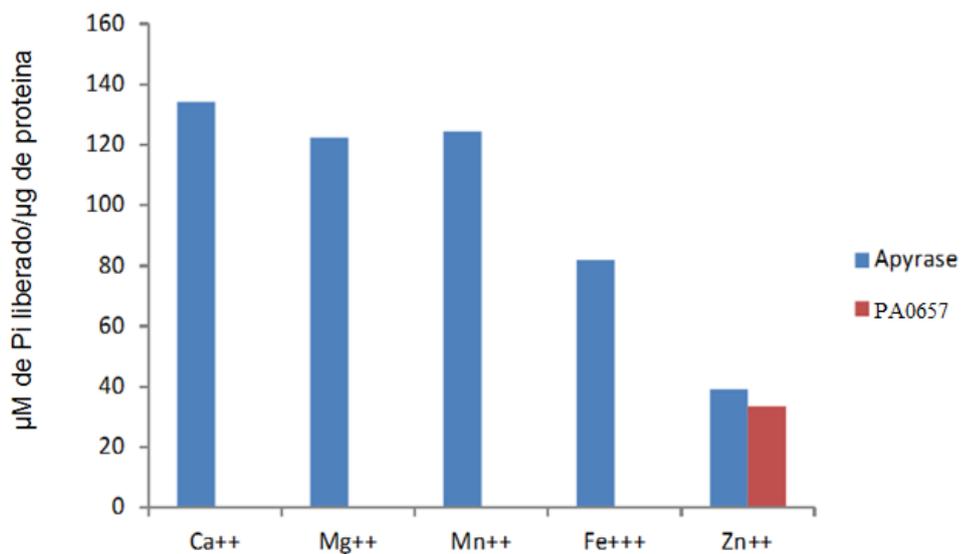
A expressão da proteína recombinante biotinizada presente nos extratos foi observada por *Western-blotting*, utilizando diretamente a estreptavidina conjugada com peroxidase HRP (Figura 16 B).

Por meio dos resultados do *immunoblotting* foi possível concluir que, nas condições empregadas para a expressão, a proteína recombinante está presente em alta quantidade nos corpúsculos de inclusão, mas que, após o processo de solubilização deste, é possível obter uma proteína com alto grau de pureza.

### 5.3 Determinação da atividade enzimática da proteína recombinante

Com o objetivo de avaliar a atividade nucleotidásica da proteína recombinante PA0657, estruturalmente já classificada por bioinformática como uma protease AAA<sup>+</sup>, foram realizados testes enzimáticos empregando trifosfato de adenosina (ATP) como substrato e diferentes cofatores, que incluíram Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Mn<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup>, considerados essenciais para atividade ATPásica apresentada por grupos de enzimas distintos. Como controle de que a reação estava ocorrendo de forma adequada, foi utilizado a apirase comercial de batata (Invitrogen®).

É possível observar na figura 16, o comportamento da proteína recombinante PA0657 para cada um dos cofatores avaliados.



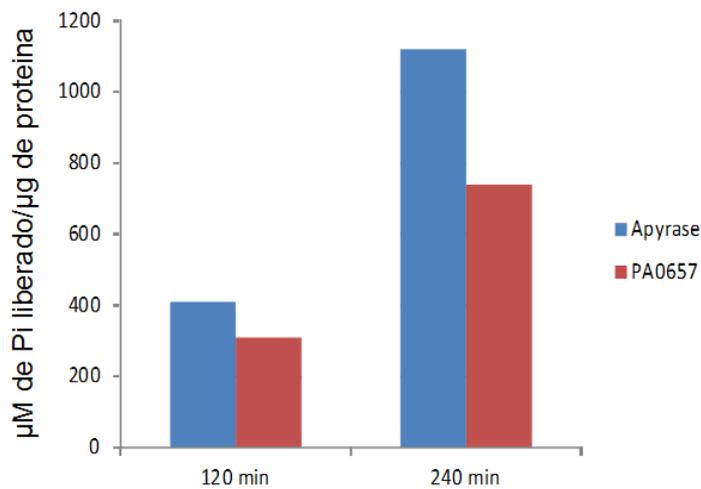
**Figura 16.** Atividade ATPásica da proteína recombinante PA0657 na presença dos cofatores Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> e Zn<sup>2+</sup>.

A enzima apirase, empregada como controle nesse experimento, integra a família das ATPases (E-NTPDases), caracterizada como sendo enzimas capazes de hidrolisar os nucleotídeos ATP e ADP à monofosfato de adenosina (AMP) e Pi, de maneira dependente da concentração de íons bivalentes como Ca<sup>2+</sup> ou Mg<sup>2+</sup> (Zimmermann, 2012).

Aproximadamente um terço das enzimas conhecidas possuem metais como parte de sua estrutura, requerem a adição de metais para a sua atividade ou são ativas na presença destes. No primeiro caso, os metais fazem parte da estrutura molecular da enzima e não podem ser removidos sem causar prejuízos à estrutura proteica. Nas demais situações, os metais reagem reversivelmente com proteínas, formando o complexo metal-proteína, responsável pela conformação específica associada à função catalítica da proteína (Querido *et al.*, 2006).

A presença de cofatores representa uma condição essencial para que a atividade nucleotidásica de grupos de enzimas específicos seja ativada. Ao analisar a capacidade de degradação de nucleotídeos mostrada pela proteína recombinante na presença dos cofatores avaliados, foi possível observar que a enzima recombinante PA0657 não apresentou atividade de hidrólise de ATP significativa para a grande maioria dos cofatores empregados, o que reforça a hipótese de que esta enzima integre um grupo diferente daquele ao qual a enzima apirase, classificada como ATPase, está inserida, uma vez que, em ATPases, os sítios catalíticos contém principalmente os íons metálicos  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ , essenciais para a sua atividade (Millan 2006; Robson *et al.*, 2006).

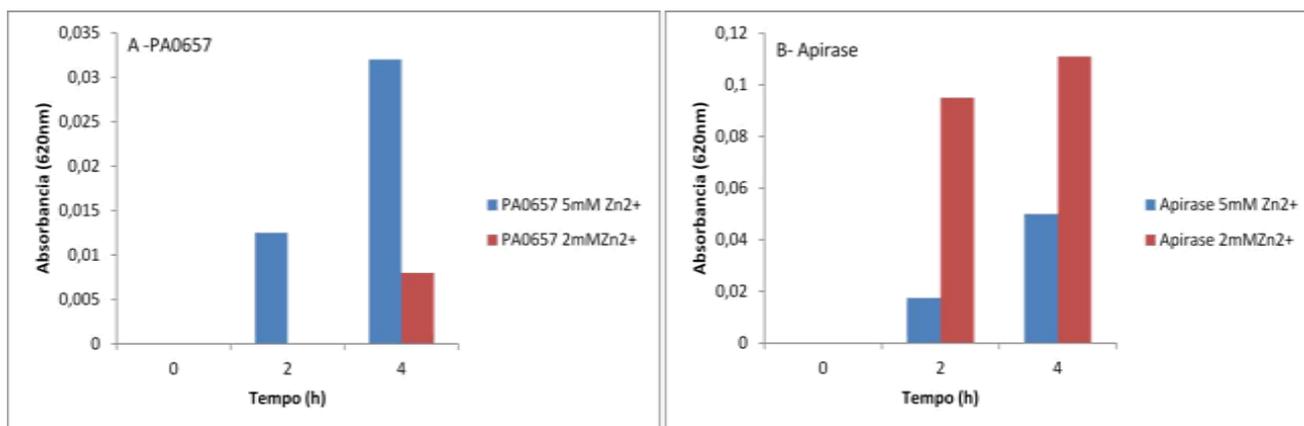
Em contrapartida, o teste realizado evidenciou claramente a habilidade da enzima PA0657 em hidrolisar ATP na presença do cofator  $\text{Zn}^{2+}$ . Com o objetivo de avaliar mais detalhadamente a capacidade de hidrólise da enzima em estudo na presença do cofator  $\text{Zn}^{2+}$  em particular, foi realizado um novo experimento variando o tempo de incubação da reação de hidrólise de ATP (Figura 17).



**Figura 17.** Avaliação da atividade nucleotídica da proteína recombinante e da apirase na presença de adenosina trifosfato (ATP) e  $Zn^{2+}$ , ambos na concentração de 5 mM. As barras azuis e vermelhas correspondem, respectivamente, a quantidade de fosfato inorgânico liberada por ação das enzimas PA0657 e apirase em 120 e 240 minutos.

Foi possível observar que a proteína recombinante purificada apresenta intensa atividade nucleotídica em meio de incubação adicionado de íon  $Zn^{2+}$ , na concentração de 5mM. Esta enzima apresentou atividade de hidrólise de ATP muito próxima à exibida pela enzima apirase, em ambos os tempos analisados. Verificou-se, também, que as duas enzimas apresentaram um perfil de hidrólise de ATP tempo - dependente bastante similar até o tempo 240 min. Após esse período, observou-se uma redução nos níveis de degradação de ATP (dados não mostrados) como provável consequência da perda de estabilidade enzimática após período de incubação prolongado. Sabe-se que o comprometimento da atividade de enzimas em geral, incluindo ATPases, sofre interferência de diversos fatores que incluem diferenças de pH e temperatura, instabilidade a íons e solventes e tempo de incubação (Kumari *et al.*, 2009).

Após terem sido definidos os tempos em que a proteína PA0657 apresenta sua capacidade máxima de hidrólise do nucleotídeo ATP, decidiu-se avaliar a influência exercida pelas concentrações do íon  $Zn^{2+}$  sobre a atividade nucleotídica da proteína em estudo e da enzima controle. Para isso, foram testadas duas concentrações distintas de  $Zn^{2+}$  (2 mM e 5 mM) e observou-se padrões diferentes de comportamento entre as duas classes de enzimas (Figuras 18A e 18B).



**Figura 18.** A- Avaliação da atividade ATPásica da proteína recombinante PA0657 na presença de Zn<sup>2+</sup> nas concentrações de 2 mM (barra azul) e 5 mM (barra vermelha). B- Avaliação da atividade ATPásica da apirase na presença de Zn<sup>2+</sup> nas concentrações de 2 mM (barra azul) e Zn<sup>2+</sup> 5 mM (barra vermelha).

Verificou-se que a proteína recombinante PA0657 apresentou um aumento de atividade nucleotidásica quando submetida à maior concentração (5 mM) do íon Zn<sup>2+</sup> avaliada; já um comportamento inverso é observado para a enzima apirase, que apresentou acentuada atividade ATPásica na presença de 2 mM de Zn<sup>2+</sup> e uma inibição de atividade na concentração de 5 mM.

Esse comportamento deve estar associado ao fato do íon Zn<sup>2+</sup> não ser o cofator de preferência para a atividade enzimática da apirase, ativada principalmente pelos cátions bivalentes cálcio e magnésio (Biederbick *et al.*, 2000; Zimmermann, 2012). Já a conduta apresentada pela proteína recombinante PA0657, que apresenta atividade nucleotidásica na presença do cofator Zn<sup>2+</sup>, evidencia e conduz à hipótese de que esta enzima possa integrar a classe das proteínas AAA, classificadas como sendo metaloproteases dependentes do metal zinco para exercerem suas atividades relacionadas à degradação de nucleotídeos (Anilkumar *et al.*, 2004; Langklotz *et al.*, 2012).

Em procariotos, um dos membros da família AAA bastante citado atualmente corresponde a proteína FtsH (Langklotz *et al.*, 2012; Rose *et al.*, 2011; Wagner *et al.*, 2012), inicialmente caracterizada em *E. coli* e definida como sendo uma protease com capacidade de degradar diferentes substratos, entre eles o fator transcricional -“heat shock”-  $\sigma^{32}$ , apresentando uma cópia do módulo AAA e um motivo conservado de ligação ao Zn<sup>2+</sup>, responsável pelo sítio catalítico da proteólise (Wagner *et al.*, 2012).

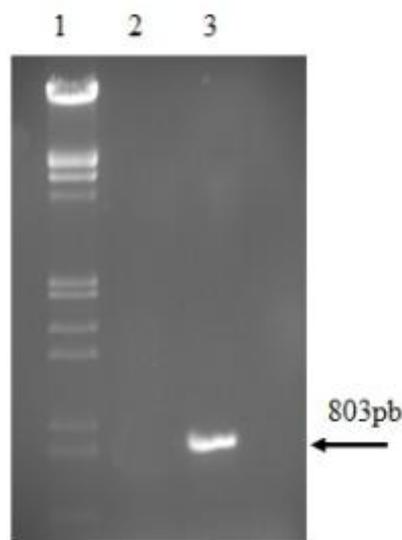
Karlberg e colaboradores (2009) analisaram por cristalografia a estrutura monomérica de uma FtsH isolada de *Helicobacter pylori*, demonstrando, entretanto, ausência de atividade ATPásica para a proteína estudada naquele microrganismo. Esta protease AAA também foi identificada em *Thermotoga marítim* e *Thermus thermophilus*, onde os domínios de ligação ao  $Zn^{2+}$  foram reconhecidos, sendo classificada como protease zinco dependente (Bieniossek *et al.*, 2009; Suno *et al.*, 2006).

Em *Salmonella*, uma FtsH foi identificada e associada à virulência da bactéria (Alix *et al.*, 2008). Esta protease também já foi reportada em *Synechocystis* e em plantas, atuando como mantenedora da qualidade do processo de fotossíntese (Langklotz *et al.*, 2012).

#### 5.4 Clonagem do Gene PA0657 de *P. aeruginosa* e Ruptura Gênica por Recombinação Homóloga

Com o objetivo de avaliar o comportamento do gene PA0657 em eventos relacionados à resposta a condições de estresse celular, foi realizado um nocaute gênico por recombinação homóloga do gene PA0657 de *P. aeruginosa*.

Para isso, um fragmento de 803 pb do gene PA0657, correspondendo ao início da região codificadora do gene, foi amplificado através de PCR (Figura 19) a partir do DNA genômico de *P. aeruginosa*, utilizando-se os *primers* p20 e p21.



**Figura 19.** Amplificação do gene PA0657 por PCR a partir do DNA genômico de *P. aeruginosa* utilizando *primers* p20-p21. Gel de agarose 0,8% com TBE 1x. 1- Padrão de

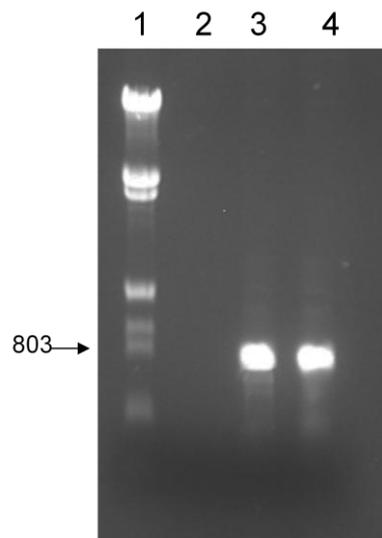
massa molecular (DNA  $\lambda$  digerido com EcoRI). 2- Controle negativo (reação de PCR sem DNA genômico). 3- Produto de PCR; a seta indica a banda amplificada de 803pb.

O produto de amplificação do gene obtido pela PCR teve seu tamanho concordante com o previsto, não apresentou nenhuma banda inespecífica e resultou em quantidades suficientes para proceder com a posterior etapa de clonagem do inserto em vetor apropriado para inativação gênica por recombinação homóloga.

Para isso, o amplicon foi devidamente purificado utilizando o kit Concert (LifeTechnology®) e clonado em vetor pKnockout G. O vetor foi linearizado com a enzima *XcmI*, defosforilado com a enzima CIAP e o inserto foi ligado a este vetor linearizado pela ação da enzima T4 DNA ligase. Esta nova construção foi submetida a transformação por choque térmico em células de *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes. As bactérias transformadas foram semeadas em meio LB ágar, contendo ampicilina 50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , e crescidas por 18 horas em estufa a 37 °C.

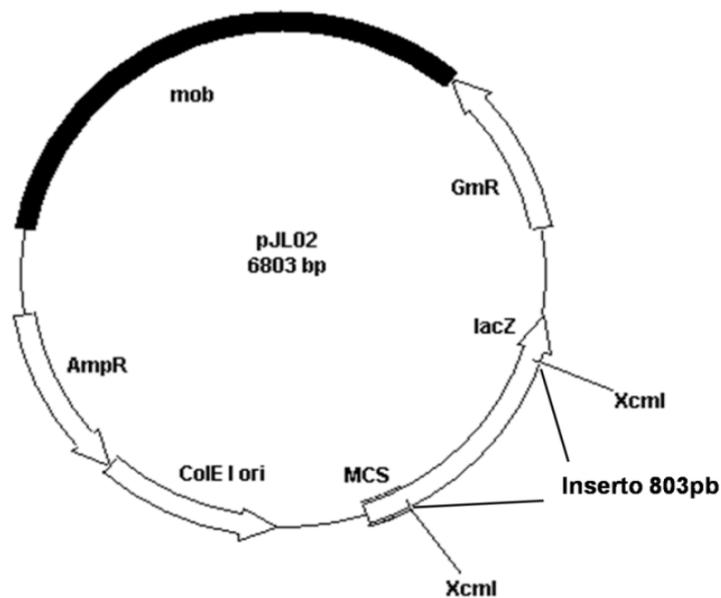
Alguns clones foram selecionados ao acaso, expandidos em 2mL de meio LB acrescido de ampicilina e submetidos ao processo de extração do DNA plasmidial, os quais foram empregados na confirmação da inserção do fragmento amplificado no vetor de clonagem. Esta confirmação se deu por meio de reação de PCR, nos mesmos moldes da PCR para amplificação inicial do inserto, utilizando os *primers* p20 e p21.

Um clone avaliado, o qual apresentou produto de amplificação correspondente ao tamanho esperado de 803 pb (figura 20), foi submetido ao sequenciamento automático de DNA que permitiu confirmar a presença do fragmento gênico no vetor pKnokout G.



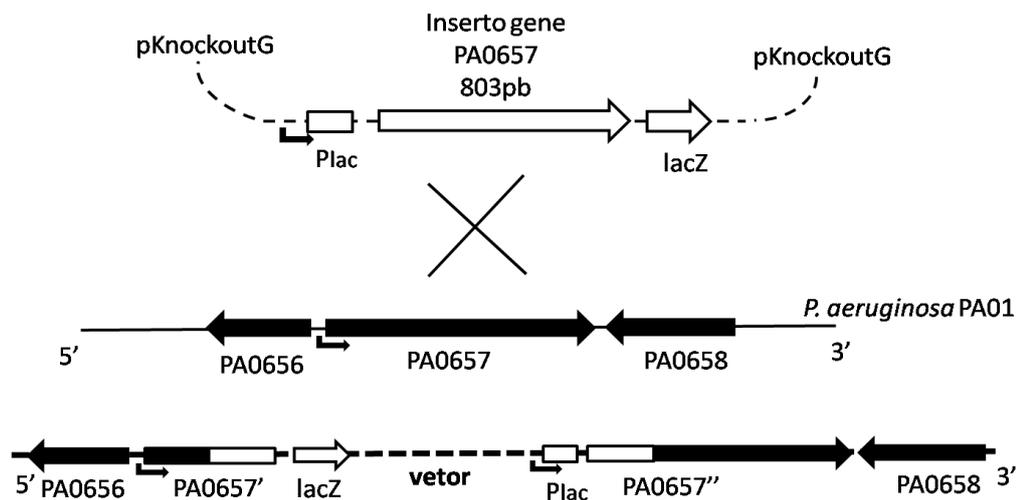
**Figura 20.** Amplificação do fragmento gênico PA0657 de *P. aeruginosa* inserido em plasmídeo pKnockout G. Gel de agarose 0,8% com TBE. 1- Padrão de massa molecular (DNA  $\lambda$  digerido com *EcoRI*). 2- Controle negativo (reação de PCR sem DNA genômico). 3- Produto de PCR do plasmídeo recombinante. 4- Controle positivo (segmento gênico de 803 pb da ORF0657 de *P. aeruginosa* utilizado como inserto na clonagem). A seta indica as bandas amplificadas de 803pb.

Após confirmada a inserção do fragmento no vetor “suicida” pKnokout G, o plasmídeo recombinante foi denominado pJL02 (Figura 21) e utilizado no processo de recombinação homóloga (nocaute gênico) do gene PA0657 que codifica a proteína em estudo.



**Figura 21.** Representação esquemática do segmento gênico PA0657 p20-p21 inserido no plasmídeo pKnockout G. Em destaque estão os elementos principais: o produto do PCR de PA0657 de 803 pb; os genes de resistência à ampicilina (Amp) e a gentamicina (Gm), a origem de replicação (ori), o gene repórter *LacZ* e o gene *mob* que codifica proteínas de mobilização.

O plasmídeo pJL02 foi empregado, desta forma, na transformação por eletroporação de uma linhagem de *P. aeruginosa* O1, a fim de promover o nocaute da sequência gênica PA0657. A transformação realizada com o plasmídeo pJL02 levou a uma recombinação homóloga simples propiciando a integração do vetor ao cromossomo bacteriano, uma vez que o pKnockout G não possui origem de replicação para o gênero *Pseudomonas* (Figura 22).



**Figura 22.** Representação geral do nocaute gênico PA0657 de *P. aeruginosa* por recombinação homóloga simples com uso do plasmídeo “suicida” pJL02. São ilustrados o plasmídeo pJL02 contendo o inserto de 803 pb, os segmentos gênicos localizados entre o gene PA0657 de *P. aeruginosa* e a integração de todo o plasmídeo no genoma da bactéria por meio de recombinação homóloga.

Os transformantes que apresentaram capacidade de crescer em meio LB contendo gentamicina (50 µg/ml) foram considerados positivos para o evento de recombinação homóloga e selecionados a crescerem por dez sucessivas passagens em meio LB sem antibiótico, seguidos de uma 11<sup>a</sup> passagem realizada em meio contendo gentamicina (50

µg/ml). Este processo visou à garantia de que somente clones que tivessem integrado o plasmídeo fossem selecionados. Dos clones que permaneceram resistentes ao antibiótico, dois foram escolhidos e classificados como PAO1 PA0657::GmR I e PAO1 PA0657::GmR II, sugerindo positividade para o evento de ruptura gênica.

Estes clones foram submetidos à confirmação da ruptura do segmento gênico PA0657 por meio de PCR, empregando três conjuntos de *primers* distintos e tendo como controle o DNA genômico da *P. aeruginosa* O1 (Figura 23).



**Figura 23.** Confirmação da ruptura do gene PA0657 de PAO1. Eletroforese em gel de agarose (0,8%) com os produtos de amplificação (PCR) para confirmação de ruptura gênica por recombinação homóloga do segmento PA0657. 1) Padrão de massa molecular (DNA  $\lambda$  digerido com *EcoRI*). 2, 3, 4 e 5) PCR utilizando *primers* p20-p21; 2) DNA genômico de PAO1 PA0657::GmR I; 3) Controle positivo (DNA genômico de PAO1); 4) DNA genômico de PAO1 PA0657::GmR II; 5) Controle negativo (reação de PCR sem DNA). 6, 7, 8 e 9) PCR utilizando *primers* p40-p41. 6) DNA genômico de PAO1 PA0657::GmR I; 7) Controle positivo (DNA genômico de PAO1); 8) DNA genômico de PAO1 PA0657::GmR II; 9) Controle negativo (reação de PCR sem DNA). 10, 11, 12 e 13) PCR utilizando *primers* pVicI-pVicII. 10) DNA genômico de PAO1 PA0657::GmR I; 11) Controle positivo (DNA genômico de PAO1); 12) DNA genômico de PAO1 PA0657::GmR II; 13) Controle negativo (reação de PCR sem DNA).

Os transformantes submetidos a PCR utilizando os *primers* p20 e p21, que gera um amplicon de 803 pb referente ao tamanho de fragmento de DNA de *P. aeruginosa* empregado

na construção do plasmídeo pJL02, não apresentaram amplificação. Para esse par de *primers* avaliado, apenas a amostra de DNA genômico de *P. aeruginosa* O1, utilizada como controle de que a PCR foi realizada de forma adequada, apresentou positividade para amplificação, amplificando um fragmento de tamanho esperado. Este resultado era esperado uma vez que, havendo integração do plasmídeo, o amplicon obtido por esta PCR teria um tamanho superior a 6000 pb, não sendo amplificado em função do tempo de extensão da reação de PCR.

Já os *primers* p40-p41 e pVicI-pVicII amplificaram, respectivamente, um fragmento de DNA de 771 pb e 600 pb. O conjunto p40-p41 evidenciou positividade para as duas amostras testadas e para o controle, mostrando que a ruptura gênica ocorreu no sítio específico do gene PA0657 e, portanto, essa região ficou inalterada em relação a linhagem PAO1 padrão.

O conjunto pVicI-pVicII são *primers* específicos para o gene *algD* de *P. aeruginosa*, não estando relacionados ao evento de recombinação homóloga proposto. Os resultados de positividade obtidos para todos os testes realizados demonstram que todos os clones recombinantes são oriundos da mesma espécie da bactéria a qual foi submetida à recombinação homóloga. Esse conjunto de primers foi utilizado como controle de reação de PCR para os clones positivos para a ruptura por recombinação homóloga do gene PA0657.

A obtenção de uma considerável taxa de transformantes rompidos nesse estudo evidenciou a aplicabilidade do plasmídeo pKnockout G para os fins propostos, corroborando estudo realizado por Windgasse e colaboradores (2000), que desenvolveram um método a fim de inativar segmentos gênicos específicos em *P. aeruginosa*, por meio da construção de um plasmídeo denominado pKnockout, que permite que a ruptura de ORFs ocorra por recombinação homóloga, por meio da integração do plasmídeo dentro do gene alvo cromossomal.

A habilidade do plasmídeo pKnockout G em integrar-se ao cromossomo de bactérias Gram-negativas também foi avaliada por outros estudos. Quin e colaboradores (2007) empregaram o plasmídeo em questão na inativação de um gene responsável pela síntese do poliéster polihidroxicanoato em *Aeromonas hydrophila* e obtiveram sucesso na construção de um mutante, permitindo avaliar o comportamento desta bactéria na produção de polihidroxicanoatos com propriedades biodegradáveis e confirmando a funcionalidade do vetor em questão.

Uma particularidade evidenciada nos clones que apresentaram o segmento gênico PA0657 rompido (PAO1 PA0657::GmR I e PAO1 PA0657::GmR II), foi a ausência de produção do pigmento piocianina, responsável por conferir a coloração característica desta espécie bacteriana, quando crescidos em meio de cultura seletivo cetrimida (Figura 24).



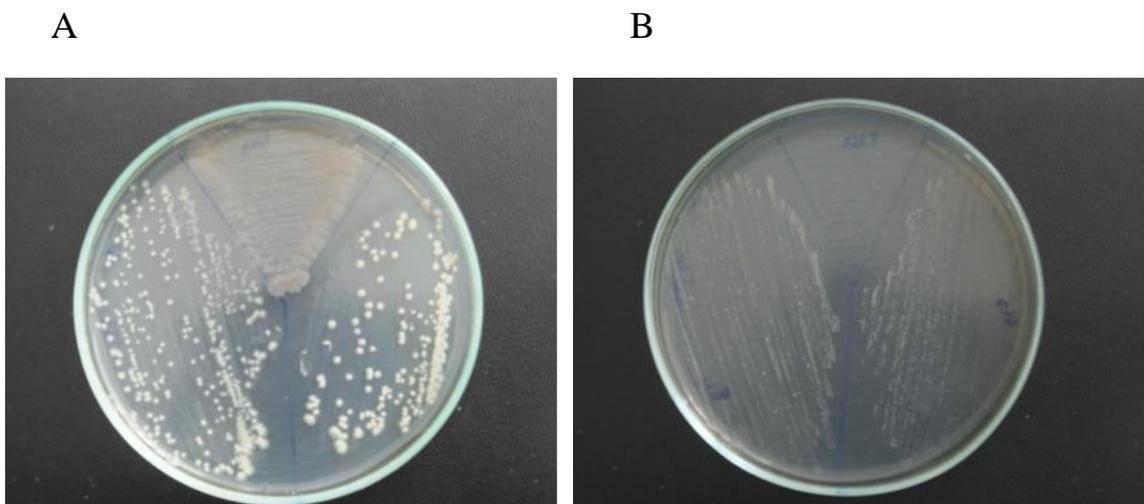
**Figura 24.** Isolado de *P. aeruginosa* O1 selvagem apresentando colônias verdes devido à produção de piocianina e os dois isolados que apresentaram ruptura gênica do segmento gênico PA0657, crescidos em meio cetrimida.

O meio de cultura cetrimida é utilizado para o isolamento seletivo e identificação de *P. aeruginosa*, promovendo a inibição do crescimento de microrganismos diferentes desta espécie bacteriana (Kodaka *et al.*, 2003). Contém, em sua composição, cloreto de magnésio e sulfato de potássio, que estimulam a produção do pigmento piocianina, correspondendo ao meio de cultura recomendado para a utilização em análises de cosméticos, fármacos e amostras clínicas (Isenberg, 2010).

Foi possível observar que, em meio de cultura cetrimida, todos os isolados apresentaram crescimento. Entretanto, somente a linhagem selvagem de *P. aeruginosa* O1 produziu o pigmento piocianina, sendo esta característica não observada entre os dois clones rompidos PAO1 PA0657::GmR I e PAO1 PA0657::GmR II.

Estes dois clones, que apresentaram ruptura do segmento gênico PA0657 foram

também avaliados quanto à capacidade de crescer em meio de cultura LB, na ausência ou presença de gentamicina (50 µg/mL) (Figura 25A e 25B).



**Figura 25.** A- Isolado de *P. aeruginosa* O1 selvagem, apresentando colônias verdes devido à produção de piocianina e os dois isolados que apresentaram ruptura gênica do segmento gênico PA0657, crescidos em meio de cultura LB. B- Isolado de *P. aeruginosa* O1 selvagem não apresentando crescimento e os dois isolados que apresentaram ruptura gênica do segmento gênico PA0657, crescidos em meio de cultura LB acrescido de gentamicina (50 µg/mL).

O mesmo perfil de crescimento foi obtido em meio de cultura LB, onde a produção do pigmento foi observada somente na linhagem selvagem, mas em menor quantidade que aquela avaliada em meio seletivo ceftrimida que, devido a elementos presentes na sua formulação, estimula a produção de piocianina (Isenberg, 2010).

Foram obtidos também os resultados esperados na avaliação do crescimento de *P. aeruginosa* O1 selvagem e dos transformantes pJL03 e pJL04 em meio LB contendo o antibiótico gentamicina (50 µg/mL). Nestas condições somente os mutantes que sofreram recombinação homóloga do gene PA0657 apresentaram crescimento na presença do antibiótico, em virtude da inserção cromossomal do gene de resistência a gentamicina, presente no plasmídeo pKnockout G.

A piocianina (1-hidroxi-5-metil-fenazina) é um composto fenazínico solúvel, que contribui para a virulência e persistência das infecções causadas por *P. aeruginosa* e tem sua

importância baseada em dois aspectos principais: na regulação dos genes de *quorum sensing* (Dietrich *et al.*, 2006) e como agente antimicrobiano, cuja ação ocorre devido à sua capacidade de ciclagem redox na presença de oxigênio, que gera superóxidos como o  $O_2^{-2}$  e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), altamente tóxicos para várias bactérias. (Liu *et al.*, 2012; Mavrodi *et al.*, 2001).

A biossíntese de piocianina por culturas de *P. aeruginosa* é um evento bastante complexo; sua síntese ocorre no início da fase estacionária, sendo regulada por enzimas codificadas pelos operons *phzABCDEFG* e pelos genes *phzM* e *phzS*. A *P. aeruginosa* O1 apresenta dois cromossomos homólogos, designados *phzA1B1C1D1E1F1G1* e *phzA2B2C2D2E2F2G2*, essenciais na síntese do composto fenazina-1-carboxilato, e dois genes adicionais (*phzM* e *phzS*) responsáveis por codificar enzimas envolvidas na conversão de fenazina-1-carboxilato em piocianina (Mavrodi *et al.*, 2001; Nowroozi *et al.*, 2012).

Presume-se, por meio de dados obtidos em nosso estudo, que o segmento gênico PA0657 possa estar relacionado à produção do pigmento piocianina, uma vez que verificou-se a ausência do pigmento nas linhagens que sofreram ruptura por recombinação homóloga, quando crescidas meio de cultura.

Em estudo recente, Nowroozi e colaboradores (2012) avaliaram a produção de piocianina por *P. aeruginosa* isolada de amostras clínicas e ambientais e observaram que, dentre os isolados clínicos analisados, apenas 3 (6.25%) não apresentaram a produção do pigmento em meio cetrimida devido, provavelmente, à ausência dos genes *phzM* e *phzS*. Neste estudo, os isolados foram submetidos à técnicas moleculares onde observou-se que, dentre as cepas não produtoras de piocianina, duas não apresentavam as bandas correspondentes aos genes *phzM* e *phzS* e uma, embora apresentasse um fragmento relacionado ao gene *phzM*, não apresentou a banda de proteína correspondente, quando avaliada em SDS-PAGE. Em relação às amostras ambientais, todas apresentaram amplificação dos genes *phzM* e *phzS* e bandas de proteínas equivalentes.

Alguns estudos realizados identificaram situações que interferem na produção de piocianina. Chang *et al.* (2005) verificaram que em situações de estresse oxidativo, decorrentes da produção de peróxido de hidrogênio durante a resposta imunológica do hospedeiro, *P. aeruginosa* aumenta a síntese de piocianina, potencializando sua patogenicidade.

Prithiviraj *et al* (2005) avaliaram os efeitos exercidos pelo ácido salicílico na síntese de piocianina e observaram que este composto fenólico, quando presente respectivamente em concentrações de 0,1 mM a 1,0 mM, é capaz de inibir entre 50 a 80% a produção do pigmento, sem interferir no crescimento do microrganismo.

Em outro estudo realizado, foram utilizadas uma linhagem de *P. aeruginosa* PA14 selvagem e uma linhagem de *P. aeruginosa* PA14 apresentando uma deleção correspondente a 209 aminoácidos na região codificadora do gene *kerV*, envolvido na virulência da bactéria. Observou-se que o mutante construído apresentou níveis alterados na produção de piocianina, sugerindo que o gene em estudo, regulado via sistema de percepção de *quorum sensing*, está relacionado com o fenótipo observado. Foi evidenciado também que a proteína KerV é co-expressa com as chaperoninas GroEL/GroES em baixas temperaturas propondo que, para atingir sua conformação nativa, ela necessita da participação dessas proteínas acessórias (Meirelles, 2011).

Conforme resultados obtidos a partir da análise da região promotora do gene PA0657, é possível verificar que existe uma grande possibilidade de que a função deste gene esteja associada a transcrição de proteínas específicas em resposta a condições de estresse celular.

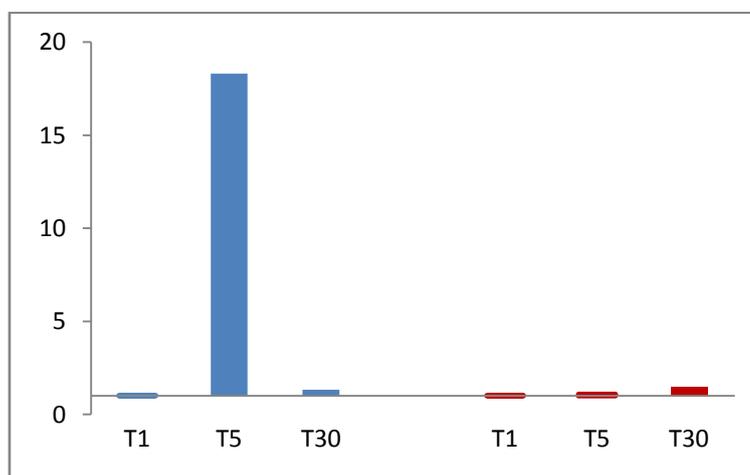
### **5.5 Avaliação da Expressão de Genes Envolvidos na Resposta a Condições de Estresse Celular em *P. aeruginosa* O1**

Análises realizadas por meio da técnica de qRT-PCR avaliaram os níveis de expressão de genes de resposta a condições de estresse celular em PAO1 e na linhagem rompida PAO1 PA0657::GmR I, antes, 5 e 30 minutos após a submissão dessas células à temperatura de estresse de 50 °C .

A técnica de qRT-PCR apresenta a vantagem de determinar o número de cópias de uma molécula molde com alta precisão e sensibilidade, sendo amplamente aplicada na análise da expressão gênica (Cikos & Koppel, 2009; Vandecasteele *et al.*, 2001). Essa análise é realizada por meio de quantificações absolutas, cujo objetivo é descobrir propriedades intrínsecas de uma determinada amostra, e quantificações relativas, que visam à determinação da proporção relativa de um ácido nucleico alvo em uma quantidade equivalente da amostra (Eleaume & Jabbouri, 2004).

As quantificações relativas são aplicadas com frequência em estudo de expressão gênica e necessitam de um gene de referência como normalizador da reação, chamado de controle interno (Vandesompele *et al.*, 2002). Neste trabalho, foi utilizado como normalizador da reação o gene 16S rRNA, já que o mesmo foi reportado em diversos trabalhos como sendo ideal para estudos de expressão de genes, uma vez que este apresenta expressão constitutiva e não sofre alterações em seus níveis de expressão quando submetidos às condições de estresse celular (Greisen *et al.*, 1994; Vandecasteele *et al.*, 2001, Vaudaux *et al.*, 2002).

Em um primeiro momento decidiu-se avaliar a expressão do gene em estudo PA0657 em ambas as linhagens de *P. aeruginosa*, imediatamente antes e em dois tempos distintos após o evento do choque térmico. Observou-se que, na linhagem selvagem de *P. aeruginosa* O1, o gene PA0657 apresentou um elevado pico de expressão no tempo de 5 minutos após o choque térmico, com um aumento de cerca de 20 vezes em relação à sua expressão inicial, imediatamente antes do choque térmico, retornando aos níveis basais em 30 minutos após cessada a condição de estresse, o que sugere que a função deste gene está fortemente vinculada à transcrição de proteínas associadas à situações de estresse celular. Já na linhagem rompida PA0657::GmR I, o gene em estudo apresentou-se inexpressivo, nos tempos avaliados (Figura 26).



**Figura 26:** Expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) do gene PA0657 em resposta ao choque térmico de 50 °C.

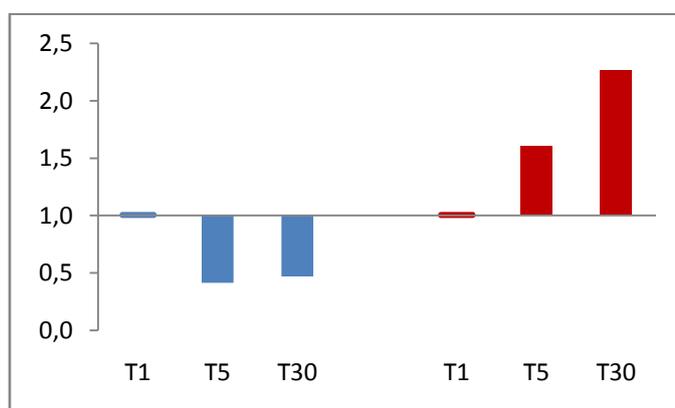
A resposta ao choque térmico corresponde a um evento muito bem elucidado em alguns procariotos, sendo caracterizado por um rápido e transitório aumento na síntese de um conjunto específico de proteínas, conhecidas como *heat-shock protein* (HPS). Este conjunto de proteínas é constituído principalmente por chaperonas e proteases, as quais são transcritas quando as células bacterianas são expostas a temperaturas elevadas e sua função é proteger estas células dos principais efeitos do estresse térmico, representados pela geração e acúmulo de proteínas desnaturadas (Rosen & Ron, 2002; Ptovin *et al.*, 2008).

Após condições de estresse térmico ocorre indução de um conjunto de genes, denominados genes de resposta a choque térmico, expressos constitutivamente sob condições normais e organizados em diferentes classes que podem ser reguladas por um fator sigma alternativo, um ativador ou um repressor transcricional (Schumann, 2003).

Em bactérias Gram-negativas, a expressão de genes de choque térmico é controlada em nível transcricional principalmente por mecanismos que utilizam os fatores  $\sigma^{32}$  e  $\sigma^E$ , responsáveis por direcionar a RNA polimerase aos promotores dos genes de choque térmico (Narberhaus, 1999).

Em *P. aeruginosa*, o fator de choque térmico  $\sigma^{32}$ , codificado pelo gene *rpoH*, apresenta alta similaridade como  $\sigma^{32}$  de *E. coli*, que transcreve chaperonas moleculares que incluem o complexo DnaK/DnaJ, e proteases como a FtsH (Potvin *et al.*, 2008).

Dessa forma avaliou-se, nesse estudo, os níveis de expressão do gene *rpoH* nas condições propostas, tornando-se possível observar um comportamento bastante distinto entre a linhagem selvagem PAO1 e a linhagem rompida PA0657::GmR I (Figura 27).

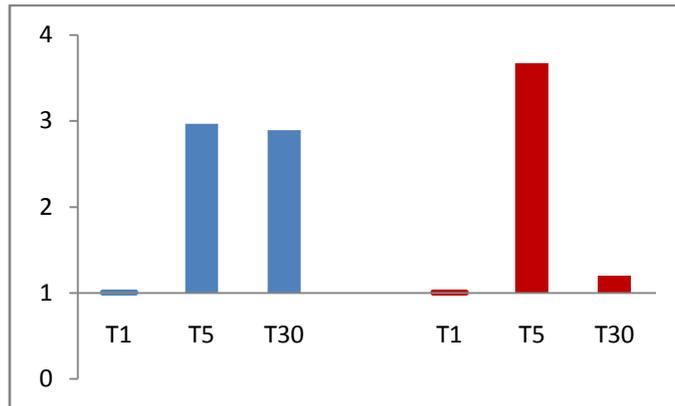


**Figura 27:** Expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) do gene *rpoH* em resposta ao choque térmico de 50 °C.

Em *P. aeruginosa*, observa-se níveis aumentados de transcrição de *rpoH* logo após a exposição das células bacterianas à temperaturas elevadas, com o objetivo de transcrever proteínas de choque térmico que desempenham papel importante de chaperonas moleculares. À medida que se tem chaperonas livres, o gene *rpoH* é direcionado para proteólise que, em *E. coli*, é mediada por ação da protease FtsH (Potvin *et al.*, 2008). Acredita-se que, conforme observado na figura 28, a ausência de expressão do gene *rpoH* na linhagem selvagem PAO1, nos tempos de 5 e 30 minutos, se deve ao fato do fator  $\sigma^{32}$ , responsável por regular a transcrição deste gene, ter sido degradado pela proteína transcrita pelo gene PA0657 de *P. aeruginosa*, que exerce função semelhante à protease FtsH de *E. coli*. Já, na linhagem rompida PAO1 PA0657::GmR I, a superexpressão do gene *rpoH* observada está associada, provavelmente, a ausência da protease FtsH. Esses dados corroboram com resultados reportados por Perrody e colaboradores (2012) que evidenciaram que o gene *057w* de *E. coli* transcreve uma proteína responsável por se ligar à chaperona DnaK, levando a aumento de fator  $\sigma^{32}$  livre e impedindo que a chaperona seja degradada por ação da protease FtsH.

Entre os genes avaliados nesse trabalho, dois deles correspondem a chaperonas moleculares que exercem função importante no enovelamento de proteínas e reparo estrutural, sendo altamente expressas em condições de estresse: *dnaK* (e sua chaperonina *dnaJ*) e *groEL* (e sua chaperonina *groES*) (Schumann, 2007).

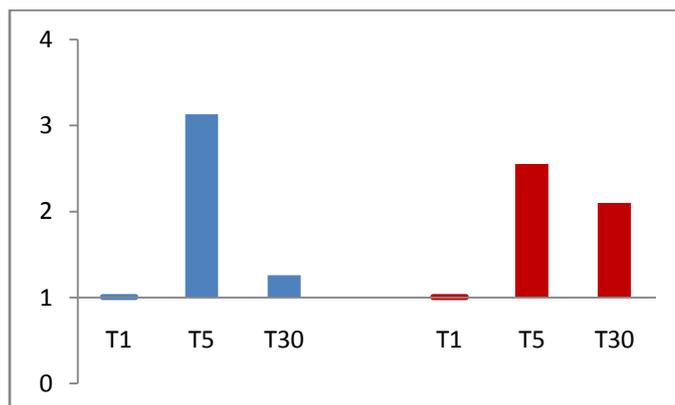
Para os genes *dnaK*, *dnaJ*, *groEL* e *groES*, um comportamento bastante semelhante foi observado. Verificou-se que, na linhagem selvagem PA O1, o gene *dnaK* apresentou um aumento de expressão cerca de 3,0 vezes maior no tempo de 5 minutos e manteve esses níveis de expressão em 30 minutos após o choque térmico. Já para a linhagem rompida PA0657::GmR I, observou-se um pico de expressão gênica no tempo de 5 minutos e um retorno ao nível basal 30 minutos após à condição de estresse celular (Figura 28).



**Figura 28:** Expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) do gene *dnaK* em resposta ao choque térmico de 50°C.

A proteína DnaK corresponde à chaperona que apresenta maiores índices de expressão nas células e, apesar de serem denominadas proteínas de choque térmico e exibirem picos de expressão sob condições de estresse, são também expressas em condições normais (Wang *et al.*, 2004).

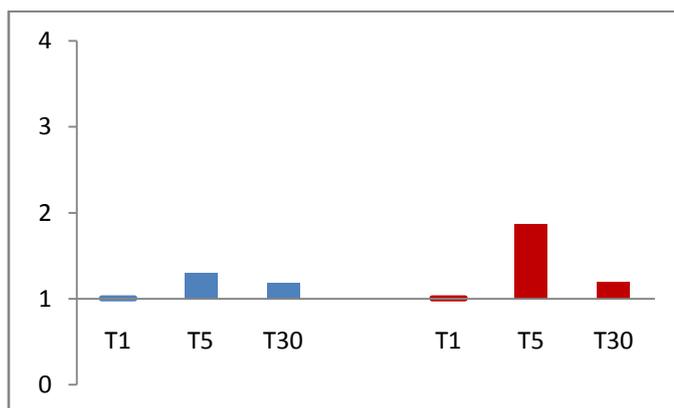
Avaliando a expressão do gene *dnaJ* na linhagem selvagem PAO1, foi possível observar que houve um aumento na expressão gênica no tempo de 5 minutos e um retorno basal nos níveis de expressão decorridos 30 minutos do choque térmico. Já na linhagem rompida PA0657::GmR I observa-se que a expressão do gene *dnaJ* se elevou em 5 minutos e manteve-se constante (Figura 29).



**Figura 29:** Expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) do gene *dnaJ* em resposta ao choque térmico de 50°C.

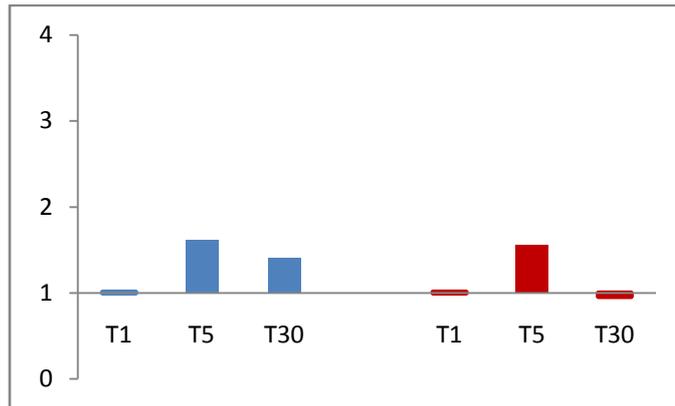
Um fato importante a ser observado é que, enquanto DnaK, em PAO1, continua sendo expressa em 30 minutos, sua chaperonina, DnaJ, apresenta expressão reduzida neste mesmo tempo. Na linhagem rompida, constatou-se que houve um retorno a níveis basais de expressão da chaperona DnaK após 30 minutos de choque térmico, enquanto sua chaperonina manteve um nível de expressão em 30 minutos próximo ao observado no tempo de 5 minutos. É possível sugerir que a chaperonina DnaJ pode exercer um papel de regulação negativa sobre os níveis de expressão de DnaK.

Os genes *groEL* e *groES* apresentaram comportamentos similares, sendo possível observar uma expressão gênica elevada de *groEL* apenas na linhagem rompida PA0657::GmR I, no tempo de 5 minutos. Observa-se que, nesse mesmo tempo, a linhagem selvagem PAO1 apresenta uma pequena indução na expressão gênica e que, para ambas as linhagens, houve uma diminuição gradativa na expressão no gene *groEL* até o tempo de 30 minutos (Figura 30).



**Figura 30:** Expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) do gene *groEL* em resposta ao choque térmico de 50°C.

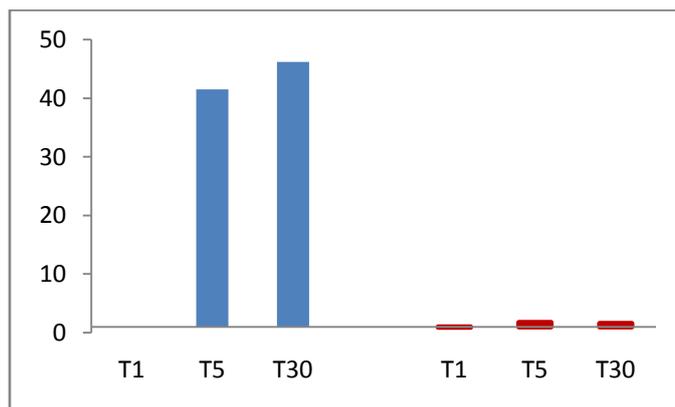
O gene *groES*, por sua vez, apresentou um padrão de expressão gênica bastante similar entre as duas linhagens avaliadas, em ambos os tempos. No entanto, observa-se que, na linhagem selvagem PAO1, a expressão se mantém constante no tempo de 30 minutos enquanto que, para a linhagem rompida PA0657::GmR I, após transcorrido esse tempo, a expressão do gene retorna aos níveis basais (Figura 31).



**Figura 31:** Expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) do gene *groES* em resposta ao choque térmico de 50°C.

Sabe-se que, em *P. aeruginosa*, o gene *algU* foi inicialmente identificado por sua importância na conversão do fenótipo não-mucóide para mucóide em infecções associadas a pacientes com fibrose cística.

Dessa forma, analisando os níveis de expressão do gene *algU*, observou-se que, dentre todos os genes avaliados nesse trabalho, esse foi o que apresentou os mais altos níveis de expressão, tendo sua expressão induzida apenas na linhagem selvagem PA O1 e somente após condições de estresse celular (figura 32). Observa-se que, na linhagem selvagem, os níveis de expressão do gene *algU* aumentaram de forma expressiva e gradativa em todos os tempos avaliados, evidenciando a relação entre os genes *AlgU* e PA0657 em *P. aeruginosa* O1.



**Figura 32.** Expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) do gene *algU* antes e após a exposição da linhagem selvagem PA0657 e da linhagem rompida PA0657::GmR à estresse térmico de 50°C.

Em infecções provocadas por *P. aeruginosa*, que acometem principalmente portadores de fibrose cística, observa-se que a bactéria é capaz de sofrer alterações genótípicas e fenotípicas com o objetivo de ampliar seu grau de patogenicidade, por meio da conversão do fenótipo não- mucóide (Alg<sup>-</sup>) em mucóide (Alg<sup>+</sup>) (Sautter *et al.*, 2012).

Em situações de estresse oxidativo ou choque térmico, o gene *algU* estimula a síntese do polissacarídeo alginato, responsável pela característica mucóide observada nos isolados de *P. aeruginosa*. Esse gene apresenta alto grau de homologia com o fator  $\sigma^E$  de *E. coli* e *S. typhimurium* onde, nesses microrganismos, este fator sigma está envolvido com a resposta ao choque térmico e com a transcrição de proteínas associadas às condições de estresse que ocorrem fora do citoplasma das células bacterianas, conhecidas como resposta ao estresse extracitoplasmático (Sautter *et al.*, 2012; Rowley *et al.*, 2006).

Keith & Bender (1999) demonstraram que o gene *algU* de *P. syringae* é induzido em situações de estresse ambiental, que incluem o evento de choque térmico e estresses osmótico e oxidativo.

Avaliando os resultados obtidos na análise da expressão do gene *algU* e considerando que, dentre os genes aferidos, *algU* foi o que apresentou maiores níveis de expressão em todos os tempos estimados, correspondendo ao único gene que permaneceu com sua expressão induzida transcorridos 30 minutos de exposição do microrganismo ao estresse celular por choque térmico, é possível concluir que o gene PA0657 exerce grande influência na transcrição de *algU*, sendo esta estimulada em resposta ao choque térmico.

Associando os níveis de expressão do gene *algU* na linhagem selvagem PAO1e na linhagem rompida PA0657::GmR I com as características observadas na figura 25, torna-se possível uma melhor compreensão da ausência do fenótipo mucóide entre as linhagens que apresentaram ruptura do segmento gênico PA0657.

Em *P. aeruginosa*, a conversão para o fenótipo mucóide de ampla virulência pode ser alcançada por meio de dois mecanismos. O primeiro consiste na proteólise de MucA, que corresponde a uma proteína de membrana que atua regulando de forma negativa a produção de alginato por meio da inativação do gene *algU*. Já o segundo mecanismo responsável pela característica mucóide está associado a mutações no gene *mucA*, sendo esse mecanismo prevalente em isolados provenientes de infecções pulmonares crônicas isoladas de pacientes com fibrose cística (Yin *et al.*, 2013).

Em nosso trabalho, foi possível observar que a linhagem selvagem PAO1 não apresentou níveis significativos de expressão de *rpoH* após 5 minutos de exposição à condição de estresse térmico mas, em contrapartida, níveis elevados de expressão para o gene *algU* foram constatados nesta mesma linhagem. Diante dos resultados apresentados, há fortes indícios de que a proteína PA0657 de *P. aeruginosa* desempenha um papel importante, atuando como uma protease pertencente à família AAA<sup>+</sup>, com grande afinidade pelo fator  $\sigma^{32}$ , além de participar de forma efetiva na conversão do fenótipo mucóide de *P. aeruginosa*, após situações de estresse celular. Isto por si só gera uma nova perspectiva de estudo no que tange a interação molecular entre *algU* e PA0657.

## 6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho foi possível concluir que:

- A análise da sequência reguladora do gene PA0657 empregando o programa BacPP indica que a transcrição deste gene é mediada pelo fator  $\sigma^{32}$  com uma probabilidade superior a 70%, sendo portanto expresso em condições de estresse.
- A análise de bioinformática da proteína PA0657 revelou a presença de domínios conservados característicos de proteínas da família AAA<sup>+</sup>, apresentando alta similaridade com a proteína FtsH de *E. coli*, envolvida na modulação de genes de resposta a choque térmico.
- A enzima PA0657 recombinante apresenta capacidade de hidrolisar ATP na presença de íons  $Zn^{2+}$ , sendo assim caracterizada como uma ATPase  $Zn^{2+}$  dependente.
- Existe uma relação direta ou indireta entre o produto gênico de PA0657 e a síntese do pigmento piocianina e a conversão do fenótipo mucóide em *P. aeruginosa* O1.
- A avaliação da expressão gênica sugere que o gene PA0657 de *P. aeruginosa* transcreve, em resposta a estresse térmico, uma proteína que afeta a expressão dos genes *rpoH* e *algU*, responsáveis pela síntese do fator  $\sigma^{32}$  e  $\sigma^{22}$ .

## **7. PERSPECTIVAS**

- Avaliar a reversão do fenótipo não-mucóide da linhagem PA0657::GmR I por meio de transformação genética com plasmídeo contendo o gene selvagem de PA0657
- Estudar a interação molecular de AlgU com PA0657.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adam, Z.; Ostersetzer, O. Degradation of unassembled and damaged thylakoid proteins. (2001). **Biochemical Society Transactions**, 29(4): 427-430.
- Alix, E.; Blanc-Potard A.B. (2008) Peptide-assisted degradation of the *Salmonella* MgtC virulence factor. **EMBO. J.** 27 (3): 546-557.
- Anilkumar, G.; Srinivasan, R.; Ajitkumar, P. (2004). Genomic organization and in vivo characterization of proteolytic activity of FtsH of *Mycobacterium smegmatis* SN2. **Microbiol.**, 150(8):2629-39.
- Aramaki, H., Fujita, M. (1999). In vitro transcription analysis of rpoD in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Fems Microbiol Lett**, 180:311-316.
- Arsene, F.; Tomoyasu, T.; Bukau, B. (2000). The heat shock response of *Escherichia coli*. **Int. J. Food. Microbiol.** 55: 3-9
- Backer, M.J.; Mooga, V.P; Guiard, B.; Langer, T.; Ryan, M.T.; Stojanovski, D. (2012) Impaired folding of the mitochondrial small TIM chaperones induces clearance by the i-AAA protease. **J Mol Biol**, 424(5):227-39.
- Ball, C.A.; Dolinsky, K., Dwight, S. S.; Harris, M.A.; Issel-tarver, L.; Kasarskis, A.; Scafe, C. R.; Sherlock, G., Binkley, G.; Jin, H.; Kaloper, M.; Orr, S.D.; Schroeder, M.; Weng, S.; Zhu, Y.; Botstein, D., Cherry, J. M. (2000) Integrating functional genomic information into the *Saccharomyces* genome database. **Nucleic Acids Res.**, 28: 77-80.
- Bandyopadhyay, K.; Parau, P.K.; Datta, A.B.; Parrack, P. (2010). *Escherichia coli* HflK and HflC can individually inhibit the HflB (FtsH)-mediated proteolysis of lambdaCII in vitro. **Arch Biochem Biophys.** 501(2): 239-43.
- Bever, R.A.; Iglewski, B.H (1988). Molecular characterization and nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* elastase structural gene. **J Bacteriol.** 170(9): 4309–4314.
- Biederbick, A.; Kosan, C.; Kunz, J.; Elsasser, H.P (2000). First apyrase splice variants have different enzymatic properties. **J Biol Chem**, 275:19018-19024.
- Bieniossek, C.; Niederhauser, B.; Baumann U.M. (2009). The crystal structure of apo-FtsH reveals domain movements necessary for substrate unfolding and translocation. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** 106: 21579-21584.
- Blondel, H., E.; Henry, D.A.; Speert, D.P. (2007). *Pseudomonas*. In PR Murray, EJ Baron, JH Tenover, ML Tenover, ML Landry, MA Tenover, MA Tenover, **Manual of clinical microbiology**, ASM press, Washington DC, 734-748.

- Botzenhart, K.; Doring, G. (1993) Ecology and epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*. In A. Campa M, Bendinelli M, Friedman H. (ed) *Pseudomonas aeruginosa* as a opportunistic pathogen. **New York, Plenum Press**, 1-13.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, 72: 248-254.
- Bryan, L. E.; Kureishi, A; Rabin, H. R. (1983) Detection of antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* alginate extracellular polysaccharide in animals and cystic fibrosis patients by enzyme-linked immunosorbent assay. **J. Clin. Microbiol.**,18: 276-282..
- Burgess, R.; Travers, A.A.; Dunn, J.J; Bautz, E.K. (1969). Factor stimulating transcription by RNA polymerase. **Nature Rev. Microbiol.** 221:43-46.
- Burns, F. R. et al. (1990) Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* elastase and *Pseudomonas keratitis* using a thiol-based peptide. **Antimicrob. Agents Chemoter.**, 34:2065-2069,.
- Buck, M.; Gallegos, M.T.; Studholme, D.J; Guo, Y.; Gralla, J.D. (2000) The bacterial enhancer-dependent  $\sigma^{54}$  ( $\sigma^N$ ) transcription factor. **J. Bacteriol.** V.182: 4129-4136.
- Chan, K., Delfert, D., Junger, K .D. A (1986). Direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup> -stimulated ATPase activity. **Anal. Biochem.**,157:375-380.
- Chang, W.; Small, D.A.; Toghrol, F.; Bentley, W.E. (2005). Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* reveals induction of pyocin genes in response to hydrogen peroxide. **BMC Genomics** 6:1-14.
- Chen, W. P.; Kuo, T. T. (1993). A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. **Nucleic Acids Res.**, 21: 2260.
- Chennubhotla, C., & Bahar, I. (2006). Markov propagation of allosteric effects in biomolecular systems: application to GroEL-GroES. **Mol Syst Biol** 2, 36.
- Cikos, S. & Koppel, J. (2009). Transformation of real-time PCR fluorescence data to target gene quantity. **Anal. Biochem.** (Review). 384: 1–10.
- Dietrich, L.E.P.; Whelan, A.P.; Petersen, A.; Whiteley, M.; Newman, D.K. (2006). The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular Microbiology**, 61(5): 1308-1321.
- Dong, F.; Xu, X.V.; Song, W.Q.; P, Lu; Yu, S.J; Shen, X.Z.(2008). Characterization of multidrug-resistance and metallo-beta-lactamase-proucing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a paediatric clinic in China. **Chinese Medical Journal**, 121: 1611-1616.

Driegen, S.; Ferreira R.; Van Zon, A.; Strouboulis J.; Jaegle, M.; Grosveld, F.; Philipsen, S.; Meijer, D. (2005). A generic tool for biotinylation of tagged proteins in transgenic mice. **Transgenic Research**, 14(4):477-482.

Eleaume, H.; Jabbouri, S. (2004) Comparison of two standardization methods in real-time quantitative RT-PCR to follow *Staphylococcus aureus* genes expression during in vitro growth. **J. Microbiol.** 59:363-370.

Fenton, W..A; Horwich, A.L. (2003). Chaperonin-mediated protein folding: fate of substrate polypeptide. **Q Rev Biophys** 36(2):229-256

Ferreira, L. L.(2005). **Estrutura Clonal e Multirresistência em *Pseudomonas aeruginosa***. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Fundação Osvaldo Cruz, São Paulo.

Franklin, M.J; Nivens, D.E.; Weadge, J.T; Howell, P.L (2011). Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, alginate, PeI and PsI. **Frontiers in Microbiology**, 2:167 1-16.

Frost, LS.; Leplae, R.; Summers, A.O; Toussaint, A. (2005). Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol.* 3(9):722-32

Gillardi GL. (1981). *Pseudomonas aeruginosa*: The organism, diseases it causes, and their treatment. **Postgrad Med J.** 57(667): 339–340

Greisen, K.; Loeffelholz, M.; Purohit, A. & Leong, D. (1994) PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. **J. Clin. Microbiol.** 32 (2): 335-351.

Grigorova, I.L; Phleger, N.J.; Mutalik, V.K; Gross, C. A. (2006). Insights into transcriptional regulation and sigma competition from an equilibrium model of RNA polymerase binding to DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 103: 5332-5337.

Guisbert,E.;Herman, C.; Lu, C. Z.; Gross, C. A.(2004). A chaperone network controls the heat shock response in *E. coli*. **Genes e Development**, 18(22):2812-2821.

Gruber, T.M.; Gross, C.A. (2003). Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. **Annu. Rev. Microbiol.** 57:441-466..

Hanson, P. I., and Whiteheart, S. W. (2005). AAA+ proteins: have engine, will work. **Nat Rev Mol Cell Biol** 6:519-529..

Hasset, D.J.; Charniga, L.; Bean, K.; Ohman, D.E.; Cohen, M.S (1992).Response of *Pseudomonas aeruginosa* to pyocyanin: mechanisms of resistance, antioxidant defenses and demonstration of a manganese-cofactored superoxide dismutase. **Infect Immun**, 60(2): 328-336.

- Head, N.E; Yu, H. (2004). Cross-sectional analysis of clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: biofilm formation, virulence and genome diversity. **Infect. Immun.**, 72: 133-144.
- Heck, L. W.; Morihara, K.; McRae, W. B.; Miller, E. J. (1986). Specific cleavage of human type III and IV collagens by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. **Infect Immun**, 51: 115-118.
- Hellmann, J.D. (2002). The extracytoplasmatic function (ECF) sigma factors. **Adv. Microb. Physiol.** 46:47-110.
- Henderson A, Kelly W, Wright M. (1992). Fulminant primary *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia and septicaemia in previously well adults. **Intensive Care Med.** 18(7):430-432.
- Hentzer, M.L.; Wu, J.B.; Andersen. B. (2003) Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. **EMBO J.** 22:1-13
- Hogardt M, Schmoldt S, Gotzfried M, Adler K, Heesemann J.(2004). Pitfalls of polymyxin antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients. **J Antimicrob Chemother.** 54: 1057–1061.
- Holloway, B.W.; Krishnapillai, V.; Morgan, A.F. (1979) Chromosomal genetics of *Pseudomonas*. **Microbiol. Rev.** 43: 73-110
- .
- Inwood, W.B.; Hall, J.A.; Kim, K.S; Demirkhanyan, L.; Wemmer, D.; Zgurskaya, H.; Kustus, S. (2009). Epistatic Effects of the Protease/Chaperone HflB on Some Damaged Forms of the Escherichia coli Ammonium Channel AmtB. **Genetics**, 183(4): 1327–1340.
- Ito, K.; Akyyana, Y. (2005). Cellular functions, mechanism of action, and regulation of FtsH protease. **Annu Rev Microbiol**, 59:211-31.
- Japoni, A.; Farshad, S.; Alborzi, A. (2009). *Pseudomonas aeruginosa*: Burn infection, treatment and antibacterial resistance. *Iran Red Crescent. Med. J.*, 11: 244-253
- Karata, K.; Inagawa, T.; Wilkinson, A.J; Tatsuta, T.; Ogura, T. (1999). Dissecting the role of a conserved motif (the second region of homology) in the AAA family of ATPases. **Jorn. of Biol. Chemis.** 271: 26225-26232.
- Kazmierczak, M.J.; Wiedmann, M.; Boor, K. J. (2005). Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 69:527-543.
- Karlberg, T.; van den Berg, S.; Hammarstrom M.; Sagemark, J.; Johansson, I.; Holmberg-Schiavone, L.; Schuler, H. (2009). Crystal structure of the ATPase domain of the human AAA+ protein paraplegin/SPG7., **PLOS ONE** 4(10): e6975 doi: 10.1371 /journal. pone. 0006975.

Kieffer, F. The Swiss-Model repository and associated resources. (2009). **Nucleic Acids Research**. 37: 387-392.

Kihara A; Akiyama Y; Ito K (1997). Host regulation of lysogenic decision in bacteriophage lambda: transmembrane modulation of FtsH (HflB), the cII degrading protease, by (HflA) 94:5544–5549. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 94(11):5544-5549.

Kindrachuk, K.N.; Fernandez, L.; Bains, M.; Hancock, R.E (2011). Involvement of an ATP-dependent protease (PA0779/AsrA) in inducing heat shock in response to tobramycin in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob. Agents Chemother**. 55: 1874–1882

Kipnis, E.; Sawa, T.; Wiener-Kronish, J. (2006). Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. **Med. et Maladies Infect**. 36: 78-91.

Kiska, O.L & Gillian, P.H. *Pseudomonas* (2003). In: Murray PR, Baron FJ, Pfaller MA, Tenoer FC, Tenover RH. **Manual of clinical microbiology**. 7th ed. American Society for Microbiology. Washington. 5:516-526..

Klockgether, J.; Munder, A.; Neugebauer, J.; Davenport, C.F.; Stanke, F.; Larbig, K.D.; Heeb, S.; Schock, U.; Phol, T.M. (2010). Genome Diversity of *Pseudomonas aeruginosa* PA01 Laboratory Strains. **J. Bacteriol**. 192: 1113-1121.

Knowles, M.R.; Stutts, M.J; Yankaskas, J.R.; Gatzky, J.T; Boucher, R.C. (1986). Abnormal respiratory epithelial ion transport in cystic fibrosis. **Clin. Chest Med**, 2: 285-297.

.

Kobayashi, Y.; Ohtsu, I.; Fujimura, M.; Fukumori, F. (2011). A mutation in dnaK causes stabilization of the heat shock sigma factor  $\sigma_{32}$ , accumulation of heat shock proteins and increase in toluene-resistance in *Pseudomonas putida*. **Environ Microbio**. 13(8):2007-17.

Kodaka H.; Iawat, M. Yumoto, S.; Kashitani, F. (2003). Evaluation of a new agar medium containing cetrimide, kanamycin and nalidixic acid for isolation and enhancement of pigment production of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples. **J Basic Microbiol.**; 43(5):407-13.

Kumari, A.; Mahapatra, P.; Banerjee, R. (2009). Static optimization of culture conditions by response surface methodology for synthesis of lipase with *Enterobacter aerogenes*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 52(6): 1349-1356..

Langer, T. AAA proteases: cellular machines for degrading membrane proteins. (2000) **Trends In Biochemistry Science**. 25(5):247-251

Langklotz, S.; Baumann, U.; Narberhaus, F. (2012) Structure and function of the bacterial AAA protease FtsH. **Biochim Biophys Acta**, 1823(1):40-8.

.

- Lautenback, E.; Weiner, M.G.; Nachamkin, I.; Bilker, W.B.; Sheridan, A.; Fishman, O. (2006). Imipenem resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates: Risk factors for infection and impact of resistance on clinical and economic outcomes. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, 27: 893-900.
- Levinson, D.F.; Duan, J.; Oh, S.; Wang, K.; Sanders, A.r.; Shi, J. (2011) Copy number variants in schizophrenia: confirmation of five previous findings and new evidence for 3q29 microdeletions and VIPR2 duplications. **Am J Psychiatry**; 168: 302-316
- Linares, J. F.; Gustafsson, I.; Baquero, F.; Martinez, J.L. (2006) Antibiotics as intermicrobial signalling agents instead of weapons. **PNAS**. 51: 19484-19489.
- Lincopan N.; Macculloch, J.A.; Cassettari, V.C.; Gales, A.C.; Mamizuka, E.M. (2004). In vivo activity of a novel amphotericin B formulation with synthetic cationic bilayer fragments. **J Antimicrob. Chemoter.** 43(1):516-9.
- Lipuma, J. J. (2010). The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. **Clin Microbiol Rev** 23(2): 299-323.
- Liu, J.; Qiao, Y.; Guo, C. X.; Lim, S.; Song, H.; Li, C. M.(2012) Graphene/carbon cloth anode for high-performance mediatorless microbial fuel cells. **Bioresource Technology**, 114: 275-280.
- Llamas, M.A.; Van der Sar, A.; Chu, B.C.; Sparrius, M.; H.J.; Bitter, W. (2009) A novel extracytoplasmatic function (ECF) sigma factor regulates virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. **Plos Pathogen** 5, e1000572.
- Loneto, M.A.; Brown, K.L.; Rudd, K.; Buttner, M. J. (1994). Analysis of the *Streptomyces coelicolor sigE* gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase sigma factors involved in the regulation of extracytoplasmatic functions. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 91:7573-7577.
- Losick, R.; Pero; J. (1981). Cascades of sigma factors. **Cell**, 25:582-584.
- Lupas, A. N.; Martim, J. (2002). AAA proteins. **Current Opinion in Structural Biology**, 12 (6):746-753.
- Manganelli, R.; Proveddi, R.; Rodrigue, S.; Beaucher, J.; Gaudreau, L.; Smith, I. (2004) s factors and global gene regulation in *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Bacteriol.**, 186 (4): 895-902, 2004
- Martin-satué, M., et al. (2007) Cloning molecular characterization and expression of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 from Torpedo electric organ. **Neuroche. Internat.**, 50: 256-263. .

Mavrodi, D.V.; Bonsall, R.F.; Delaney, S.M; Soule, M.J.; Phillips, G.; Thomashow, L.S. (2001). Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa*. **J. of Bacteriol.** 183(21):6454-6465.

Meirelles, D.A. (2011). Estudo da função do gene *kerV* de *Pseudomonas aeruginosa*. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de São Paulo.

Merino LA. (2007) *Pseudomonas aeruginosa*: a bacterium with multiple personalities. **Rev Argent Microbiol.** 39(3):143.

Millan, J.L. (2006) Alkaline Phosphatases: structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. **Purinergic Signal**, 2: 335-341.

Mittenhuber, G. (2002) An inventory of genes encoding RNA polymerase sigma factors in 31 completely sequenced eubacterial genomes. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.** 4:77-91.

Morimoto, R.I (1998). Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. **Genes Dev.** 12: 3788-3896.

Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W. (2006) Harper: **Bioquímica Ilustrada**. 26ed., ed. Atheneu, São Paulo.

Murray, T.S; Ledizet, M; Kazmierczak, B.I. (2010). Swarming motility, secretion of type 3 effectors and biofilm formation phenotypes exhibited within a large cohort of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. **J Med Microbiol** 59(5): 511-520.

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

Nowroozi, J.; Sepahi, A.A.; Rashnonejad, A. (2012). Pyocyanine biosynthetic genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and detection of pyocyanine's antimicrobial effects with or without colloidal silver nanoparticles. **Cell Journal**, 14(1): 7-18.

Ogura, T.; Wilkinson, A.J. AAA+ superfamily ATPases: common structure-diverse function. (2001). **Genes cells**, 6:575-597.

Overhage, J., Lewenza, S., Marr, A. K. & Hancock, R. E. (2007). Identification of genes involved in swarming motility using a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 mini-Tn5-lux mutant library. **J Bacteriol** 189: 2164–2169

..

Pátek, M.; Nesvera, J. (2011). Sigma factors and promoters in *Corynebacterium glutamicum*. **J. Biotechnol.** 154: 101-113.

Peng, S.Q.; Lu, H.Z; Guo, D. (2010). Cloning and Expression of a *HbHDT1* Gene from *Hevea brasiliensis*. **Chinese J. Trop. Crops**, 31:59-64.

Pérez-Rueda, E. & Collado-Videz, J. (2000). The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in *Escherichia coli* K12. **Nuc. Ac. Res.** 28(8): 1838-1847.

Prithiviraj, B.; Bais, H.P.; Weir, T.; Suresh, B.; Najarro, E.H.; Dayakar, B.V.; Scheweizer, H.P.S.; Vivanco, J.M. (2005) Down Regulation of Virulence Factors of *Pseudomonas aeruginosa* by Salicylic Acid Attenuates Its Virulence on *Arabidopsis thaliana* and *Caenorhabditis elegans*. **Infect. Immun.** 73(9): 5319-5328.

Polack M. (2000) *P. aeruginosa*. In: Mandell DaB, editor. Principles and Practice of Infectious Diseases. 5. New York: **Chuchill Livingstone**: 2310-2335.

Potvin, E.; Sanschagrín, F.; Levesque, R.C. (2008). Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS Microbiol. Rev.** 32:38-55.

Pulcrano, G.; Lula, D.V.; Rossano, F.; Catania, M.R. (2012). Different mutations in *mucA* gene of *Pseudomonas aeruginosa* mucoid strains in cystic fibrosis patients and their effect on *algU* gene expression. **New Microbiol**, 35(3):295-305.

Querido, A. L.S; Coelho, J.L.C; Araújo, E.F.; Chaves-Alves, V.M (2006). Partial purification and characterization of xylanase produced by *Penicillium expansum*. **Braz. arch. biol. technol.** 49(3):475-480.

Quin, L.F.; Gao, X.; Liu, Q.; Wu, Q; Che, G.Q. (2007) Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolyesters by *Aeromonas hydrophila* mutant expressing a low-substrate-specificity PHA synthase *PhaC2Ps*. **Biochem. Enginnerg. J.** 37:144-140.

Rappas, M.; Bose, D.; Zhang, X. (2006) Bacterial enhancer-binding proteins: unlocking  $\sigma^{54}$ -dependent gene transcription. **Curr. Opin. Struct. Opin.**, 17: 1-7.

Rodrigue, A.; Quentin, Y.; Ladzunsky, A.; Méjean, V.; Foglino, M.(2000) Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many? **Trends Microbial** 8: 498-504.

Rodrigue, S.; Prowed, R.; Jacques, P.; Gaudreau, L.; Manganelli, R. (2006). The  $\sigma$  factors of *Mycobacterium tuberculosis*. **FEMS Microbiol. Rev.** 30: 926-941.

Rosen, R.; Ron, E.Z. (2002). Proteome analysis in the study of the bacterial heat-shock response. **Mass Spectrom Rev** 21(4):244-65.

Rowley, G.; Spector, M.; Kormanec, J.; Roberts, M. (2006) Pushing the envelop: extracytoplasmatic stress response in bacterial pathogens. **Nat. Rev. Microbiol.** 4:383-394.

Sachdeva, P.; Misra, R.; Tyagi, A.K.; Singh, Y. (2009). The sigma factors of *Mycobacterium tuberculosis*: regulation of the regulators. **FEMS Journal**. 277:605-626.

Sader, H.S.; Gales, A.C., Pfaller, M.A. (2001). Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **BJID**. 5(4):201-213.

Santos, A.C.S. (2002) Estudo Semi-Empírico da Interação de 20-hidroxiecdisona e seus Agonistas Sintéticos com Modelos de Homologia de Receptores de Ecdisteróide (EcR). **Tese de Doutorado**, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Sautter, R.; Ramos, D.; Schneper, L.; Ciofu, O.; Wassermann, T.; Koh, C.; Heydon, A.; Hoiby, N; Kharazmi, A. Ohman, D.; Mathee, K. (2012). A complex multilevel attack on *Pseudomonas aeruginosa* algT/U expression and AlgT/U activity results in the loss of alginate production. **Gene** 498(2):. 242-253

Schuster MG, Norris AH. (1994). Community-acquired *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in patients with HIV infection. **AIDS**. 8(10): 1437-1441

Schumacher, J.; Joly, N.; Rappas, M.; Zhang, X.; Buck, M. (2006) Structures and organisation of AAA+ enhancer binding proteins in transcriptional activation. **J. Struct. Biol.**, 156 (1):190-199.

Schumann, W. (2003). The *Bacillus subtilis* heat shock stimulon. **Cell Stress Chaperones**. 8 (3), 207-217.

Schumann, W. Thermosensors in eubacteria: role and evolution (2007). **J.Biosci**, 32:549-57..

Silva, S.A; Echeverrigaray, S.; Gerhardt, G.(2011) BacPP: Bacterial promoter prediction—A tool for accurate sigma-factor specific assignment in enterobacteria. **J. of Therotic. Biology** 28: 92-99.

Snider, J.; Thibault, G.; Houry, W. (2008) The AAA+ superfamily of functionally diverse proteins. **Genome Biology**, 9:216.

Suno, R.; Niwa, H.; Tsuchiya, D.; Zhang, X.; Yoshida, M.; Morikawa K. (2006). Structure of the whole cytosolic region of ATP-dependent protease FtsH. **Moll. Cel.** 22: 575-585..

Stover, C. K.; Pham, X. Q.; Erwin, A. L.; Mizouchi, S. D.; Warrenner, P.; Hickey, M. J.; Brinkman, F. S.; Hufnagle, W. O.; Kowalik, D. J.; Lagrou, M.; Garber, R. 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. (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. **Nature**, v. 406: 959-964.

- Tart, A.; Wolfgang, M.; Wozniak, D.(2005) The alternative sigma factor algU repress *Pseudomonas aeruginosa* flagellum biosynthesis by inhibiting expression of fleQ. **J. Bacteriol.** 187(23): 7955-7962.
- Trabulsi, L. R.; Lincopan, N.(2008) *Pseudomonas aeruginosa*. In: Trabulsi, L. R.; Alterthum, F. **Microbiologia.** 5 ed., São Paulo: Atheneu. 369-381.
- Todar, K. 2004. Todar's online textbook of bacteriology: *Pseudomonas aeruginosa*. [Online.] K. Todar, Department of Bacteriology, University of Wisconsin—Madison, Madison. <http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html> .
- Tucker, P.A.; Sallai, L. (2007). The AAA+ superfamily- a myriad of motions. **Current Opinion in Structural Biology**, 17:641–652.
- Vabulas, R.M.; Raychaudhuri, S.; Hartl, M.H.; Hartl, F.U. (2010). Protein folding in the cytoplasm and the heat shock response **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 2:a004390.
- Vandecasteele, S.; Peetermans, W.E.; Mercky, R.; Van Eldere, J.; (2001). Quantification of expression of *Staphylococcus epidermidis* housekeeping genes with Taqman quantitative PCR during in vitro growth and under different conditions. **J Bacteriol** 1:7094-7101.
- Vandesompele. J; De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol.** 3 (7), 0034.I–0034.II.
- Vaudax, P.; Francois, P.; Bisoganano, C.; Kelley, W. L.; Lew, D. P.; Schrenzel, J.; ProctorR, R. A.; Mcnamara, P. J.; Peters, G. & Von Eiff, C. (2002). Increased expression of clumping factor and fibronectin-binding proteins by *hemB* mutants of *Staphylococcus aureus* expressing small colony variant phenotypes. **Infect. Immun.** 70 (10), 5428-5437.
- Veesenmeyer, J.F.; Hauser, A.R.; Lisboa, T.; Rello, J. (2009) *Pseudomonas aeruginosa* virulence and therapy: evolving translational strategies. **Crit Care Med**, 37(5): 1777-1786.
- Wagner, R., Aigner, H. and Funk, C. (2012), FtsH proteases located in the plant chloroplast. **Physiologia Plantarum**, 145: 203–214.
- Wang, W., Vincour, B., Shoseyov, O.; Altman, A. (2004) Role of plant heat shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response; **Trends Plant Sci** 9: 244–252
- Wendler, P.; Ciniawsky, S.; Kock, M.; Kube, S. (2012) Structure and function of the AAA+ nucleotide binding pocket. **Biochim Biophys Acta** 1823(1):2-14.
- Westphal, K.; Langklotz, S.; Thomanek, N.; Narberhaus, F. (2012) A trapping approach novel substrates and physiological functions of the essential protease FtsH in *Escherichia coli*. **J Biol Chem.** 14;(51):42962-71.

- White, D.(2000) The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes. **Oxford University Press**.
- Wim, Jr. (2006). Koneman's Color Atlas and textbook of Diagnostic Microbiology. 6nd ed. **Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins**, 316-326..
- Wosten, M.M.S.M. (1998) Eubacterial Sigma-factors. **FEMS Microbiol. Rev.** v.22: 127-150.
- Yin, Y.; Damron, F.H.; Withers, T.R.; Pritchett, C.L; Wang, X.; Schurr, M.J.; Yu, H.D. (2013). Expression of mucoid induction factor MucE is dependent upon the alternate sigma factor AlgU in *Pseudomonas aeruginosa*. **BMC Microbiol**, 13(1): 232-238
- Yura T, Nakahigashi K (1999) Regulation of heat-shock response. **Curr Opin Microbiol** 2:153-158.
- Zhang, Y., Michaelis, S., and Brodsky, J.L. (2002). CFTR expression and ER-associated degradation in yeast. **Methods Mol. Med.** 70: 257-265.
- Zavascki, A.P.; Barth, A.L.; Fernandes, J.F.; Moro, A.L; Goncalves, A.L; Goldani, L.Z.(2006). Reappraisal of *Pseudomonas aeruginosa* hospital-acquires pneumonia mortality in the era of metallo-beta-lactamase-mediated multidrug resistance: a prospective observational study. **Crit Care**, 10(4):R114.
- Zimmermann, H.; Zebisch, M.; Sträter, N. (2012). Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. **Purinergic Signal**, 8: 437-502.
- Zivkovic, L.R.; Civijóvic, G.G.; Karadzick, I. (2010). Isolation and partial characterization of protease from *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. **J. Serb. Chemin. Soc.** 75(8): 1041-1052.
- Zhou, D.X. (1999) Regulatory mechanism of plant gene transcription by GT-elements and GT-factors. **Trends in Plant Science**, 4: 210-214.