UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

Fatores de transcrição da família MarR e resistência a antibióticos em
Chromobacterium violaceum

KELLY CRISTINA MARTINS BARROSO

Ribeirão Preto, SP, Brasil

2017

KELLY CRISTINA MARTINS BARROSO

Fatores de transcrição da família MarR e resistência a antibióticos em
Chromobacterium violaceum

*MarR family transcription factors and antibiotic resistance in Chromobacterium
violaceum*

Versão original

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Ciências –
Área de concentração: Biologia Celular e
Molecular.

Orientador: Prof. Dr. José Freire da Silva Neto

Ribeirão Preto, SP

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Barroso, Kelly Cristina Martins

Fatores de transcrição da família MarR e resistência a antibióticos em *Chromobacterium violaceum*. Ribeirão Preto, 2017.

81 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: da Silva Neto, José Freire.

1. *Chromobacterium violaceum*. 2. Fatores de transcrição. 3. Família MarR. 4. Resistência a antibióticos. 5. Regulador EmrR. 6. Bombas de efluxo.

Nome: BARROSO, Kelly Cristina Martins

Título: Fatores de transcrição da família MarR e resistência a antibióticos em *Chromobacterium violaceum*

Dissertação apresentada ao Departamento de
Biologia Celular e Molecular e Bioagentes
Patogênicos da Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biologia Celular e
Molecular

Orientador: Prof. Dr. José Freire da Silva Neto

Aprovado em: __ / __ / ____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Ribeirão Preto, 07 de agosto de 2017.

Prezados,

O projeto "Fatores de transcrição da família MarR e resistência a antibióticos em *Chromobacterium violaceum*", não foi necessário utilizar animais", sob orientação do Prof. Dr. José Freire da Silva Neto, em desenvolvimento no Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos (Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular) utiliza como modelo de estudo a bactéria *Chromobacterium violaceum*. O projeto utiliza como principais metodologias ferramentas clássicas de biologia molecular disponíveis no laboratório visando caracterizar o regulador transcricional EmrR que regula o operon *emrCAB* e assim confere resistência ao antibiótico ácido nalidixico.

Visando o cumprimento do Regulamento do Programa de Pós-graduação, venho por meio desta verificar se o projeto em questão necessita da apreciação deste Comitê de Ética em Pesquisa, uma vez que no presente estudo não são utilizados materiais biológicos provindos de seres humanos ou animais, nem da utilização destes como objeto de estudo.

Atenciosamente,

Kelly Cristina Martins Barroso
Kelly Cristina Martins Barroso
Nº USP 9137322

Não há necessidade de submissão ao
Comitê de Ética em Pesquisa:

Dra. Marcia Guimarães Villanova
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
do HC e FMRP-USP
11/08/2017

kellybarroso@usp.br

Laboratório de Regulação da Expressão Gênica e Patogenicidade Bacteriana, ramal 9195
Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes patogênicos
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP

Prof. Dr. Danilo Simões Zamboni
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Biologia
Celular e Molecular

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Freire da Silva Neto, pela excelente orientação desde a iniciação científica e pela oportunidade de aprendizado. Tenho uma imensa admiração e inspiração profissional;

Aos laboratórios da FMRP-USP pelo uso de equipamentos, em especial dos professores Dario Zamboni, Paulo Coelho, Maria Cristina Barreira, Marcelo Damário e Geraldo Passos;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por financiar este projeto e pela bolsa de mestrado.

Aos meus amigos do laboratório Maristela, Juliana, Júlia, Renato, Greicy, Bianca, Carlos e Matheus, pelos momentos compartilhados e troca de conhecimento; Às colaboradoras neste trabalho, Maristela e Bianca;

À técnica do nosso laboratório Cláudia, pelo suporte técnico e por nos acolher como uma mãe;

À secretária do nosso departamento Gabriela Bunhotto Zamonier, por estar sempre a nossa disposição para ajudar e esclarecer dúvidas;

À minha família, meus pais João e Leonor, minha irmã Camila e minha avó Lourdes, pelo amor incondicional, por acreditarem em mim e me incentivarem durante esses anos;

Às minhas amigas Cibele, Jéssica Cristina e Jéssica Moretto pela amizade e momentos compartilhados, por estarem ao meu lado em todos os momentos e tornarem meus dias mais alegres;

Aos amigos do departamento Relber, Flávia, Lívia, Domingos e Tânia pelos momentos compartilhados e companhia no café;

RESUMO

Barroso, KCM. Fatores de transcrição da família MarR e resistência a antibióticos em *Chromobacterium violaceum*. 2017. 81 p. Dissertação (Mestrado em Ciências, Área Biologia Celular e Molecular) – Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

A resistência aos antibióticos é um problema de saúde pública global com sérias consequências para o tratamento de várias infecções bacterianas. Os fatores de transcrição da família MarR têm sido descritos controlando resistência a antibióticos e vários outros processos em bactérias. Neste trabalho, estudamos mecanismos de resistência a antibióticos em *Chromobacterium violaceum*, uma bactéria Gram-negativa ambiental que pode atuar como um patógeno oportunista em humanos. A estratégia envolveu a varredura de um painel de treze linhagens mutantes de fatores de transcrição da família MarR de *C. violaceum* disponíveis, por testes de susceptibilidade a 24 antibióticos. Estes ensaios revelaram que apenas o mutante $\Delta emrR$ apresentou resistência aumentada ao antibiótico ácido nalidíxico em relação à linhagem selvagem. Esta resistência aumentada do mutante $\Delta emrR$ ao ácido nalidíxico foi revertida em uma linhagem complementada deste mutante, conforme verificado por ensaios de viabilidade, ensaios de difusão em disco e concentração inibitória mínima (MIC). O fenótipo de diminuída produção de violaceína deste mutante, observado em meio líquido, também foi complementado. Além disso, foi realizado o isolamento de mutantes espontâneos de *C. violaceum* resistentes a ácido nalidíxico com mutação pontual em *emrR*. Os ensaios de microarranjo de DNA mostraram que EmrR reprime algumas dezenas de genes, incluindo o operon *emrCAB*, o qual codifica a bomba de efluxo EmrCAB. Os ensaios de Northern blot confirmaram que o EmrR reprime o operon *emrCAB*, e que a expressão desta bomba é induzida por salicilato, mas não outros compostos, como ácido nalidíxico ou brometo de etídeo. Os ensaios de alteração de mobilidade eletroforética (EMSA) mostraram que a proteína EmrR purificada se liga diretamente às

regiões promotoras de *emrR*, *emrCAB* e vários outros genes do regulon EmrR, para exercer uma regulação negativa direta sobre esses genes. Um mutante nulo $\Delta emrCAB$ foi obtido, mas a ausência desta bomba de efluxo não tornou *C. violaceum* mais susceptível ao ácido nalidíxico, sugerindo que ela é importante somente em condições nas quais é induzida. Estas condições indutoras talvez incluam estresse oxidativo, uma vez que enzimas antioxidantes são parte do regulon de EmrR e a proteína EmrR formou dímeros covalentes na presença de agentes oxidantes *in vitro*. Portanto, nossos dados revelam que mutações pontuais ou moléculas como salicilato abolem a atividade repressora do fator de transcrição EmrR sobre o operon *emrCAB*, levando a superexpressão da bomba de efluxo EmrCAB e aumentando a resistência ao ácido nalidíxico em *C. violaceum*.

Palavras-chave: *Chromobacterium violaceum*, fatores de transcrição, família MarR, resistência a antibióticos, regulador EmrR, bombas de efluxo.

ABSTRACT

Barroso, KCM. MarR family transcription factors and antibiotic resistance in *Chromobacterium violaceum*. 2017. 81 p. Dissertation – Department of Cell and Molecular Biology, Ribeirão Preto Medical School, University of Sao Paulo.

Antibiotic resistance is a global public health problem with serious consequences for the treatment of various bacterial infections. MarR family transcription factors have been described controlling antibiotic resistance and several other processes in bacteria. In this work, we studied mechanisms of antibiotic resistance in *Chromobacterium violaceum*, an environmental Gram-negative bacterium that can act as a human opportunistic pathogen. The strategy involved a screening of an available collection of thirteen *C. violaceum* mutant strains of MarR family transcription factors, by susceptibility testing for 24 antibiotics. These assays revealed that only the $\Delta emrR$ mutant showed increased resistance to the antibiotic nalidixic acid in relation to the wild-type strain. This increased resistance of the $\Delta emrR$ mutant to nalidixic acid was reversed in a complemented strain of this mutant, as verified by viability, disk diffusion, and minimal inhibitory concentration (MIC) assays. The phenotype of decreased violacein production of this mutant, observed in a liquid medium, was also complemented. In addition, it was performed the isolation of spontaneous mutants of *C. violaceum* resistant to nalidixic acid with a point mutation in *emrR*. DNA microarray assays showed that EmrR represses a few dozen of genes, including the *emrCAB* operon, which encodes the EmrCAB efflux pump. Northern blot assays confirmed that EmrR represses the *emrCAB* operon and that the expression of this pump is induced by salicylate, but not other compounds, such as nalidixic acid or ethidium bromide. Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) showed that the purified EmrR protein binds directly to the promoter regions of *emrR*, *emrCAB* and several other genes of the EmrR regulon, to exert a direct negative regulation of these genes. A $\Delta emrCAB$ null mutant strain was obtained, but the absence of this efflux pump did not make *C. violaceum* more susceptible to nalidixic acid, suggesting that it is important only under conditions in which it is induced. These inducing conditions may include

oxidative stress since antioxidant enzymes are part of the EmrR regulon and the EmrR protein has formed covalent dimers in the presence of oxidizing agents *in vitro*. Therefore, our data reveal that point mutations or molecules such as salicylate abolish the repressive activity of the EmrR transcription factor on the *emrCAB* operon, causing overexpression of the EmrCAB efflux pump and increasing the resistance to nalidixic acid in *C. violaceum*.

Key words: *Chromobacterium violaceum*, transcription factors; MarR family, antibiotic resistance, EmrR regulator, efflux pumps.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Linhagens e plasmídeos	31
Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados para clonagens	35
Tabela 3: Antibióticos utilizados nos ensaios de antibiograma	40
Tabela 4: Oligonucleotídeos utilizados nos ensaio de EMSA e Northern blot..	46
Tabela 5: Determinação do MIC para oito antibióticos de <i>C. violaceum</i> selvagem e dos treze mutantes MarR em meio MH líquido	51
Tabela 6: Determinação do MIC para linhagens de <i>C. violaceum</i> , determinada pela técnica de microdiluição em meio MH líquido	54
Tabela 7: Definição do regulon de EmrR por análise de microarranjo de DNA	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Principais classes e alvos de ação dos antibióticos	17
Figura 2: Mecanismos moleculares de resistência aos antibióticos	22
Figura 3: Ensaio de difusão em disco com linhagens controle de <i>C. violaceum</i>	49
Figura 4: Ensaio de difusão em disco com <i>C. violaceum</i> selvagem e os treze mutantes dos fatores de transcrição da família MarR	50
Figura 5: Análise do sequenciamento para o mutante espontâneo do gene <i>emrR</i>	53
Figura 6: Ensaios de difusão em disco	54
Figura 7: Ensaio de viabilidade e ensaio de MIC em placa	55
Figura 8: Complementação do fenótipo de ausência de violaceína de $\Delta emrR$	56
Figura 9: PCR de colônia para confirmação da linhagem mutante $\Delta emrCAB$	57
Figura 10: Antibiógrama do mutante $\Delta emrCAB$ com vinte e quatro antibióticos de diferentes classes	58
Figura 11: Ensaio de Northern blot do operon <i>emrCAB</i>	61
Figura 12: Clonagem, expressão e purificação da proteína recombinante EmrR	62
Figura 13: Ensaios de EMSA para verificar a interação de EmrR com os promotores de vários genes do regulon EmrR	63
Figura 14: Dimerização da proteína His-EmrR por agentes oxidantes	64

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Antibióticos, uma visão geral	15
1.1.1 Classes e mecanismos de ação dos antibióticos	15
1.1.2 Emergência e disseminação da resistência a antibióticos	18
1.1.3 Mecanismos moleculares de resistência a antibióticos	20
1.1.3.1 Resistência mediada por bombas de efluxo	23
1.2 Fatores de transcrição da família MarR e resistência a antibióticos	25
1.3 <i>Chromobacterium violaceum</i>	27
2. OBJETIVO	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 Linhagens e plasmídeos	31
3.2 Meios de cultura e condições de cultivo	33
3.3 Clonagem, obtenção de mutantes e complementação	33
3.3.1 Reações de PCR	33
3.3.2 Digestão de DNA com enzimas de restrição	34
3.3.3 Ligação de DNA e transformação por eletroporação	34
3.3.4 Sequenciamento de DNA	34
3.3.5 Clonagem do gene <i>emrR</i> em vetor de expressão	35
3.3.6 Complementação do mutante $\Delta emrR$	36
3.3.7 Obtenção de mutante espontâneo para <i>emrR</i>	36
3.3.8 Construção da linhagem mutante $\Delta emrCAB$ de <i>C. violaceum</i>	37
3.4 Expressão e purificação da proteína recombinante EmrR	37
3.4.1 Dimerização <i>in vitro</i> da proteína recombinante EmrR	39
3.5 Testes de sensibilidade aos antibióticos	39
3.5.1 Antibiograma pela técnica de difusão em disco de Kirby & Bauer	39
3.5.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC)	40
3.5.2.1 Determinação do MIC pelo método de macrodiluição em tubos	40
3.5.2.2 Determinação do MIC em placas	42
3.5.3 Ensaio de viabilidade	42
3.6 Ensaios de expressão gênica	43
3.6.1 Extração de RNA total	43

3.6.2 Ensaios de Microarranjos de DNA	43
3.6.2.1 Preparação das sondas de cRNA marcado com fluoróforos	44
3.6.2.2 Hibridização e lavagens	44
3.6.2.3 Aquisição das imagens e análises dos dados	44
3.6.3 Northern Blot	45
3.7 Ensaio de alteração de mobilidade eletroforética em gel (EMSA)	46
4. RESULTADOS	48
4.1 Identificação de fatores de transcrição envolvidos em resistência a antibióticos em <i>C. violaceum</i>	48
4.2 Papel do sistema EmrR/EmrCAB na resistência a antibiótico em <i>C. violaceum</i>	52
4.2.1 Deleção total ou mutação pontual em <i>emrR</i> aumenta a resistência a ácido nalidíxico em <i>C. violaceum</i>	52
4.2.2 Mutação em <i>emrCAB</i> não afetou a resistência a antibiótico em <i>C. violaceum</i>	56
4.3. Definição dos genes regulados por EmrR	58
4.3.1 EmrR atua como regulador negativo de seu regulon	58
4.3.2 O operon <i>emrCAB</i> é reprimido por EmrR e induzido por salicilato	60
4.3.3 EmrR atua como repressor direto da maioria dos genes de seu regulon.	61
4.4 EmrR parece ser um regulador redox	64
5. DISCUSSÃO	65
6. CONCLUSÃO	70
7. BIBLIOGRAFIA	71

1. INTRODUÇÃO

1.1 Antibióticos, uma visão geral

A introdução de antibióticos na prática clínica revolucionou o tratamento de doenças infecciosas até então incuráveis. O primeiro antibiótico descoberto foi a penicilina em 1928, por Fleming, mas ela não foi introduzida no mercado de imediato devido a desvantagens como baixo rendimento, instabilidade e problemas na purificação. Apenas em 1940, com os trabalhos de Florey e Chain, ela foi introduzida no mercado e, desde então, foi amplamente utilizada. Além da penicilina, quase todos os antibióticos que estão em uso atualmente foram descobertos durante as décadas de 1940 a 1960, período conhecido como a era dourada de descoberta dos antibióticos (VAN HOEK et al., 2011); (LEWIS, 2013); (AMINOV, 2017). Desde então, uma quantidade enorme de trabalhos tem sido realizada com antibióticos, buscando a descoberta de novas moléculas e o entendimento de seus modos de ação e mecanismos de resistência (DAVIES; DAVIES, 2010); (LEWIS, 2013).

1.1.1 Classes e mecanismos de ação dos antibióticos

Os antibióticos são moléculas orgânicas produzidas por vias do metabolismo secundário de microrganismos, sobretudo fungos e bactérias de solo do filo Actinobacteria. Com o uso indiscriminado dos antibióticos e o surgimento de cepas bacterianas resistentes, a indústria farmacêutica se concentrou no desenvolvimento de antibióticos semissintéticos ou sintéticos, modificados por síntese química a partir dos produtos naturais (VAN HOEK et al., 2011); (LEWIS, 2013); (AMINOV, 2017). Uma das principais propriedades dos antibióticos é a sua ação seletiva, pois atuam em alvos específicos da célula bacteriana, causando inibição do crescimento (bacteriostáticos) ou morte da célula bacteriana, no caso dos antibióticos bactericidas (KOHANSKI; DWYER; COLLINS, 2010); (LEWIS, 2013). Os antibióticos podem ser agrupados por classes e mecanismos de ação (Figura 1).

Os inibidores da síntese parede celular, como os β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos), possuem um componente estrutural característico que é o anel β -lactâmico. Eles atuam inibindo a síntese da parede celular por se ligarem no sítio ativo das enzimas PBPs (proteínas ligadoras de penicilina); a inativação dessas proteínas previne a transpeptidação da cadeia do peptideoglicano nascente, levando a um enfraquecimento da parede celular bacteriana, o que resulta em lise por pressão osmótica e morte. Os glicopeptídeos se ligam a estrutura D-Ala-D-Ala inibindo a transglicosilação (NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012); (LEWIS, 2013) (Figura 1). As quinolonas são outra classe de antibióticos clinicamente relevantes. A primeira quinolona utilizada foi o ácido nalidíxico. Posteriormente, surgiram as fluoroquinolonas com um átomo de flúor no anel quinolônico (ciprofloxacina, levofloxacina, norfloxacina). Esta classe de antibióticos atua sobre a topoisomerase II (DNA girase) e a topoisomerase IV (Topo IV), aprisionando estas enzimas em um complexo irreversível que impede sua ação durante a replicação do DNA (FÀBREGA et al., 2009). Já a transcrição é inibida pelas rifamicinas por se ligarem a subunidade β da RNA polimerase inibindo a iniciação da cadeia de RNA nascente (KOHANSKI; DWYER; COLLINS, 2010).

Dentre os inibidores da síntese proteica temos os macrolídeos, lincosamidas, estreptograminas e cloranfenicol que inibem a síntese proteica por se ligarem a subunidade 50S do ribossomo bacteriano bloqueando a iniciação da tradução. Já as tetraciclínas e aminoglicosídeos se ligam a subunidade 30S do ribossomo bacteriano levando a incorporação de aminoácidos errados na cadeia de elongação. Essas proteínas com erros na tradução podem sofrer mudanças conformacionais e a incorporação dessas proteínas na membrana celular leva a um aumento da captação da droga (KOHANSKI; DWYER; COLLINS, 2010). Além da inibição destas três grandes rotas (síntese da parede celular, ácidos nucleicos e de proteínas) (Figura 1), temos ainda antibióticos que atuam desestabilizando a membrana da célula bacteriana (polimixinas) e aqueles que atuam como antimetabólitos (sulfonamidas e trimetoprim), inibindo uma enzima bacteriana necessária à síntese de ácido fólico, um precursor para a síntese de nucleotídeos (KOHANSKI; DWYER; COLLINS, 2010).

ponto central de sua ação provocar dano oxidativo contrapõe evidências obtidas por abordagens metodológicas distintas. Enquanto alguns grupos baseiam-se em métodos menos usuais, como uso de sondas fluorescentes (DWYER et al., 2015), outros apoiam-se em abordagens mais clássicas, como uso de mutantes e ensaios de sobrevivência (IMLAY, 2015). Dada a complexidade fisiológica da ação dos antibióticos esses mecanismos precisam ser melhor estudados.

1.1.2 Emergência e disseminação da resistência a antibióticos

Tão logo os antibióticos foram utilizados na clínica médica, a partir da década de 40, começaram a ser descritas linhagens de bactérias resistentes. A pressão seletiva causada pelo uso de milhões de toneladas de antibióticos ao longo dos últimos 75 anos desde que eles foram introduzidos fez emergir linhagens resistentes a múltiplas drogas dentre os principais patógenos humanos em escala global (DAVIES; DAVIES, 2010); (LAXMINARAYAN et al., 2013). Com o surgimento das linhagens resistentes surgiu também a necessidade de definições padronizadas para os vários graus de resistência, baseadas no número de antimicrobianos, classes ou subclasses para as quais a bactéria é resistente. Assim temos MDR (**MultiDrug-Resistant**), se elas são resistentes a um ou mais agentes antimicrobianos; XDR (**Extreme Drug Resistance**), se são resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos; e PDR (**PanDrug Resistant**), se são resistentes a quase todos os antimicrobianos disponíveis comercialmente, ou resistentes a todos os antimicrobianos rotineiramente testados (MAGIORAKOS et al., 2012).

Dentre as cepas bacterianas resistentes a antibióticos, podemos citar as cepas MDR de *Mycobacterium tuberculosis*, cepas MRSA (**M**ethicillin-**R**esistant **S**taphylococcus **aureus**) de *S. aureus*, cepas KPC (**K**lebsiella **p**neumoniae **C**arbapenemase) de *K. pneumoniae* e cepas ESBL (**E**xtended-**S**pectrum β -**L**actamases) de várias bactérias Gram-negativas (DAVIES; DAVIES, 2010); (LEWIS, 2013). O termo superbactéria (*superbugs*) refere-se a estas bactérias com aumentada virulência e mortalidade em função de terem adquirido resistência a múltiplas classes de antibióticos, até então efetivas para o seu tratamento (DAVIES; DAVIES, 2010); (LAXMINARAYAN et al., 2013).

Embora o foco da pesquisa em resistência aos antibióticos seja em bactérias patogênicas, está cada vez mais claro que um melhor entendimento da origem, evolução e disseminação da resistência exige o estudo do resistoma, a totalidade dos determinantes de resistência presentes na microbiota global, incluindo o reservatório de genes de resistência de organismos patogênicos e não patogênicos ambientais (DAVIES; DAVIES, 2010); (MORAR; WRIGHT, 2010); (PERRY; WESTMAN; WRIGHT, 2014). Este tipo de abordagem tem demonstrado que a resistência aos antibióticos é um fenômeno antigo que pode ter evoluído como um mecanismo de autoproteção em bactérias produtoras de antibióticos ambientais e que foi acelerado e amplificado em escala global pela forte pressão seletiva imposta pela produção e uso humano de antibióticos nas últimas décadas (DAVIES; DAVIES, 2010); (MORAR; WRIGHT, 2010); (PERRY; WESTMAN; WRIGHT, 2014). De fato, determinantes de resistência de diferentes classes têm sido encontrados em ambientes naturais isolados no tempo e no espaço (D'COSTA et al., 2011) e compartilhados entre bactérias ambientais de solo e patógenos humanos (FORSBERG et al., 2012).

Em termos genéticos podemos classificar a resistência aos antibióticos em resistência intrínseca e resistência adquirida. A resistência intrínseca é uma característica inata de uma dada espécie bacteriana codificada por genes presentes no cromossomo transmitidos verticalmente, tais como bombas de efluxo multidrogas constitutivas e a reduzida permeabilidade da membrana externa de bactérias Gram-negativas (FERNÁNDEZ; HANCOCK, 2012); (COX; WRIGHT, 2013). Já a resistência adquirida envolve a aquisição de genes de resistência de outra bactéria por mecanismos de transferência gênica horizontal, tornando uma linhagem originalmente sensível em resistente. Elementos genéticos móveis, tais como plasmídeos, bacteriófagos, transposons e integrons são responsáveis pela disseminação de determinantes de resistência, o que tem levado ao surgimento de bactérias resistentes a múltiplos antibióticos (DAVIES; DAVIES, 2010); (VAN HOEK et al., 2011); (PERRY; WESTMAN; WRIGHT, 2014).

Além da resistência aos antibióticos, outro fenômeno com grandes implicações para o tratamento de infecções bacterianas recorrentes é a

persistência. Todas as bactérias formam *persisters*, raras células que não são erradicadas da população por serem transitoriamente tolerantes a múltiplas drogas. Ao contrário de bactérias resistentes, as *persisters* não se multiplicam na presença do antibiótico, mas ficam em um estado dormente, insensível a ação do antibiótico (MAISONNEUVE; GERDES, 2014); (KALDALU; HAURYLIUK; TENSION, 2016). Estudos de microfluídica com células únicas indicam que a persistência é um fenômeno estocástico de heterogeneidade fenotípica, embora diversas condições ambientais de estresse induzam a formação de *persisters*, incluindo antibióticos fluoroquinolonas como ciprofloxacina. O modelo mais aceito de formação de *persisters* propõe um papel chave do *alarmone* ppGpp e de módulos toxina-antitoxina (MAISONNEUVE; GERDES, 2014).

Trabalhos recentes vêm propondo estratégias alternativas para combater a resistência aos antibióticos. Por exemplo, em um trabalho com o uso do sistema de edição de genes CRISPR/Cas9, a nuclease Cas9 foi reprogramada para atuar em genes de virulência e genes de resistência a antibióticos plasmidiais. Com isto, foi possível a destruição de bactérias virulentas e dos plasmídeos, evitando a propagação dos genes de resistência a antibiótico (BIKARD et al., 2014). Em outro trabalho, pesquisadores sintetizaram uma forma mais potente da vancomicina. Essa versão é um análogo da original com três modificações na sua estrutura podendo atuar por mecanismos de ação independentes, o que dificultaria o surgimento de cepas resistentes (OKANO; ISLEY; BOGER, 2017). Outra estratégia é o uso de peptídeos catiônicos antimicrobianos, como àqueles produzidos pelo sistema imune inato humano. A natureza anfipática destes peptídeos permite que eles se insiram na membrana celular bacteriana formando um poro que perturba a integridade da membrana (NARAYANA; CHEN, 2015); (ANDERSSON; HUGHES; KUBICEK-SUTHERLAND, 2016).

1.1.3 Mecanismos moleculares de resistência a antibióticos

Os mecanismos moleculares de resistência aos antibióticos são complexos e diversos, mas podem ser agrupados nas seguintes categorias: (I)

degradação do agente antimicrobiano, (II) modificação enzimática do antibiótico, (III) modificação do alvo dos antibióticos, (IV) mudanças na permeabilidade na parede celular bacteriana restringindo o acesso do antimicrobiano, (V) ativação do efluxo do antibiótico, (VI) aquisição de vias metabólicas alternativas, (VII) superprodução do alvo (LEWIS, 2013); (BLAIR et al., 2015) (Figura 2). Para um mesmo antibiótico em um mesmo organismo estes mecanismos de resistência podem atuar conjuntamente (POOLE, 2005); (FERNÁNDEZ; HANCOCK, 2012); (COX; WRIGHT, 2013).

A inativação de antibióticos por hidrólise ou modificação química é o principal mecanismo de resistência aos antibióticos (Figura 2), desde a introdução da penicilina e a descoberta da primeira penicilinase (uma β -lactamase) em 1940. Desde então, várias enzimas β -lactamases foram identificadas, e atualmente encontram-se amplamente disseminadas, muitas vezes via plasmídeos, em vários patógenos bacterianos (NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012). Essas enzimas clivam o anel β -lactâmico e impedem que o antibiótico se ligue as PBPs, gerando resistência aos antibióticos β -lactâmicos (WRIGHT, 2005). Complexos sistemas de classificação tem sido usados para agrupar as β -lactamases de acordo com seu espectro de ação (cefalosporinases, carbapenemases, β -lactamases de espectro entendido ESBLs). Uma classificação molecular e funcional divide estas enzimas em quatro classes (A, B, C, D), sendo sua catálise mediada por um resíduo conservado de serina ou dependente de zinco (metalo- β -lactamases) (LIVERMORE, 2008); (NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012). Além de hidrólise, os antibióticos podem sofrer modificações químicas por transferência de grupos acil, fosfato, nucleotidil e ribitol. Os aminoglicosídeos são particularmente mais susceptíveis a esse tipo de modificação, por três classes principais de enzimas, acetiltransferases, fosfotransferases e nucleotidiltransferases (WRIGHT, 2005); (MORAR; WRIGHT, 2010).

Figura 2: Mecanismos moleculares de resistência aos antibióticos. Os sete mecanismos de resistência descritos no texto estão enumerados (I a VII). O esquema também ilustra como genes de resistência podem disseminar-se entre bactérias. Retirado de (LEWIS, 2013).

Outro mecanismo muito comum de surgimento de resistência a antibióticos são as mutações pontuais que causam alteração do alvo molecular específico do antibiótico (Figura 2). Por exemplo, mutações no gene *rpoB* que codifica a subunidade β da RNA polimerase faz com que a ligação da rifamicina a RNA polimerase seja mais fraca (ROTHSTEIN, 2016). Além disso, mutações pontuais nos genes *gyrA*, *gyrB* ou *parC* são uma causa comum de resistência

as quinolonas (FÀBREGA et al., 2009); (RICE, 2012). Para as quinolonas a resistência também envolve os genes *qnr* (genes de resistência a quinolonas), os quais codificam PRPs (*pentapeptide repeat proteins*) que se ligam a topoisomerase IV e a DNA girasse, protegendo-as da ligação da droga, e evitando assim a quebra da dupla fita do DNA (VETTING et al., 2011). No caso da resistência às polimixinas, ocorre alteração do alvo de ação pela expressão de enzimas que modificam o lipopolissacarídeo (LPS) (LIM, 2010).

A redução da concentração intracelular do antibiótico pode ser mediada tanto pela redução de permeabilidade, impedindo sua entrada, ou pelo efluxo da droga para fora da célula, com o transporte ativo mediado por bombas de efluxo (Figura 2). Podemos citar como exemplo de tal sinergismo entre estes dois mecanismos, um isolado clínico de *Klebsiella pneumoniae* que superexpressa a bomba AcrAB-TolC e tem uma deficiência na porina que leva ao aumento do MIC para cefotaxima (NIKAIDO; PAGÈS, 2012).

1.1.3.1 Resistência mediada por bombas de efluxo

As bombas de efluxo constituem um grupo de transportadores presentes de forma ubíqua em qualquer organismo, contribuindo significativamente para a elevada resistência intrínseca encontrada em algumas bactérias (HERNANDO-AMADO et al., 2016). As bombas de efluxo clinicamente relevantes podem ser agrupadas em cinco famílias estruturais, que utilizam diferentes fontes energéticas para seu funcionamento: transportadores do tipo ABC (**A**TP-**B**inding **C**assette), a família MFS (**M**ajor **F**acilitator **S**uperfamily), a família SMR (**S**mall **M**ultidrug **R**esistance), a família MATE (**M**ultidrug **A**nd **T**oxic compound **E**xtrusion) e a família RND (**R**esistance-**N**odulation-cell **D**ivision). Geralmente, uma combinação de mais de um destes sistemas de transporte contribui para a resistência a antibióticos em uma mesma bactéria (POOLE, 2005); (FERNÁNDEZ; HANCOCK, 2012); (COX; WRIGHT, 2013).

Os transportadores do tipo ABC atuam como uma via-transmembrana para substratos. Eles compartilham um domínio intracelular de ligação a nucleotídeos (NBD) que se liga e hidrolisa ATP, e um domínio de

membrana localizado na membrana plasmática (DAVIDSON et al., 2008). A hidrólise do ATP resulta na translocação do substrato do meio interno para o externo (DAVIDSON et al., 2008). Podemos citar como exemplos de transportadores ABC envolvidos em resistência a antibióticos a proteína LmrA de *Lactococcus lactis* (VAN VEEN et al., 1998), a proteína SAV1866 de *Staphylococcus aureus* (VELAMAKANNI et al., 2008) e o transportador EfrAB de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* (LEE et al., 2003); (LERMA et al., 2014).

Os membros da família SMR são tipicamente compostos por 100-120 aminoácidos com 4 α -hélices transmembrana, e em geral funcionam como homodímeros. Estes transportadores utilizam o gradiente eletroquímico de prótons gerado através da membrana citoplasmática trocando dois prótons por uma molécula de substrato (DU et al., 2015). Um exemplo bem caracterizado é a proteína EmrE de *E. coli*. Essa proteína confere resistência a substâncias monovalentes como brometo de etídeo, acriflavina e tetrafenilfosfônio (ROTEM; SCHULDINER, 2004).

Os transportadores da família MATE possuem em torno de 400 a 700 aminoácidos e 12 domínios α -hélices transmembrana. São divididos em três subfamílias, DinF, NorM e subfamílias eucarióticas. NorM e DinF usam o gradiente eletroquímico de Na^+ ou H^+ para exportar drogas (DU et al., 2015); (HERNANDO-AMADO et al., 2016). Como exemplos desses transportadores podemos citar MepAB de *Staphylococcus aureus*, que confere resistência a tigeciclina, e FepA de *Listeria monocytogenes*, que confere resistência a fluoroquinolonas (MCALEESE et al., 2005); (GUÉRIN et al., 2014).

Os transportadores da família RND funcionam como complexos que possuem três proteínas: um próton *antiporter*/substrato *antiporter* na membrana interna, que funciona como motor e transportador; um canal de membrana externa que atua como duto para o efluxo da droga; e uma proteína interna adaptadora ancorada na membrana (YAMAGUCHI; NAKASHIMA; SAKURAI, 2015). O protótipo desta família é a bomba AcrAB-TolC de *E. coli* que confere resistência a tetraciclina, cloranfenicol, ampicilina, ácido nalidíxico e rifampicina (OKUSU; NIKAIDO, 1996); (DU et al., 2015).

A família de transportadores do tipo MFS compreendem membros que possuem 12 domínios transmembrana ricos em aminoácidos em estrutura α -hélice (RANAWEERA et al., 2015); (QUISTGAARD et al., 2016). Em *Acinetobacter baumannii* a bomba de efluxo AbaF é responsável pelo efluxo de fosfomicina, conferindo resistência a este antibiótico. Mutantes para esta bomba de efluxo apresentaram diminuição da virulência e produção de biofilme (SHARMA et al., 2016). Em *Stenotrophomonas maltophilia*, a deleção de *mfsA* aumenta a susceptibilidade a paraquat, mas não para outros oxidantes; esta bomba é regulada por SoxR, um fator de transcrição que responde a estresse por superóxido (SRIJARUSKUL et al., 2015).

1.2 Fatores de transcrição da família MarR e resistência a antibióticos

Os fatores de transcrição pertencentes à família MarR (*Multiple Antibiotic Resistance Regulators*) são amplamente distribuídos na natureza e são encontrados tanto em bactérias quanto em *Archaea* (PERERA; GROVE, 2010). Ao ligarem-se ao DNA como dímeros através de seu motivo de ligação wHTH (*winged Helix-Turn-Helix*), alguns MarR ativam a transcrição gênica, porém a maioria deles atuam como repressores ligando em regiões intergênicas divergentes e reprimindo a transcrição de ambos os genes (WILKINSON; GROVE, 2006); (GROVE, 2013).

As proteínas da família MarR têm sua atividade modulada pela ligação de pequenas moléculas ou por oxidação de cisteínas reativas. Em resposta a estes sinais, estes fatores de transcrição controlam a expressão de genes importantes em uma ampla variedade de processos biológicos, tais como em virulência (reguladores MarR tais como SlyA, RovA, PecS, MgrA, OspR) (ELLISON; MILLER, 2006); (CHEN; BRUGAROLAS, 2011), resposta ao estresse oxidativo (OhrR, OspR e MexR) (ANTELMANN; HELMANN, 2011), catabolismo de compostos aromáticos (CbaR, HucR e BadR) e resistência aos antibióticos (ALEKSHUN et al., 2001); (PERERA; GROVE, 2010).

O protótipo desta família de fatores de transcrição, a proteína MarR de *E. coli*, que inclusive deu nome a esta família, foi assim nomeada porque regula resistência a ampla gama de antibióticos, além de salicilato e outros

compostos relacionados (GEORGE; LEVY, 1983); (SULAVIK et al., 1995). A proteína MarR atua como um repressor do operon *marRAB*. Na presença de vários compostos lipofílicos aniônicos, tal como salicilato, MarR libera a transcrição dos genes deste operon, dentre eles o gene *marA* (COHEN et al., 1993); (SEOANE; LEVY, 1995). Este gene codifica o fator de transcrição MarA que atua ativando a expressão de aproximadamente 60 genes responsáveis pelo fenótipo *mar*, dentre eles o sistema de efluxo multidrogas AcrAB-TolC, o que resulta em aumento da resistência aos antibióticos (OKUSU; NIKAIDO, 1996); (ALEKSHUN; LEVY, 1997).

Em *Mycobacterium smegmatis* um MarR codificado pelo operon *marRAB* regula negativamente a expressão de dois transportadores ABC contribuindo para a resistência a rifampicina (ZHANG et al., 2014). Em *Mycobacterium tuberculosis*, mutações em um MarR levam a um aumento da expressão de uma enzima metiltransferase que N-metila a droga pyridobenimidazol, levando a perda de sua atividade bactericida (WARRIER et al., 2016). O regulador AsrR de *Enterococcus faecium* é um MarR que atua como sensor redox que tem papel na resistência a antimicrobianos. Um mutante nulo para *asrR* é mais resistente a β -lactâmicos (LEBRETON et al., 2012).

Existem vários outros exemplos caracterizados de fatores de transcrição da família MarR que regulam bombas de efluxo multidrogas: EmrR de *E. coli*, que reprime o operon *emrRAB*, liberando a expressão da bomba EmrAB na presença das drogas que são secretadas (LOMOVSKAYA; LEWIS, 1992); (XIONG et al., 2000); EmrRsm de *Stenotrophomonas maltophilia*, um regulador da bomba EmrCABsm de efluxo de compostos hidrofóbicos (HUANG et al., 2013); FarR de *Neisseria gonorrhoeae*, um repressor do operon *farAB*, que codifica uma bomba de efluxo capaz de exportar agentes microbianos derivados do hospedeiro, tais como, ácidos graxos de cadeia longa (LEE et al., 2003); MepR de *Staphylococcus aureus* que reprime o operon *mepRAB*, liberando a expressão do transportador MepA pertencente à família dos transportadores MATE, um dos principais contribuintes para a resistência a múltiplas drogas (KAATZ; MCALEESE; SEO, 2005); (BIRUKOU et al., 2013).

Um caso especial de bactéria com elevada resistência intrínseca a múltiplos agentes antimicrobianos é *Pseudomonas aeruginosa*. Esta resistência

é fornecida pelo grande número de bombas de efluxo multidrogas, incluindo MexAB-OprM, MexY-OprM, MexCD-oprJ e MexEF-OprN. Estas bombas são reguladas por vários fatores de transcrição de diferentes famílias (FERNÁNDEZ; HANCOCK, 2012). Na família MarR podemos citar MexR, um fator de transcrição que regula negativamente o operon *mexAB-oprM*. Mutações em MexR leva a desrepressão da bomba MexAB-OprM, causando aumento na resistência às quinolonas, cloranfenicol, eritromicina, azitromicina, entre outros (POOLE et al., 1996). Posteriormente, foi demonstrado que MexR é um regulador redox que quando oxidado libera a expressão da bomba MexAB-OprM (CHEN et al., 2008); (CHEN et al., 2010).

1.3 *Chromobacterium violaceum*

A *Chromobacterium violaceum* é uma bactéria Gram-negativa de vida livre, saprófita, encontrada em águas e solos de regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, é encontrada as margens do Rio Negro na região amazônica e no Cerrado e Mata Atlântica (LIMA-BITTENCOURT et al., 2007). É também um patógeno ocasional, sendo que o primeiro caso relatado em humanos foi na Malásia (SNEATH et al., 1953). Desde então, outros relatos de infecção foram descritos na literatura médica, afetando sobretudo crianças e indivíduos imunodeficientes, sendo a via de infecção mais comum a entrada da bactéria através de lesões na pele expostas ao solo ou água contaminada (YANG; LI, 2011). Embora raros, os casos de infecção são caracterizados por rápida disseminação e alta mortalidade. O quadro evolui de abscessos viscerais, principalmente no fígado, e lesões de pele para infecção generalizada e óbito (MARTINEZ et al., 2000); (DURÁN; MENCK 2001); (YANG; LI, 2011). Foi relatado na literatura casos de pneumonia nosocomial por *C. violaceum* em pacientes de unidades de terapia intensiva. No entanto, infecção por *C. violaceum* em um ambiente hospitalar não é algo comum (HAGIYA et al., 2014). Infecções com *C. violaceum* são associadas a pacientes com doença granulomatosa crônica. Os fagócitos desses pacientes não produzem espécies reativas de oxigênio, tornando-os susceptíveis a infecções por bactérias catalase-positivas (MEHER-HOMJI et al., 2017).

Nos casos clínicos têm sido descrita a dificuldade no tratamento com algumas drogas antimicrobianas, sobretudo antibióticos β -lactâmicos (KAUFMAN; CERASO; SCHUGURENSKY, 1986); (ALDRIDGE; VALAINIS; SANDERS, 1988); (MARTINEZ; MATTAR, 2007). Os relatos da literatura indicam que ela é susceptível a fluoroquinolonas, carbapenêmicos, aminoglicosídeos, trimetoprim e tetraciclina (HAGIYA et al., 2014); (MADI et al., 2015). Porém, não há estudos demonstrando se esta resistência nos isolados clínicos é intrínseca ou adquirida por elementos genéticos móveis, como plasmídeos. Um estudo de 2016 mostrou que três espécies de *Chromobacterium*, mas não a *C. violaceum*, possuem genes de β -lactamases de classe A com alta similaridade com enzimas KPC, e que provavelmente estas enzimas podem ter se originado de alguma espécie do gênero *Chromobacterium* e ter papel na evolução de KPC (GUDETA et al., 2016).

Com o sequenciamento do genoma de *C. violaceum* foram identificados diversos genes cujos produtos potencialmente funcionam como determinantes de resistência a antibióticos nesta bactéria (VASCONCELOS; ALMEIDA; HUNGRIA, 2003); (FANTINATTI-GARBOGGINI et al., 2004), embora praticamente não existam trabalhos experimentais neste assunto. Este potencial arsenal inclui enzimas β -lactamases, enzimas modificadoras de antibióticos e vários sistemas de efluxo multidrogas (FANTINATTI-GARBOGGINI et al., 2004). Também os mecanismos regulatórios controlando estes possíveis determinantes de virulência ainda não foram estudados, incluindo o papel dos quinze fatores de transcrição da família MarR codificados no genoma de *C. violaceum*.

Como acontece com outros microrganismos de vida livre, *C. violaceum* é exposta a diversas condições de estresse, incluindo carência de nutrientes, variações de pH e temperatura e exposição a compostos tóxicos, inclusive produzidos por outros microrganismos ambientais. De fato, o genoma de *C. violaceum* tem uma proporção elevada de ORFs associadas a mecanismos de transdução de sinal, o que permite uma rápida adaptação a diversas condições (VASCONCELOS; ALMEIDA; HUNGRIA, 2003); (HUNGRIA et al., 2004). *C. violaceum* é produtora de diversos metabólitos secundários de interesse biotecnológico, incluindo o pigmento violaceína,

vários antibióticos (aerocianidina, aerocavina e monobactam SB-26.180) e o depsipeptídeo antitumoral FR901228 (DURÁN; MENCK, 2001); (DURÁN et al., 2007). Estes compostos devem ter um papel importante no ambiente para antagonizar o crescimento de organismos competidores. Como um organismo produtor de antibióticos, *C. violaceum* pode ter desenvolvido mecanismos de resistência a estas drogas como uma estratégia de autoproteção e isto tem repercussões no tratamento clínico das infecções causadas por esta bactéria.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar funcionalmente mecanismos regulatórios de resistência a antibióticos em *Chromobacterium violaceum*, tendo como ponto de partida uma análise global e centrada nos fatores de transcrição da família MarR desta bactéria.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagens e plasmídeos

As linhagens bacterianas e os plasmídeos utilizados neste trabalho estão listados na Tabela 1.

Tabela 1: Linhagens e plasmídeos

Linhagens	Genótipo/Fenótipo	Origem/Referência
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	F-Φ80/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA</i> - <i>argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK-, mK+) <i>phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1</i>	HANAHAN, 1983
BL21 (DE3)	Superexpressão de proteínas	Novagen
S17-1	Conjugação de plasmídeos	SIMON et al., 1983
<i>Chromobacterium violaceum</i>		
ATCC 12472	Sequenciada, isolado de água, patogênica, produz violaceína	Fundação André Tosello (Campinas)
ΔCV_0047	Mutante nulo para o gene CV_0047	Doutorado Maristela P Mello
ΔCV_0210	Mutante nulo para o gene CV_0210	Doutorado Maristela P Mello
ΔCV_0539	Mutante nulo para o gene CV_0539	Doutorado Maristela P Mello
ΔCV_0577	Mutante nulo para o gene CV_0577	Doutorado Maristela P Mello
ΔCV_0769 (Δ <i>emrR</i>)	Mutante nulo para o gene CV_0769 (<i>emrR</i>)	Doutorado Maristela P Mello
ΔCV_1776	Mutante nulo para o gene CV_1776	Doutorado Maristela P Mello
ΔCV_1810	Mutante nulo para o gene	Doutorado Maristela P

	CV_1810	Mello
Δ CV_2726	Mutante nulo para o gene CV_2726	Doutorado Maristela P Mello
Δ CV_2844	Mutante nulo para o gene CV_2844	Doutorado Maristela P Mello
Δ CV_3160	Mutante nulo para o gene CV_3160	Doutorado Maristela P Mello
Δ CV_3383	Mutante nulo para o gene CV_3383	Doutorado Maristela P Mello
Δ CV_3636	Mutante nulo para o gene CV_3636	Doutorado Maristela P Mello
Δ CV_3905	Mutante nulo para o gene CV_3905	Doutorado Maristela P Mello
<i>C. violaceum</i> pMR20Ø	<i>C. violaceum</i> com o vetor pMR20	Este trabalho
Δ emrRpMR20emrR	Δ emrR complementado com o gene emrR	Este trabalho
Δ emrRpMR20Ø	Δ emrR com o vetor pMR20	Este trabalho
Δ emrCAB	Mutante nulo para o operon emrCAB (CV_0766-67-68)	Este trabalho
CV_0769R92H	Mutante espontâneo para o gene emrR, troca de arginina por histidina na posição 92	Este trabalho

Plasmídeos	Características*	Origem/Referência
pNPTS138	Vetor de clonagem, suicida, Can ^r	M.R.K. Alley
pET-15b	Vetor de expressão; promotor induzido por IPTG; repressor <i>lacI</i> ; Amp ^r	Novagen
pMR20	Vetor de complementação, Tet ^r	ROBERTS et al., 1996

*Abreviaturas: Amp, ampicilina; Can, canamicina; Tet, tetraciclina; r, resistência

3.2 Meios de cultura e condições de cultivo

As linhagens de *E. coli* DH5 α (clonagem), S17-1 (conjugação) e BL21(DE3) (expressão de proteínas) foram cultivadas a 37°C, em meio rico Luria-Bertani (LB) e suplementadas com ampicilina (100 μ g/ml), canamicina (50 μ g/ml) e tetraciclina (12 μ g/ml), quando necessário. As linhagens de *C. violaceum* (Tabela 1) foram cultivadas em meio LB e suplementadas com os antibióticos canamicina (50 μ g/ml) e tetraciclina (10 μ g/ml), quando necessário. Os ensaios de sensibilidade aos antibióticos foram realizados em meio Mueller-Hinton (MH) (Sigma). Nestes ensaios, as linhagens armazenadas em glicerol 20% no freezer -80°C, foram cultivadas a 37°C em placa LB e em seguida inoculadas em placa MH.

3.3 Clonagem, obtenção de mutantes e complementação

3.3.1 Reações de PCR

Os fragmentos dos genes de interesse para as clonagens foram amplificados por PCR com enzima de alta fidelidade. Utilizou-se em cada reação: 0,5 μ l do DNA molde (DNA genômico de *C. violaceum* ATCC 12472), 0,5 μ l de cada oligonucleotídeo a 50 μ M (Tabela 2), 1,0 μ l de dNTP mix a 10 mM, 10 μ l de 5x Phusion HF Buffer, 0,5 de Phusion DNA polimerase (Thermo Scientific), 1,5 μ l de DMSO e água mili-Q para um volume final de 50 μ l. Esse PCR foi feito nas seguintes condições: 98°C por 3 minutos; 30 ciclos compostos por 3 etapas cada ciclo (98°C por 10 segundos, 64°C por 30 segundos e 72°C por 12 segundos); 72°C por 7 minutos e resfriamento a 4°C. Os produtos obtidos foram analisados em gel de agarose 1%. As bandas foram recortadas e recuperadas do gel, seguindo protocolo do kit Wizard® SV gel and PCR clean-up system (Promega). O PCR de colônia para confirmação das clonagens ou confirmação dos mutantes de *C. violaceum* foi feito como descrito acima, com as seguintes diferenças: as colônias bacterianas foram utilizadas diretamente como molde de DNA e foi utilizada uma Taq DNA polimerase comum.

3.3.2 Digestão de DNA com enzimas de restrição

Os produtos das reações de PCR e os plasmídeos utilizados para as clonagens foram digeridos com as enzimas de restrição apropriadas (Tabela 2) em tampão fornecido pelo fabricante (Thermo Scientific) por 2 ou 3 horas, dependendo da enzima, a 37 °C. As digestões foram limpas usando o kit Wizard® SV gel and PCR clean-up system (Promega) e analisadas em gel de agarose 1%.

3.3.3 Ligação de DNA e transformação por eletroporação

A ligação dos insertos nos vetores digeridos com as enzimas de restrição apropriadas foi feita usando a enzima T4 DNA ligase (Biolabs) em tampão apropriado, por 16 horas a 16°C. A ligação (3 µl) foi transformada em *E. coli* DH5α (40 µl de células) por eletroporação em cubetas de 0,2 cm (Biorad), usando os seguintes parâmetros: 2500 V, 200Ω, 25 µF. Após a eletroporação, as células foram recuperadas em 600 µl de meio LB por 1 hora sob agitação e espalhadas em placas de meio LB suplementado com antibiótico adequado. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas.

3.3.4 Sequenciamento de DNA

As reações foram feitas utilizando o kit BigDye Terminator V3.1 (Applied Biosystems), com oligonucleotídeos adequados, conforme protocolo do fabricante. A precipitação das reações foi feita com isopropanol 62,5% final e a lavagem com etanol 70%. Os sequenciamentos foram feitos no ABI 3500XL do Núcleo de Serviços em Biotecnologia (NSB) na Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto.

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados para clonagens

Nome	Sequência 5'→3'	Descrição
CV0769Exp-Fw	ccagct <u>catatg</u> agtccaaacaagtccttttc	Fragmento NdeI/BamHI 501 pb,
CV0769Exp-Rv	aatgcag <u>gatcct</u> cagccgccgagcttgctc	clonar <i>emrR</i> no vetor pET15b
CV0769_comp_Fw	ttggcact <u>gcag</u> caaataagcctgcccgtggc	Fragmento PstI/SacI 775 pb,
CV0769_comp_Rv	ttggcagagctccaatgatgcatgtcggtccg	clonar <i>emrR</i> no vetor pMR20
Operon_Emr_del1	taccggaagcttaggaagtgtcctgacccgc	Fragmento HindIII/BamHI 662
Operon_Emr_del2	taccg <u>gggatcc</u> attctgttgccg'gcgacgg	pb, mutação do operon <i>emrCAB</i>
Operon_Emr_del3	taccg <u>gggatcc</u> accgagcatgtgacccagtac	Fragmento BamHI/EcoRI 655
Operon_Emr_del4	taccgga <u>aattc</u> ggagacggacccggagtttttc	pb, mutação do operon <i>emrCAB</i>

A região sublinhada indica os sítios das enzimas de restrição.

3.3.5 Clonagem do gene *emrR* em vetor de expressão

O gene *emrR* foi amplificado por PCR e clonado no vetor pET-15b, de modo que a expressão da proteína fusionada com uma cauda de histidina na sua extremidade aminoterminal permita a purificação por cromatografia de afinidade. Os produtos das reações de PCR e o vetor pET-15b foram digeridos com as enzimas de restrição BamHI e NdeI e ligados como descrito acima. A confirmação da clonagem foi feita por PCR de colônia. As colônias positivas foram inoculadas em meio LB com ampicilina e o DNA plasmidial foi extraído seguindo protocolo do kit Wizard® plus SV minipreps DNA Purification System (Promega). Após confirmação da clonagem e extração do DNA plasmidial foi

feita reação de sequenciamento. O plasmídeo recombinante pET-15b com o gene *emrR* clonado foi transformado em *E. coli* BL21(DE3) por eletroporação, e esta linhagem foi congelada em glicerol 10% no freezer -80°C.

3.3.6 Complementação do mutante $\Delta emrR$

Para complementação do mutante $\Delta emrR$, o fragmento de DNA contendo o gene *emrR* (775 pb) foi amplificado por PCR e clonado no vetor pMR20, utilizando as enzimas de restrição PstI e SacI, conforme descrito acima. Esta construção pMR20(*emrR*) ou o vetor vazio pMR20 foram introduzidas em *C. violaceum* selvagem e $\Delta emrR$ por conjugação com *E. coli* S17-1. Todos os transconjugantes foram selecionados em placas LB com ampicilina (100 µg/ml) e tetraciclina (10 µg/ml). O mutante complementado ($\Delta emrR$ pMR20*emrR*), além de *C. violaceum* ATCC 12472 e $\Delta emrR$ com vetor pMR20 vazio, foram congelados em glicerol 20% no freezer -80°C.

3.3.7 Obtenção de mutante espontâneo para *emrR*

A linhagem *C. violaceum* ATCC 12472 foi inoculada em 20 ml de LB (inóculo inicial OD_{600nm} de 0,01) e cultivada a 37°C sob agitação por 24 horas. Posteriormente, 500 µl desta cultura foram espalhados em placas LB com concentrações crescentes do antibiótico ácido nalidíxico (0,5 a 16 µg/ml), incubadas a 37°C por 24 horas. Após análise dessas placas, as colônias que vieram nas placas de 1,0 a 16 µg/ml foram repicadas em placa LB sem antibiótico. Em seguida, foi feito MIC em placa LB com concentrações crescentes de ácido nalidíxico. Após análise dessas placas foram selecionadas 7 colônias que vieram do MIC 1 µg/ml para reação de sequenciamento do gene *emrR*. Foi feito PCR das 7 colônias selecionadas, com os oligonucleotídeos Fw/Rv utilizados para expressar EmrR (Tabela 2). Os produtos desse PCR foram purificados e sequenciados, conforme descrição já mencionada acima. Após análise do sequenciamento, uma colônia que possuía mutação espontânea em *emrR* (CV_0769R92H) foi congelada no freezer -80°C. Esse experimento foi feito com a colaboração da aluna de mestrado Bianca Batista.

3.3.8 Construção da linhagem mutante $\Delta emrCAB$ de *C. violaceum*

O mutante do operon *emrCAB* foi construído pela técnica de deleção por troca alélica, já estabelecida no laboratório. Para isto, os dois produtos do PCR das regiões flanqueadoras do operon foram digeridos internamente com BamHI. Estes fragmentos digeridos foram ligados usando T4 DNA ligase e amplificados por PCR (oligos del1/del4, Tabela 2). O fragmento completo, contendo as regiões flanqueadoras unidas, foi digerido na região externa (del1/del4), assim como o vetor pNPTS138, com as enzimas de restrição HindIII e EcoRI. Em seguida, foi feita a ligação, transformação e confirmação da clonagem, conforme descrito acima.

A construção final pNPTS138 $\Delta emrCAB$ foi transformada em *E. coli* S17-1 por eletroporação para conjugação com *C. violaceum*. Após 24 horas em placa LB, a conjugação foi espalhada em placa LB com ampicilina (100 µg/ml) e canamicina (50 µg/ml). As colônias que crescerem nessa placa foram cultivadas por 48 horas sob agitação a 37°C em meio LB líquido, e foi feita a seleção em placa LB com 12% sacarose. As colônias resistentes a sacarose foram testadas para sensibilidade a canamicina. Após estas etapas de seleção, foi feito PCR de colônia para confirmação do mutante, utilizando os oligonucleotídeos Operon_Emr_del1 e Operon_Emr_del4 (Tabela 2). Após confirmação do mutante por PCR, a linhagem mutante $\Delta emrCAB$ foi congelada no freezer -80°C. Os mutantes dos fatores de transcrição da família MarR foram obtidos no Doutorado da aluna Maristela P Mello (dados não publicados).

3.4 Expressão e purificação da proteína recombinante EmrR

Para verificar a expressão e a solubilidade e para a purificação da proteína recombinante EmrR, a linhagem de *E. coli* BL21(DE3) contendo a construção com o gene *emrR* clonado no pET-15b foi inoculada em 500 ml de meio LB com ampicilina (100 µg/ml) e mantida sob agitação a 37°C até atingir OD_{600nm} de 0,6. Neste ponto, foi adicionado IPTG 1 mM final e a cultura foi mantida sob agitação a 37°C por duas horas. Para verificar indução, alíquotas de 1 ml da cultura não induzida e com duas horas de indução foram coletadas,

centrifugadas por 5 minutos a 12000 x g e os pellets ressuspensos em tampão SDS Loading Buffer 2x. Para verificar a solubilidade e para a purificação, o pellet de células foi ressuspendido em 20 ml de tampão de lise (tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4; NaCl 300 mM; imidazol 50 mM, PMSF 1 mM). As bactérias foram rompidas por sonicação (10 pulsos de amplitude de 85% por 30 segundos) e a fração solúvel (sobrenadante) e insolúvel (pellet) foram obtidas por centrifugação (15 minutos a 4°C e 15000 x g).

A proteína recombinante His-EmrR foi purificada por cromatografia de afinidade a partir da fração solúvel tratada com estreptomicina 1% e filtrada com filtro de 0,45 µm. Foi utilizado protocolo recomendado pelo fabricante da coluna Ni-NTA Superflow 5 ml (Qiagen), acoplada a uma bomba peristáltica P1 (GE Healthscience). A coluna foi equilibrada com 50 ml de tampão (tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4; NaCl 300 mM; imidazol 50 mM), carregada com 20 ml do extrato solúvel e lavada com 50 ml de tampão de lavagem (tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4; NaCl 300 mM; imidazol 100 mM). A proteína foi eluída com 12 ml de tampão de eluição (tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4; NaCl 300 mM; imidazol 500 mM).

Os passos de indução e purificação foram acompanhados pela análise das amostras em gel SDS-PAGE 15%. O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 (BioRad) por 30 minutos e descorado com solução de descoloração (BioRad) por uma noite. As frações de eluição contendo a proteína purificada foram concentradas para 2,5 ml usando o sistema VivaSpin 6 (Sartorius) e a amostra foi dessalinizada utilizando coluna de filtração em gel PD-10 (GE Healthcare). A quantificação da proteína recombinante foi feita através de leitura de absorbância direta da proteína à 280_{nm}, e baseando-se na predição do peso molecular e coeficiente de extinção (ϵ) da proteína. Estes dados foram obtidos através da ferramenta de bioinformática Protparam Tool (ExPASy <http://www.expasy.ch>).

3.4.1 Dimerização *in vitro* da proteína recombinante EmrR

A proteína His-EmrR foi reduzida ou oxidada com 100 μ M e 1 mM de DTT, hidroperóxido de tert-Butyl, Hidroperóxido de cumeno (CuOOH), ou peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em tampão de estoque (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 5% glicerol) por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram tratadas com N-etilmaleimida (NEM) 100 mM por 2 horas. As reações foram analisadas em gel de poliacrilamida 15% SDS-PAGE e os géis foram corados com Comassie Brilliant Blue R-250 (BioRad) por 30 minutos e em seguida descorados com solução de descoloração (BioRad) por uma noite.

3.5 Testes de sensibilidade aos antibióticos

3.5.1 Antibiograma pela técnica de difusão em disco de Kirby & Bauer

O teste de difusão em disco foi feito seguindo as recomendações do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013). A linhagem selvagem ATCC 12472, *C. violaceum* com o vetor pMR20 (controle resistente a tetraciclina) e *C. violaceum* do evento de primeira recombinação da construção do mutante com o vetor pNPTS138 integrado (controle resistente a canamicina) foram utilizadas como controles. As linhagens controle e mutantes, cultivadas em placas MH por 20 horas, foram ressuspensas em solução salina estéril, seguindo o padrão 0,5 escala de MacFarland (DO_{600nm} de 0,1 equivalente a 1×10^8 UFC/ml). Essas suspensões foram semeadas em placas MH usando uma zaragatoa estéril. Após alguns minutos de secagem, foram distribuídos uniformemente na superfície das placas os discos em papel filtro com diâmetro de 6 mm impregnados com os 24 antibióticos (BD BBL™ Sensi-Disc™ Antimicrobial Susceptibility Test Discs) (Tabela 3). As placas com os discos foram incubadas a 37°C por 20 horas e os halos de inibição de crescimento foram medidos com régua e comparados com os halos gerados com a linhagem selvagem de *C. violaceum*. Estes ensaios foram feitos em triplicata.

Tabela 3: Antibióticos utilizados nos ensaios de antibiograma

Antibiótico	Classe	Abreviação	Quantidade
Ácido Nalidíxico		NA	30 µg
Ciprofloxacina		CIP	5 µg
Levofloxacina	Quinolonas	LVX	5 µg
Norfloxacina		NOR	10 µg
Canamicina		K	30 µg
Amicacina		AN	30 µg
Neomicina	Aminoglicosídeos	N	30 µg
Tobramicina		NN	10 µg
Cloranfenicol	Fenicóis	C	30 µg
Imipenem		IPM	10 µg
Meropenem	Carbapenêmicos	MEN	10 µg
Ampicilina		AM	10 µg
Amoxicilina/Ácido		AMC	30 µg
Clavulâmico	Penicilinas		
Ticarcilina		TIC	75 µg
Cefotaxima		CTX	30 µg
Ceftazidima		CAZ	30 µg
Cefoperazone	Cefalosporinas	CFP	75 µg
Cefoxitina		FOX	30 µg
Tetraciclina	Tetraciclinas	TE	30 µg
Doxicilina		D	30 µg
Fosfomicina	Outras classes	FOS	200 µg
Rifampina	Outras classes	RA	5 µg
Astreonamina	Monobactâmico	ATM	30 µg
Eritromicina	Macrolídeos	E	2 µg

3.5.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC)

3.5.2.1 Determinação do MIC pelo método de macrodiluição em tubos

As drogas a serem testadas foram dissolvidas como determinado pelo fabricante (Sigma) para o preparo das soluções estoque a 10 mg/ml ou 1

mg/ml. Estas soluções foram filtradas em membrana de 0,2 µm e armazenadas a -20°C. A obtenção das concentrações inibitórias dos antibióticos para o estudo baseou-se em testes iniciais, onde definimos o MIC para *C. violaceum* selvagem, testando dez diferentes concentrações de cada antibiótico. Com base nestes valores, escolhemos de quatro a seis concentrações em torno do MIC para cada droga testada, para os ensaios com os mutantes (ver abaixo).

A determinação do MIC foi realizada pelo método de macrodiluição em tubos de ensaio, seguindo as recomendações do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013). A linhagem selvagem ATCC 12472 e *C. violaceum* com o vetor pGFLR1, que possui gene que confere resistência a canamicina (BENEDETTI et al., 2012), foram utilizadas como controles. As linhagens foram cultivadas em placas MH e destas foi feito inóculo com cerca de $2,5 \times 10^5$ UFC/ml (DO_{600nm} de 0,01) de suspensão bacteriana em meio MH líquido. Este inóculo foi distribuído em tubos de ensaio de vidro (2 ml do inóculo em cada tubo) e as drogas foram adicionadas em quantidades crescentes, resultando nas concentrações indicadas abaixo:

- Canamicina e estreptomicina: 0 (controle sem antibiótico), 8 µg/ml, 16 µg/ml, 32 µg/ml, 64 µg/ml, 128 µg/ml;
- Tetraciclina: 0 (controle sem antibiótico), 0,125 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml;
- Ácido nalidíxico: 0 (controle sem antibiótico), 1 µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml, 8 µg/ml, 16 µg/ml, 32 µg/ml.
- Eritromicina: 0 (controle sem antibiótico), 2 µg/ml, 4 µg/ml, 8 µg/ml, 16 µg/ml, 32 µg/ml, 64 µg/ml.
- Cloranfenicol: 0 (controle sem antibióticos), 4 µg/ml, 8 µg/ml, 16 µg/ml, 32 µg/ml, 64 µg/ml, 128 µg/ml.
- Cefotaxima: 0 (controle sem antibióticos), 64 µg/ml, 128 µg/ml, 256 µg/ml, 512 µg/ml.
- Doxiclina: 0 (controle sem antibióticos), 0,25 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml.
- Carbonil Cianeto m-Clorofenilidrazona (CCCP): 0 (controle sem droga), 2 µg/ml, 4 µg/ml, 8 µg/ml, 16 µg/ml, 32 µg/ml.

- Hidroperóxido de cumeno (CuOOH): 0 (controle sem droga), 4 µg/ml, 8 µg/ml, 16 µg/ml, 32 µg/ml, 64 µg/ml.
- Salicilato: 0 (controle sem droga), 256 µg/ml, 512 µg/ml, 1024 µg/ml, 2048 µg/ml, 4036 µg/ml.

Após 24 horas de cultivo sob agitação a 37°C, o crescimento bacteriano nos diversos tubos foi avaliado visualmente pela ausência ou presença de turbidez das culturas em relação ao controle positivo (sem antibióticos, turvo) e negativo (sem bactérias, ausência total de turbidez).

3.5.2.2 Determinação do MIC em placas

Neste ensaio as linhagens *C. violaceum* ATCC 12472, $\Delta emrR$, *C. violaceum* pMR20Ø, $\Delta emrRpMR20Ø$, $\Delta emrRpMR20emrR$ e CV_0769R92H, foram cultivadas em meio LB por 24 horas. Em seguida, as linhagens foram estriadas em placas LB com concentrações crescentes de ácido nalidíxico (0, 0,5, 1,0 e 2,0 µg/ml). As placas foram incubadas a 37°C por uma noite e analisadas quanto ao crescimento.

3.5.3 Ensaio de viabilidade

As linhagens *C. violaceum* ATCC 12472, $\Delta emrR$, *C. violaceum* pMR20Ø, $\Delta emrRpMR20Ø$ e $\Delta emrRpMR20emrR$ foram repicadas em placas MH e usadas para preparação do pré-inóculo em 2 ml de meio MH. Estas culturas foram utilizadas para preparo dos inóculos (OD_{600nm} de 0,01) em 10 ml de meio MH em frascos erlenmeyer. As culturas foram cultivadas sob agitação a 37°C até atingirem OD_{600nm} de 0,5. Nesse ponto, a cultura foi dividida em duas, sendo que uma delas ficou na ausência e a outra na presença de 64 µg/ml do antibiótico ácido nalidíxico. As culturas foram mantidas sob agitação a 37°C e foram retiradas alíquotas de 1 ml após 1 hora e 2 horas de cultivo. A partir das alíquotas de 1 ml retiradas nos diferentes tempos de cultivo foi feita diluição seriada (900 µl de meio MH e 100 µl da cultura) em placa de 96 poços. As culturas diluídas foram então inoculadas em placa MH e incubadas a 37°C por uma noite para contagem das unidades formadoras de colônia (UFC).

3.6 Ensaios de expressão gênica

3.6.1 Extração de RNA total

As linhagens *C. violaceum* ATCC 12472 e $\Delta ermR$, armazenadas em glicerol no freezer -80°C , foram inoculadas em placa LB. Em seguida, foi feito pré-inóculo em 5 ml de LB a 37°C sob agitação por 24 horas. A partir dessa cultura foi feito inóculo em 10 ml de LB diluindo as culturas para $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 0,01; essas culturas foram mantidas a 37°C sob agitação até atingirem $\text{OD}_{600\text{nm}}$ de aproximadamente 0,8. Neste ponto, foram coletados 3 ml de cada cultura. Após centrifugação a $16000 \times g$ por 1 minuto, os pellets foram ressuspensos em 1 ml de Trizol (Invitrogen). Os tubos foram incubados a 65°C por 10 minutos e em seguida foi adicionado 200 μl de clorofórmio. A mistura foi homogeneizada, invertendo os tubos por 15 segundos, e incubada à temperatura ambiente por 5 minutos. Após centrifugação por 15 minutos a $12000 \times g$ a 4°C , a fase aquosa foi coletada e o RNA foi purificado usando o *kit illustra RNAspin Mini*, conforme recomendação do fabricante (GE Healthcare). Resumidamente, as amostras foram pré-filtradas na coluna *RNAspin Mini Filter* e misturadas com 350 μl de etanol 70%. Após esse tratamento, a mistura foi transferida para a coluna *RNAspin Mini* e foi feita dessalinização com *Desalting Buffer*. A digestão em coluna para eliminar qualquer tipo de contaminação por DNA foi feita com *DNase I* em *DNase Reaction Buffer*, incubada a 25°C por 15 minutos. Os RNAs foram lavados com *Wash Buffer I* e *Wash Buffer II* e eluídos em 65 μl de água. A integridade dos RNA foi avaliada em gel de agarose 1,2% desnaturante e a quantificação foi feita utilizando NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Scientific).

3.6.2 Ensaios de Microarranjos de DNA

Os experimentos comparando o perfil de expressão gênica por microarranjo de DNA foram feitos com as linhagens *C. violaceum* ATCC 12472 e $\Delta ermR$ cultivadas em meio LB a 37°C em fase exponencial. Os RNAs foram extraídos e quantificados como descrito acima. As lâminas de microarranjo de DNA customizadas foram produzidas pela Agilent Technologies e já foram

utilizadas com sucesso em nosso laboratório (PREVIATO-MELLO et al., 2017). O design, realizado usando a plataforma e-array, consiste de 4x44k, contendo pelo menos 3 sondas de oligonucleotídeos em triplicata, cobrindo todas as 4.407 fases abertas de leitura do genoma da linhagem ATCC 12472 de *C. violaceum*.

3.6.2.1 Preparação das sondas de cRNA marcado com fluoróforos

As amostras de RNA total tratado com DNAase (100 ng) foram utilizadas para produzir cRNA (RNA complementar) marcado com os fluoróforos Cy3 e Cy5, utilizando o *kit Low Input Quick Amp WT Two-Color*, de acordo com as instruções do fabricante (Agilent Technologies). A purificação das sondas marcadas com os fluoróforos foi feita usando o *kit Illustra RNA spin Mini* (GE Healthcare). As amostras purificadas foram quantificadas utilizando NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Scientific).

3.6.2.2 Hibridização e lavagens

Foi feita hibridização competitiva das sondas de cRNA marcadas (850 ng de cada) nas lâminas de microarranjo de DNA. Para isto, as sondas foram fragmentadas em *fragmentation buffer*, misturadas e aplicadas nas lâminas. A hibridização foi feita a 65°C por 17 horas sob agitação em forno apropriado. Após a hibridização, o aparato foi desmontado e as lâminas foram lavadas da seguinte forma: imersão sequencial em GE buffer 1 por 1 minuto em temperatura ambiente, em GE buffer 2 por 1 minuto a 37°C, em acetonitrila por 10 segundos em temperatura ambiente e em *Stabilization and Drying Solution* por 30 segundos em temperatura ambiente.

3.6.2.3 Aquisição das imagens e análises dos dados

As lâminas foram escaneadas com o *Agilent DNA Microarray Scanner* (Prof. Geraldo Passos, Genética, FMRP-USP) e os dados foram extraídos e normalizados pelo *software Agilent Feature Extraction*, versão 10.5. Esses dados foram transferidos para tabelas Excel para análise. Os valores de

expressão relativa de cada gene foram calculados como a média dos valores de 27 sondas (9 sondas de triplicatas biológicas).

3.6.3 Northern Blot

Foi feito pré-inóculo com a linhagem *C. violaceum* ATCC 12472 em 5 ml de LB. Dessa cultura de 24 horas foi feito inóculo em 100 ml de LB diluindo a cultura para OD_{600nm} de 0,01; essa cultura foi mantida sob agitação até atingir OD_{600nm} de aproximadamente 0,8. Neste ponto, a cultura foi dividida em alíquotas de 10 ml, as quais foram tratadas por dez minutos com os seguintes agentes: 0,1 mM, 1 mM e 10 mM de salicilato de sódio; 100 µM, 200 µM e 500 µM de ácido nalidíxico; 100 µM, 200 µM e 500 µM de brometo de etídeo. A extração do RNA foi feita como já descrito acima. Para o $\Delta emrR$ foi utilizado o RNA do microarranjo de DNA.

A sonda, que compreende um fragmento interno do gene CV_0767 (*emrA*), foi amplificada por PCR com os oligonucleotídeos específicos (Tabela 4). Este produto de PCR (25 ng) foi usado para marcar a sonda com [α -³²P]-dCTP (PerkinElmer) com o *kit Exo-Klenow enzyme DECAprime II* (Ambion). Os RNAs foram separados em gel desnaturante de agarose e sua transferência para a membrana de nylon foi realizada por capilaridade. O sistema de transferência foi montado da seguinte forma: uma ponte de papel 3M para cromatografia, gel com RNA e membrana de nylon embebidos em tampão 10x SSC (0,34 M de citrato trissódico anidro, 3 M de NaCl). Sobre este aparato foram colocadas folhas de papel e a transferência ficou em temperatura ambiente por uma noite. Após fixação com UV, a membrana foi pré-hibridizada em 10 ml de *ULTRAhyb* (Ambion) a 42 °C por 30 minutos e incubada com a sonda marcada a 42°C por 16 h. As membranas foram lavadas duas vezes a 42°C por 5 minutos em 2 x SSC com 0,1% SDS e duas vezes a 42°C por 15 minutos em 0,1 x SSC com 0,1% SDS. Após as lavagens a membrana foi seca e exposta em *hyperfilm ECL* (Amersham).

Tabela 4: Oligonucleotídeos utilizados nos ensaio de EMSA e Northern blot

Nome	Sequência 5'→3'	Descrição
CV0208CDS-Fw	ttggatccgaaggccaggcgctgcatct	Fragmento 243 bp da região
CV0208CDS-Rv	attactgcagctgtcgctgctgcgcacgaa	codificadora de CV_0208
CV0093ProFw	tggaggacgaggaaagctga	Fragmento 354 pb da região
CV0093ProRv	gcgtcgggcaaggcgctctat	promotora de CV_0093
CV0769del3	tataagcttggtgagcccgcgcttttc	Fragmento 104 pb da região
CV0769_comp_Rv	ttggcagagctccaatgatgcatgtcggtccg	promotora de <i>emrCAB</i>
CV0769_comp_Fw	ttggcactgcagcaaataagcctgcccggtggc	Fragmento 211 pb da região
CV0769del2	tataagcttctgtttgactcatgcggcc	promotora de <i>emrR</i>
CV1639ProFw	tggaggacgaggaaagctga	Fragmento 204 pb da região
CV1639ProRv	atcggaagcatagccggcga	promotora de CV_1639
CV1769ProFw	aaggcggaaatcccggtcag	Fragmento 216 pb da região
CV1769ProRw	gtaccggccagagtacggta	promotora de CV_1769
CV2036ProFw	atgcatggctgttgaggctg	Fragmento 247 pb da região
CV2036ProRv	tgcggaaagtgcgttcggt	promotora de CV_2036
CV2423ProFw	tgatcccgcctctttcgctt	Fragmento 236 pb da região
CV2423ProRv	gctattgagcaggcggacga	promotora de CV_2423
CV2424ProFw	atgcctcagtaccagggtga	Fragmento 226 pb da região
CV2424ProRv	ctcgaggaaacagggtgatct	promotora de CV_2424
CV3014ProFw	tgggacctgccgtcgatgcc	Fragmento 185 pb da região
CV3014ProRv	gctcatgccgaacagcacat	promotora de CV_3014
CV3323ProFw	tgatcgtctcttaccgggcc	Fragmento 311 pb da região
CV3323ProRv	gccatgacgaggtgcttaa	promotora de CV_3323
CV3757ProFw	atcaccgcccgaacacttc	Fragmento 229 pb da região
CV3757ProRv	ccatagcggcgtgccgtact	promotora de CV_3757
CV_0766 NB-Fw	cgcccagaccgtgcgccag	Fragmento 324 pb interno a
CV_0766 NB-Rv	gtgcgctgcagcgcgagcc	CV_0767 (<i>emrA</i>)

3.7 Ensaio de alteração de mobilidade eletroforética em gel (EMSA)

As regiões promotoras dos genes CV_0093, CV_0768, CV_0769, CV_1639, CV_1769, CV_2036, CV_2423, CV_2424, CV_3014, CV_3323,

CV_3757 ou um fragmento interno de CV_0208 (controle inespecífico) foram amplificadas por PCR com os oligonucleotídeos específicos (Tabela 4). Os produtos foram analisados em gel de agarose 1% e as bandas foram recortadas e purificadas. Estes fragmentos de DNA foram marcados com [γ - ^{32}P]-ATP (PerkinElmer) usando T4 polinucleotídeo quinase (Thermo Scientific), e purificados com o kit Wizard[®] SV gel and PCR clean-up system (Promega). As reações de ligação ao DNA foram feitas em um volume final de 20 μl contendo tampão de interação (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM KCl, 1 mM EDTA pH 8.0, albumina de soro bovino 50 $\mu\text{g/ml}$, 5% glicerol), as sondas de DNA e diferentes quantidades da proteína EmrR reduzida com 10 mM de DTT. As reações foram incubadas a 25°C por 25 minutos. Após a adição de glicerol, os complexos DNA/proteína foram carregados em gel poliacrilamida 5% nativo e submetidos à eletroforese em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5 x. Os géis foram secos e o sinal detectado por autorradiografia.

4. RESULTADOS

4.1 Identificação de fatores de transcrição envolvidos em resistência a antibióticos em *C. violaceum*

Para identificar fatores de transcrição da família MarR importantes para resistência a antibióticos em *C. violaceum*, foram feitos ensaios de sensibilidade a antibióticos usando a linhagem *C. violaceum* selvagem e treze linhagens mutantes MarR já disponíveis no laboratório, construídas pela aluna de doutorado Maristela Previato (dados não publicados). Devido sua praticidade, o teste de difusão em disco foi escolhido para a varredura geral. Para definirmos a sensibilidade deste teste, realizamos ensaios piloto utilizando como controle *C. violaceum* com o vetor pMR20, que confere resistência a tetraciclina e *C. violaceum* com o vetor pNPTS138 integrado no genoma, que é resistente a canamicina. Conforme esperado, ambas as linhagens controle apresentaram menor susceptibilidade aos respectivos antibióticos. Houve redução do tamanho do halo de inibição em 10,0 mm no controle resistente a canamicina e em 13 mm no controle resistente a tetraciclina, quando comparados com *C. violaceum* ATCC 12472 (Figura 3), indicando que o ensaio de difusão em disco poderia ser utilizado para nossa varredura.

O perfil de sensibilidade aos antimicrobianos foi então realizado por ensaio de difusão em disco para 24 antibióticos distintos representativos de todas as principais classes para a *C. violaceum* selvagem e para as treze linhagens mutantes dos fatores de transcrição da família MarR (Figura 4). Analisando inicialmente apenas a linhagem selvagem, verificamos que *C. violaceum* apresenta variados níveis de susceptibilidade aos diferentes antibióticos: enquanto para alguns como ampicilina (AM), amoxicilina/ácido clavulâmico (AMC), ticarcilina (TIC), cefotaxima (CTX) e cefoxitina (FOX) ela mostrou-se bastante resistente (halos pequenos ou ausentes), para outros das classes das quinolonas, carbapenêmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina e fenicóis ela mostrou-se bastante susceptível, com halos de inibição de crescimento variando de 25 mm a 40 mm (Figura 4).

Figura 3: Ensaio de difusão em disco com linhagens controle de *C. violaceum*. A linhagem selvagem ATCC 12472 e *C. violaceum* contendo o vetor pMR20 ou o vetor pNPTS138 integrado (primeira recombinação) foram testadas com discos de canamicina e tetraciclina. Este ensaio foi realizado em placa com MH em triplicata.

Comparando o antibiograma dos 24 antibióticos da linhagem selvagem com aquele obtido para as treze linhagens mutantes dos fatores de transcrição da família MarR, verificamos que para a grande maioria não houve diferença significativa, ou em alguns casos o desvio padrão ficou muito grande para concluirmos qualquer coisa (Figura 4). No entanto, para o mutante ΔCV_0769 com o antibiótico ácido nalidíxico observamos uma diminuição de 13,3 mm do tamanho do halo de inibição de crescimento em relação à linhagem selvagem, indicando que ΔCV_0769 é mais resistente a este antibiótico (Figura 4). Portanto, nestes ensaios de difusão em disco conseguimos identificar CV_0769 como um fator de transcrição da família MarR importante para resistência a antibiótico em *C. violaceum*.

Como a nossa varredura por ensaio de difusão em disco teve certa variação entre as réplicas para alguns antibióticos e como conseguimos identificar apenas um mutante com sensibilidade alterada a antibióticos, resolvemos repetir a varredura, mas desta vez através de testes de concentração inibitória mínima (MIC), para a linhagem selvagem e os treze mutantes MarR com oito antibióticos (Tabela 5).

Figura 4: Ensaio de difusão em disco com *C. violaceum* selvagem e os treze mutantes dos fatores de transcrição da família MarR. Os ensaios foram realizados em placas com meio MH em triplicata. O desvio padrão é indicado pelas barras de erro. Ácido Nalidíxico (NA), Ciprofloxacina (CIP), Levofloxacina (LVX), Norfloxacina (NOR), Canamicina (K), Amicacina (AN), Neomicina (N), Tobramicina (NN), Cloranfenicol (C), Imipenem (IPM), Meropenem (MEN), Ampicilina (AM), Amoxicilina/Ac Clavulâmico (AMC), Ticarcilina (TIC), Cefotaxima (CTX), Ceftazidima (CAZ), Cefoperazone (CFP), Cefoxitina (FOX), Tetraciclina (TE), Doxiciclina (D), Eritromicina (E), Fosfomicina (FOS), Rifampina (RA), Astreonamina (ATM). O valor de 6 mm indica ausência de halo, pois é o diâmetro dos discos.

Para padronizar este ensaio de MIC utilizamos como controle *C. violaceum* com o vetor pGLFR1 que confere resistência a canamicina. Conforme esperado, o gene de resistência a canamicina presente neste vetor aumentou em 5 vezes o MIC para canamicina (de 32 µg/ml para 1024 µg/ml) quando comparado com a linhagem selvagem, validando assim o ensaio (Tabela 5). Com relação ao MIC destes antibióticos na linhagem selvagem, verificamos que para alguns houve concordância com MICs determinados para isolados clínicos de *C. violaceum* (cloranfenicol e doxiciclina), enquanto para outros antibióticos (cefotaxima e ácido nalidíxico) houve alguma diferença, com MICs mais elevados no nosso estudo (ALDRIDGE; VALAINIS; SANDERS, 1988). Quando comparamos os valores de MIC da linhagem selvagem com os valores obtidos para os treze mutantes MarR, verificamos novamente que apenas a linhagem mutante ΔCV_0769 apresentou maior resistência ao antibiótico ácido nalidíxico (aumento do MIC em 2 vezes, de 16 µg/ml para 64 µg/ml) (Tabela 5).

Tabela 5: Determinação do MIC para oito antibióticos de *C. violaceum* selvagem e dos treze mutantes MarR em meio MH líquido

	MIC (µg/ml)							
	Cana micina	Estrepto micina	Tetraci clina	Cloranfe nicol	Eritromicina	Ácido Nalidíxico	Cefotaxima	Doxiciclina
<i>C. violaceum</i> ATCC 12472	32	32	1	8	16	16	256	2
ΔCV_0047	32	32	1	8	16	16	256	2
ΔCV_0210	32	32	1	8	16	16	256	2
ΔCV_0539	32	32	1	8	16	16	256	2
ΔCV_0577	32	32	1	8	*	16	256	2
ΔCV_0769	32	32	1	8	*	64	256	2
ΔCV_1776	32	32	1	8	16	16	*	2
ΔCV_1810	32	32	1	8	16	16	256	*
ΔCV_2726	32	32	1	8	16	16	*	*
ΔCV_2844	32	32	1	8	16	16	256	*
ΔCV_3160	32	32	1	8	16	16	256	2
ΔCV_3383	32	32	1	8	*	16	256	*
ΔCV_3636	32	32	1	8	*	16	256	*
ΔCV_3905	32	32	1	8	16	16	256	2
<i>C. violaceum</i> pGFLR1	1024	*	*	*	*	*	*	*

*Não determinado.

4.2 Papel do sistema EmrR/EmrCAB na resistência a antibiótico em *C. violaceum*

Como mostrado nos ensaios de difusão em disco e MIC apenas o mutante ΔCV_0769 dentre 13 mutantes nulos de reguladores da família MarR, mostrou-se mais resistente ao antibiótico ácido nalidíxico. Análises feitas no genoma sequenciado de *C. violaceum* ATCC 12472 indicaram que CV_0769 está anotado como *emrR* e localiza-se próximo ao operon *emrCAB*, o qual codifica uma possível bomba de efluxo. Assim, o sistema EmrR/EmrCAB foi selecionado neste trabalho para uma caracterização mais aprofundada, conforme segue abaixo.

4.2.1 Deleção total ou mutação pontual em *emrR* aumenta a resistência a ácido nalidíxico em *C. violaceum*

As bactérias podem se tornar resistentes aos antibióticos por mutações espontâneas. Uma maneira de se obter esses mutantes espontâneos é através do cultivo das bactérias em concentrações subinibitórias de antibiótico (LEE; HELMANN, 2014). Assim, realizamos o cultivo de *C. violaceum* selvagem em concentrações subinibitórias de ácido nalidíxico para tentar isolar mutantes espontâneos em *emrR*. Após o sequenciamento do gene *emrR* de algumas colônias obtidas de placas LB com 1 µg/ml de ácido nalidíxico, encontramos dois clones que possuíam uma troca de uma arginina por uma histidina na posição 92 da proteína EmrR, o qual chamamos de mutante espontâneo CV_0769R92H (Figura 5). Estes resultados indicam que mutantes espontâneos para este antibiótico podem emergir por mutações pontuais em EmrR em *C. violaceum*. Em uma estratégia semelhante, quando *Bacillus subtilis* foi cultivado em condições subinibitórias de vancomicina e cefuroxima, após sequenciamento do genoma foram encontradas três mutações, *rhoG56C*, *sigAG336C* e *merBL201S*, relacionadas com o aumento de resistência a vancomicina e cefuroxima (LEE; HELMANN, 2014).

Range 1: 15 to 166 [GenPept](#) [Graphics](#)

▼ Next Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives
307 bits(786)	7e-110	Compositional matrix adjust.	150/152(99%)	151/152(99%)
Query 15	HRVESRFPGVPRQEVILTRLIFHIVPRLTSHLCECLKQHGLNETVWMALLALYACPNQML			194
Sbjct 15	+RVESRFPGVPRQEVILTRLIFHIVPRLTSHLCECLKQHGLNETVWMALLALYACPNQML			74
Query 195	NPSDISETLDSSRTNATHIADELVKNGWAARSASAEDRRKIVLELTPAGVELVEGLLPYS			374
Sbjct 75	NPSDISETLDSSRTNATIADELVKNGWAARSASAEDRRKIVLELTPAGVELVEGLLPYS			134
Query 375	REIHRSLWADFEADEKAELERLMRKLLSKLGG			470
Sbjct 135	REIHRSLWADFEADEKAELERLMRKLLSKLGG			166

Figura 5: Análise do sequenciamento para o mutante espontâneo do gene *emrR*.

O sequenciamento do DNA indicou a troca de um G por um A que resultou na troca de arginina para histidina na posição 92 da proteína EmrR. A figura mostra um alinhamento feito com a ferramenta BLASTX.

Para confirmar que o fenótipo de maior resistência ao ácido nalidíxico do mutante nulo $\Delta emrR$ é devido a deleção do gene *emrR*, a linhagem mutante foi complementada com a construção pMR20*emrR*. Além disso, o vetor pMR20 $\emptyset$ foi introduzido na linhagem selvagem e no $\Delta emrR$, como controles. Além destas linhagens, também incluímos o mutante espontâneo CV_0769R92H obtido como descrito acima. Usando estas linhagens em ensaios de concentração inibitória mínima (MIC) (Tabela 6), ensaios de difusão em disco (Figura 6) e ensaios de viabilidade e MIC em placa (Figura 7) confirmamos o fenótipo de resistência ao antibiótico ácido nalidíxico para os mutantes $\Delta emrR$ e CV_0769R92H e mostramos a reversão ao fenótipo selvagem na linhagem complementada do mutante $\Delta emrR$ (Tabela 6, Figuras 6 e 7). Os ensaios de MIC também foram realizados usando outros agentes conhecidos como indutores de reguladores MarR (CCCP, salicilato e hidroperóxido de cumeno CuOOH). No entanto, o mutante $\Delta emrR$ não mostrou fenótipo de resistência a nenhum destes agentes, sendo inclusive mais sensível ao salicilato (Tabela 6).

Tabela 6: Determinação do MIC para linhagens de *C. violaceum*, determinada pela técnica de macrodiluição em meio MH líquido

MIC µg/ml				
	Ácido Nalidíxico	CCCP	Salicilato	CuOOH
<i>C. violaceum</i> ATCC 12472	16	16	1024	16
<i>C. violaceum</i> pMR20Ø	16	16	1024	16
$\Delta emrR$ pMR20 $emrR$	16	16	1024	16
$\Delta emrR$	64	16	512	16
$\Delta emrR$ pMR20Ø	64	16	512	16
CV_0769R92H	64	16	512	16

Figura 6: Ensaios de difusão em disco. Os ensaios foram realizados em placas com meio MH em triplicata. O desvio padrão é indicado pelas barras de erro. **(A)** Antibiograma com ácido nalidíxico (NA) com a complementação do mutante $\Delta emrR$ ($\Delta emrR$ pMR20 $emrR$) e linhagens controle contendo o vetor pMR20 vazio. **(B)** Antibiograma com tetraciclina (TE) para verificar efeito do vetor pMR20 vazio. **(C)** Antibiograma com mutante espontâneo CV_0769R92H com quatro quinolonas: NA, ácido nalidíxico; CIP, ciprofloxacina; LVX, levofloxacina; NOR, norfloxacina.

Como o vetor pMR20 confere resistência a tetraciclina por bomba de efluxo, foi feito ensaio de difusão em disco com *C. violaceum* pMR20Ø com tetraciclina a fim de verificar se esse mecanismo poderia interferir no fenótipo do $\Delta emrR$. Conforme esperávamos, o vetor pMR20 conferiu resistência a tetraciclina (diminuição no halo de 25 para 10 mm) (Figura 6B), mas praticamente não interferiu no fenótipo das linhagens em relação ao ácido nalidíxico (comparar cada linhagem com e sem o vetor vazio, Tabela 6, Figura 6A e Figura 7). Assim como já verificado para o mutante nulo $\Delta emrR$ (Figura 4), o mutante espontâneo CV_0769R92H não mostrou resistência cruzada para outras quinolonas, sendo a resistência específica para ácido nalidíxico (Figura 6C).

Figura 7: Ensaio de viabilidade e ensaio de MIC em placa. (A) Ensaio de viabilidade realizado em meio MH na ausência e na presença de ácido nalidíxico. **(B)** Ensaio de MIC em placa LB com concentrações crescentes de ácido nalidíxico. 1 *C. violaceum* ATCC 12472; 2 $\Delta emrR$; 3 CV_0769R92H; 4 *C. violaceum* pMR0Ø; 5 $\Delta emrRp$ MR20 $emrR$; 6 $\Delta emrRp$ MR20Ø.

Durante os ensaios com o mutante $\Delta emrR$ verificamos que ele não produz violaceína quando cultivado em meio líquido, mesmo em fase estacionária tardia, embora produza este pigmento normalmente quando cultivado em placa. Usando as mesmas linhagens descritas acima, confirmamos que este fenótipo é devido realmente a ausência de *emrR*, pois após complementação o mutante $\Delta emrR$ volta a produzir violaceína como visto na linhagem selvagem (Figura 8).

Figura 8: Complementação do fenótipo de ausência de violaceína de $\Delta emrR$. Culturas das linhagens *C. violaceum* pMR20Ø, $\Delta emrR$ pMR0Ø e $\Delta emrRpMR20emrR$ (complementada), cultivadas em meio LB líquido com tetraciclina por 24 horas.

4.2.2 Mutação em *emrCAB* não afetou a resistência a antibiótico em *C. violaceum*

Um estudo de 2013 com *Stenotrophomonas maltophilia* mostrou que um mutante sem o operon *emrCABsm* e a proteína de membrana TolC, fica mais susceptível a vários antibióticos e outros compostos (HUANG et al., 2013). Pensando nisso, construímos um mutante para o operon *emrCAB* de *C. violaceum*, usando a estratégia de deleção por troca alélica com vetor suicida, já estabelecida no laboratório. Dois fragmentos que flanqueiam os genes deste operon foram amplificados por PCR e clonados no vetor suicida pNPTS138 e essa construção foi inserida em *C. violaceum* por conjugação. Em seguida foi feita seleção em canamicina e contra seleção em sacarose. A confirmação do

mutante $\Delta emrCAB$, feita por PCR de colônia com oligos que flanqueiam a região, indica que os três genes do operon foram deletados do cromossomo (Figura 9).

Figura 9: PCR de colônia para confirmação da linhagem mutante $\Delta emrCAB$. As reações de PCR foram feitas com os oligos operon-Emr_del1 e operon-Emr_del4, usando como molde colônias fervidas das linhagens *C. violaceum* selvagem (WT), primeira recombinação (1ª rec) e mutante final ($\Delta emrCAB$). M: marcador de peso molecular 1 kb plus DNA ladder (Thermo Scientific). Os tamanhos dos produtos de PCR esperados estão indicados.

Após a obtenção do mutante para o operon *emrCAB* foi feito ensaio de difusão em disco com vinte e quatro antibióticos distintos de diferentes classes. Comparando o antibiograma do mutante $\Delta emrCAB$ com a linhagem selvagem, vemos que não houve diferença significativa para a maioria dos antibióticos, incluindo o ácido nalidíxico (apenas para o antibiótico meropenem o mutante ficou mais resistente) (Figura 10). Esse resultado sugere que a possível bomba de efluxo EmrCAB não deve ter um papel relevante nas condições testadas, talvez porque esteja sendo mantida reprimida por EmrR. O fenótipo de maior resistência a ácido nalidíxico do mutante $\Delta emrR$ vai a favor desta hipótese.

Figura 10: Antibiógrama do mutante $\Delta emrCAB$ com vinte e quatro antibióticos de diferentes classes. Ácido Nalidíxico (NA), Ciprofloxacina (CIP), Levofloxacina (LVX), Norfloxacina (NOR), Canamicina (K), Amicacina (AN), Neomicina (N), Tobramicina (NN), Cloranfenicol (C), Imipenem (IPM), Meropenem (MEN), Ampicilina (AM), Amoxicilina/Ac Clavulâmico (AMC), Ticarcilina (TIC), Cefotaxima (CTX), Ceftazidima (CAZ), Cefoperazone (CFP), Cefoxitina (FOX), Tetraciclina (TE), Doxiciclina (D), Eritromicina (E), Fosfomicina (FOS), Rifampina (RA), Astreonamina (ATM). O valor de 6 mm indica o diâmetro dos discos.

4.3. Definição dos genes regulados por EmrR

4.3.1 EmrR atua como regulador negativo de seu regulon

A fim de definir quais genes EmrR estaria regulando foi feito ensaio de microarranjo de DNA comparando a linhagem selvagem e o mutante $\Delta emrR$ cultivados em meio LB em fase logarítmica. Neste ensaio verificamos que 22 genes tiveram expressão aumentada (*upregulated*) e 11 genes mostraram expressão diminuída (*downregulated*) no mutante $\Delta emrR$, sugerindo que EmrR deve atuar principalmente como repressor transcricional (Tabela 7).

Tabela 7: Definição do regulon de EmrR por análise de microarranjo de DNA

ORF	Gene	Função	Níveis de expressão
		Upregulated	
CV_0766	<i>emrB</i>	Provável proteína de resistência a múltiplas drogas (MFS)	9,67
CV_0767	<i>emrA</i>	Proteína de secreção de resistência a múltiplas drogas	14,4
CV_0768	<i>emrC</i>	Provável lipoproteína de resistência a múltiplas drogas de membrana externa	16,43
CV_0993		Transportador 4-hidroxibenzoato	2,96
CV_1165		Proteína hipotética conservada (domínio tRNA_edit)	3,49
CV_1166		Proteína hipotética conservada	2,35
CV_1182		Proteína hipotética conservada (domínio Ribonuc_L-PSP)	2,73
CV_1639		Proteína hipotética conservada (enzima ativadora de formaldeído dependente de glutatona)	2,4
CV_1769		Provável proteína de resistência (domínio MFS_1)	3
CV_1940		Proteína de membrana	2,64
CV_1944		Subunidade da protease Cpl dependente de ATP, proteína de choque térmico	2,35
CV_2036		Provável peroxiredoxina/proteína da família glutaredoxina	4,4
CV_2261		Provável acetilserotonina O-metiltransferase	2,48
CV_2311	<i>pstA</i>	Proteína fosfoenolpiruvato fosfotransferase	4,3
CV_2312	<i>manA</i>	Manose-6-fosfato isomerase	3,05
CV_2615	<i>iapP</i>	Proteína carreadora acil	2,14
CV_2616	<i>sipA</i>	Proteína de invasão	2,87
CV_2619	<i>sipB</i>	Proteína de invasão celular	2,22
CV_3014		Provável proteína de transporte transmembrana	3,42
CV_3323	<i>cbpD1</i>	Proteína de ligação a carboidrato	3,38
CV_3324		Provável citocromo b561	5,59
CV_3757	<i>lysA</i>	Diaminopimelato descarboxilase	4,06
		Downregulated	
CV_0027		Proteína hipotética	0,47
CV_0321	<i>hutI</i>	Imidazol-propionase	0,4
CV_0322	<i>hutG</i>	Formimidoilglutamase	0,48

CV_0323	<i>hutU</i>	Urocanato hidratase	0,45
CV_0324		Proteína hipotética (domínio Lipocalin_5)	0,4
CV_0325	<i>hutH</i>	Histidina amônia-liase	0,38
CV_0769	<i>emrR</i>	Repressor transcricional do operon <i>emr</i> , família MarR	0,17
CV_1218		Proteína hipotética	0,34
CV_1244		Proteína hipotética conservada (domínio Inovirus_Gp2)	0,51
CV_1647		Proteína hipotética	0,5
CV_3259		Provável histidina quinase de transdução de sinal	0,46

Dentre os genes com expressão aumentada no mutante $\Delta emrR$ podemos destacar CV_0766 (*emrB*), CV_0767 (*emrA*) e CV_0768 (*emrC*) com mais de dez vezes de aumento de expressão (Tabela 7). Estes genes estão próximos de *emrR* e parecem formar o operon *emrCAB*, que codifica uma bomba de efluxo do tipo MFS (Figura 11A). Além desses genes podemos destacar também uma proteína da família peroxirredoxina, proteínas de invasão e proteínas de transporte (Tabela 7). Esses dados indicam que EmrR atua como repressor de vários possíveis transportadores, incluindo a bomba de efluxo EmrCAB. Além disso, EmrR pode responder a estresse oxidativo por regular uma proteína da família peroxirredoxina.

4.3.2 O operon *emrCAB* é reprimido por EmrR e induzido por salicilato

A fim de validar os dados do microarranjo de DNA de que EmrR regula o operon *emrCAB*, foi realizado ensaio de northern blot com a linhagem selvagem e o mutante $\Delta emrR$ cultivados em meio LB, com uma sonda para o gene *emrA*. Neste ensaio podemos verificar que o operon é altamente expresso no mutante $\Delta emrR$ e nenhum sinal foi detectado na linhagem selvagem, confirmando que EmrR atua como repressor do operon *emrCAB* (Figura 11). Além disto, foram testados alguns compostos na linhagem selvagem para verificar se causavam aumento na expressão. Os dados indicam que em *C. violaceum* salicilato é um indutor da expressão da bomba de efluxo *emrCAB* e a indução é dose dependente, porém a bomba de efluxo

não é induzida por outros compostos como ácido nalidíxico e brometo de etídeo (Figura 11B).

Figura 11: Ensaio de Northern blot do operon *emrCAB*. (A) O esquema mostra a região do operon *emrCAB* no cromossomo de *C. violaceum* e sua vizinhança com o gene *emrR*. A seta vermelha está indicando a região que foi utilizada como sonda. **(B)** Ensaio de Northern blot com $\Delta emrR$ e a linhagem selvagem cultivados em meio LB, ou a linhagem selvagem exposta a 0,1; 1,0; 10 mM de salicilato ou 100, 200 e 500 μ M de ácido nalidíxico e brometo de etídeo.

4.3.3 EmrR atua como repressor direto da maioria dos genes de seu regulon

Após as análises do microarranjo de DNA e Northern blot, que indicaram que EmrR estaria se autoregulando e regulando o operon *emrCAB*, a próxima etapa seria verificar se esta regulação é direta ou indireta por ensaio de ligação ao DNA (EMSA) com a proteína EmrR purificada. Para isso o gene *emrR* foi clonado no vetor de expressão pET-15b, conforme confirmado por PCR de colônia (Figura 12A). Os dados do sequenciamento indicaram que o gene foi clonado sem nenhum erro. As análises em gel SDS-PAGE indicaram que a indução com IPTG 1 mM por 2 horas foi bem-sucedida e que grande

parte da proteína ficou na fração solúvel (Figura 12B). A purificação da proteína recombinante His-EmrR por cromatografia de afinidade em coluna de níquel foi bem-sucedida, pois quando a proteína eluída foi analisada em gel SDS-PAGE observamos uma banda intensa no tamanho esperado, com elevado grau de pureza e homogeneidade (Figura 12C).

Figura 12: Clonagem, expressão e purificação da proteína recombinante EmrR. **(A)** PCR de colônia para confirmar a clonagem do gene *emrR* no vetor pET-15b. Quase todas as colônias transformantes de *E. coli* testadas foram positivas. **(B)** Análise da indução e solubilidade da proteína em gel SDS-PAGE. Alíquotas de culturas de *E. coli* BL21(DE3) contendo pET-15b com o gene clonado foram retiradas antes ($t = 0$, não induzido) e após 2 horas ($t=2$) de indução com IPTG 1mM. Após a indução a fração solúvel e o pellet foram obtidos por sonicação e centrifugação. **(C)** A proteína His-EmrR purificada analisada em gel SDS-PAGE.

Para o ensaio de ligação ao DNA (EMSA) foram feitas sondas radioativas que consistem das regiões promotoras dos genes *emrR*, *emrCAB* e outros genes que foram vistos como regulados por EmrR nos dados do

microarranjo de DNA (Tabela 7). Nestes ensaios verificamos que EmrR reduzida com DTT liga na região promotora dos genes CV_0769 (*emrR*), CV_0768 (operon *emrCAB*), CV_0093 (transportador de hidrobenzoato), CV_1769 (possível proteína de resistência), CV_2036 (possível peroxirredoxina), CV_2423 (proteína efetora da ilha de patogenicidade 1), CV_2424 (glutathione S-transferase), CV_3014 (proteína de transporte transmembrana) e CV_3757 (descarboxilase). Em todos estes casos a ligação ocorreu a partir de 100 nM de EmrR, enquanto em uma sonda inespecífica (região codificadora do gene CV_0208) houve ligação inespecífica apenas a partir de 500 nM (Figura 13). Estes dados indicam que EmrR reprime estes genes de modo direto, incluindo o próprio gene *emrR* e o operon *emrCAB*.

Figura 13: Ensaios de EMSA para verificar a interação de EmrR com os promotores de vários genes do regulon EmrR. Ensaios de EMSA com as sondas marcadas contendo as regiões promotoras dos genes alvos, incubadas com diferentes concentrações da proteína EmrR purificada e reduzida com DTT (100, 200, 300 e 500 nM de EmrR). Apenas no promotor de CV_1639 a ligação foi inespecífica, pois ocorreu a partir de 500 nM, uma concentração na qual EmrR liga em uma sonda inespecífica (CV_0208).

4.4 EmrR parece ser um regulador redox

Uma vez que EmrR possui três cisteínas, testamos se esta proteína forma dímeros covalentes quando tratada com agentes oxidantes *in vitro*. Após tratamento com hidroperóxido de cumeno (CuOOH), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e hidroperóxido de *tert*-butyl, verificamos a formação de dímeros e outros multímeros covalentes da proteína (Figura 14). O tratamento das amostras com o agente alquilante N-etilmaleimida (NEM) assegura que estes dímeros não se formaram artificialmente após desnaturação das proteínas no gel SDS-PAGE. Estes dados sugerem que EmrR pode ter sua atividade de ligação ao DNA modulada por óxido-redução. Ensaaios de EMSA com EmrR oxidada serão realizados para confirmar esta hipótese.

Figura 14: Dimerização da proteína His-EmrR por agentes oxidantes. Análise em gel SDS-PAGE após tratamento da proteína purificada com os agentes oxidantes indicados e com o agente alquilante NEM. M (monômero), D (dímero) e WT (proteína sem tratamento).

5. DISCUSSÃO

Desde sua descoberta os antibióticos despertam interesse na pesquisa básica e aplicada. Nas últimas décadas com o aparecimento e disseminação de linhagens bacterianas resistentes a múltiplas drogas este interesse está cada vez maior, o que pode ser percebido pelas impactantes descobertas recentes nesta área. Para ficar em alguns exemplos podemos citar: (i) a controvérsia a respeito da ação letal de antibióticos bactericidas por dano oxidativo (ZHAO; DRLICA, 2014); (IMLAY, 2015); (ii) a descoberta de mecanismos moleculares que levam ao fenômeno da persistência e que bactérias persistentes tolerantes a múltiplas drogas podem funcionar como um caminho para a emergência de resistência mutacional (COHEN et al., 2013); (MAISONNEUVE; GERDES, 2014); (iii) ou ainda a elaboração do conceito de resistoma como uma tentativa para explicar a origem, evolução e disseminação de genes de resistência aos antibióticos entre a microbiota global (MORAR; WRIGHT, 2010); (PERRY; WESTMAN; WRIGHT, 2014).

Considerando que tanto bactérias ambientais quanto patogênicas possuem genes de resistência a antibióticos, neste trabalho estudamos mecanismos de resistência a antibióticos em *Chromobacterium violaceum*, uma bactéria ambiental encontrada em solo e água que atua como um patógeno ocasional (YANG; LI, 2011). Este patógeno causa infecções de rápida progressão e há relatos de falhas no tratamento com alguns antibióticos, talvez devido sua elevada resistência intrínseca (KAUFMAN; CERASO; SCHUGURENSKY, 1986); (ALDRIDGE; VALAINIS; SANDERS, 1988). De fato, nossos dados obtidos através de ensaio de difusão em disco e MIC mostraram elevada resistência desta bactéria aos antibióticos β -lactâmicos, mas susceptibilidade a outros como quinolonas, carbapenêmicos, cloranfenicol e tetraciclina, o que é condizente com os relatos da literatura (ALDRIDGE; VALAINIS; SANDERS, 1988); (HAGIYA et al., 2014); (MADI et al., 2015).

A *C. violaceum* possui em seu genoma diversos genes que poderiam funcionar como potenciais determinantes de resistência tais como, enzimas β -lactamases e sistemas de efluxo multidrogas (VASCONCELOS; ALMEIDA; HUNGRIA, 2003); (FANTINATTI-GARBOGGINI et al., 2004). No

entanto, a despeito dos relatos clínicos e do potencial genômico, não existem trabalhos que mostrem os mecanismos e genes envolvidos na resistência a antibióticos nesta bactéria. Uma maneira de se estudar mecanismos regulatórios envolvidos em resistência a antibióticos é através de mutações em fatores de transcrição e realização de testes fenotípicos com esses mutantes. No genoma de *C. violaceum* existem quinze fatores de transcrição membros da família MarR (VASCONCELOS; ALMEIDA; HUNGRIA, 2003). Neste trabalho, através de uma varredura por testes de sensibilidade a antibióticos com treze mutantes para reguladores desta família, identificamos o mutante ΔCV_0769 com redução da susceptibilidade ao antibiótico ácido nalidíxico. Através de análises *in silico* e caracterização funcional, demonstramos que CV_0769 é o regulador EmrR e que este atua controlando a expressão da bomba de efluxo EmrCAB em *C. violaceum*. Além disso, isolamos um mutante espontâneo deste regulador resistente ao antibiótico ácido nalidíxico e determinamos que o regulon de EmrR inclui vários outros genes além de *emrCAB*.

Tanto em *E. coli* quanto em *S. maltophilia* mutantes *emrR* são descritos como mais resistentes especificamente ao ácido nalidíxico e ao composto CCCP devido ao fato de que a bomba de efluxo EmrAB, regulada por EmrR, ser específica para compostos hidrofóbicos (LOMOVSKAYA; LEWIS, 1992); (LOMOVSKAY; LEWIS; MATIN, 1995); (HUANG et al., 2013). Consistente com isto, o mutante $\Delta ermR$ de *C. violaceum* mostrou resistência específica para ácido nalidíxico dentre os 24 antibióticos testados. Em desacordo com o já descrito, nosso mutante não mostrou fenótipo para o agente desacoplador CCCP (os ensaios com CCCP ainda precisam ser repetidos, pois houve variação entre as réplicas).

No antibiograma com o mutante $\Delta emrCAB$ não vimos diferença significativa para a maioria dos antibióticos, incluindo o ácido nalidíxico. Esse resultado sugere que no genoma de *C. violaceum* devem existir outras bombas de efluxo que na ausência de *emrCAB* estejam mais ativas, e que a bomba de efluxo *emrCAB* só deve ter um papel relevante em condições que elevem a sua expressão. De fato, em *S. maltophilia* mutação em *emrCAB* só mostrou fenótipo de susceptibilidade a antibiótico quando combinada com mutação em *tolC*, uma condição que leva ao não funcionamento de várias bombas de efluxo

dependentes de TolC (HUANG et al., 2013). Além disso, homólogos de *emrAB* de *E. coli* foram identificados em *Vibrio cholerae* (VceAB) pela capacidade de complementar um mutante *tolC* (COLMER; FRALIC; HAMOOD, 1998). Assim, elevada expressão da bomba EmrAB (como em mutantes *emrR*), mas não sua ausência, permite identificar de modo mais claro seu papel em resistência a antibióticos. Em *C. violaceum* e em *S. maltophilia* o operon *emrCAB* parece codificar a bomba completa tripartite composta pelo transportador MFS (EmrB), pela proteína de fusão de membrana (EmrA) e pela proteína de membrana externa (EmrC). Já em *E. coli* EmrC é substituída por TolC. Além de EmrB, vários outros transportadores da família MFS vem sendo estudados por conferirem resistência a vários antibióticos. Dentre eles podemos citar CraA de *Acinetobacter baumannii* (ROCA et al., 2009), EmrD-3 de *V. cholerae* (SMITH; KUMAR; VARELA, 2009), STY4874 de *Salmonella Typhi* (SHAHEEN et al., 2015) e LmrS de *Staphylococcus aureus* (FLOYD et al., 2010).

Os dados da literatura mostram que mutações pontuais nos genes *gyrA* e *gyrB*, mais especificamente na região de determinação de resistência a quinolona (QRDR), estão associadas com elevada resistência a fluoroquinolonas. Podemos citar como exemplos estudos com *Clostridium difficile*, *Streptococcus pneumoniae* e *E. coli*. Nesses trabalhos essas bactérias foram cultivadas em concentrações subinibitórias de fluoroquinolonas e os dados de sequenciamento mostraram que as mutações eram nos genes *gyrA* e *gyrB* (SPIGAGLIA et al., 2009); (DE VECCHI et al., 2009); (JAKTAJI; MOHITI, 2010). Nós utilizamos essa estratégia para obtenção de um mutante espontâneo com mutação pontual no gene *emrR* (dois clones foram obtidos com a mesma mutação R92H). Este mutante mostrou o mesmo fenótipo do mutante nulo $\Delta emrR$, ou seja, aumentada resistência a ácido nalidíxico, mas não a outras quinolonas. Esta arginina 92 localiza-se no segundo (posição 91-106) de quatro motivos curtos HTH-MarR encontrados em EmrR de *C. violaceum* (banco InterPro, assinatura PR00598), sugerindo que esta mutação pode estar afetando a ligação de EmrR ao DNA. Dados não publicados do laboratório (Bianca Batista) mostram que a maioria dos mutantes isolados em placas com altas concentrações de ácido nalidíxico tem mutações na região

QRDR de GyrA e apresentam alta resistência as quatro quinolonas usadas neste trabalho.

Em *E. coli* e *S. maltophilia* os únicos genes regulados por EmrR identificados até agora são aqueles do operon *emrCAB* (LOMOVSKAYA et al., 1995); (HUANG et al., 2013). Nosso trabalho, o primeiro a fazer uma análise global de um regulador EmrR, mostrou que em *C. violaceum* EmrR regula negativamente vários genes além de *emrCAB* e esta regulação mostrou ser direta, como verificado por ensaios de EMSA. Estes genes codificam vários possíveis transportadores e algumas enzimas antioxidantes como uma peroxidase. Não foi possível fazer uma relação direta entre qualquer dos genes regulados por EmrR e o fenótipo de diminuída produção de violaceína do mutante $\Delta emrR$, quando cultivado em meio LB líquido. Embora o maior efeito da deleção de *emrR* na expressão gênica tenha sido observado para o operon *emrCAB*, não podemos excluir a possibilidade de que o fenótipo de aumentada resistência ao ácido nalidíxico do mutante $\Delta emrR$ possa envolver estes outros transportadores.

O operon *emrAB* de *E. coli* é induzido por salicilato, 2,4-dinitrofenol e brometo de etídeo (LOMOVSKAYA et al., 1995). Já em *S. maltophilia* nenhum destes compostos causou desrepressão do operon *emrCAB* (HUANG et al., 2013). Em ambos os casos EmrR regula negativamente o operon *emrRAB* e se autorregula (XIONG et al., 2000); (HUANG et al., 2013). Em *V. cholerae* *vceCAB* é regulado por VceR, um regulador da família TetR, que regula negativamente o operon e se autorregula. Além disso, a expressão da bomba de efluxo VceCAB é induzida por salicilato (WOOLLEY et al., 2005). Aqui mostramos que a bomba de efluxo EmrCAB de *C. violaceum* é induzida por salicilato, mas não verificamos sua indução por outros compostos. A ligação direta de EmrR tanto no promotor de *emrR* quanto de *emrCAB* sugere que em *C. violaceum* EmrR também é autorregulado. No ensaio de Northern blot não é possível afirmar se as duas bandas observadas correspondem a transcritos *ermR-emrCAB* ou a formas alternativas de *emrCAB*. Ensaios de RT-PCR serão realizados para elucidar esta questão.

Algumas evidências obtidas neste trabalho sugerem que EmrR de *C. violaceum* pode ser um regulador redox. Primeiro, EmrR reprime uma possível

peroxirredoxina por ligar-se diretamente na região promotora do gene CV_2036. Os ensaios de EMSA com EmrR só mostraram ligação eficiente quando este regulador foi reduzido com alta quantidade de DTT (10 mM). Além disso, EmrR possui três cisteínas e quando tratada com agentes oxidantes esta proteína formou dímeros covalentes *in vitro*. Em artigo recente, uma análise proteômica a partir do extrato total de culturas de *C. violaceum* expostas a 8 mM de peróxido de hidrogênio, identificou EmrR como uma das proteínas com expressão aumentada (LIMA et al., 2016). Alguns fatores de transcrição da família MarR importantes para resistência a antibióticos já foram descritos como tendo sua atividade modulada por óxido-redução (CHEN, et al., 2011); (ANTELMANN; HELMANN, 2011). Em *P. aeruginosa*, MexR é um regulador redox que quando oxidado libera a expressão da bomba MexABOprM (CHEN et al., 2008), a qual confere resistência a vários antibióticos (POOLE et al., 1996). Ainda nesta bactéria, OspR atua como um regulador redox importante para defesa a estresse oxidativo, pigmentação, resistência a antibiótico e virulência (LAN et al., 2010). Uma caracterização mais aprofundada do mutante Δ ermR em relação a estresse oxidativo e do papel das cisteínas de EmrR irá revelar se este regulador controla outros processos além de resistência a antibióticos em *C. violaceum*.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho identificamos e caracterizamos a participação do fator de transcrição EmrR como um determinante de resistência a antibiótico em *Chromobacterium violaceum*. Além disso, identificamos o conjunto de genes regulado por EmrR, com destaque para a bomba de efluxo EmrCAB. As principais conclusões do trabalho foram:

- ✓ A participação de fatores de transcrição da família MarR na resistência a antibióticos em *C. violaceum* parece ser restrita, pois uma análise global usando mutantes em treze dos quinze genes desta família permitiu identificar apenas *emrR* como importante para resistência a antibiótico;
- ✓ O regulador EmrR confere resistência ao antibiótico ácido nalidíxico por atuar como repressor do operon *emrCAB*, uma vez que a deleção total do gene *emrR* leva a superexpressão da bomba de efluxo EmrCAB e ao aumento na resistência ao ácido nalidíxico;
- ✓ Mutações pontuais em EmrR deve ser um dos mecanismos para a emergência de linhagens resistentes a ácido nalidíxico em *C. violaceum*, dado que um mutante espontâneo com características fenotípicas similares ao mutante $\Delta emrR$ foi isolado em concentrações subinibitórias de ácido nalidíxico;
- ✓ A expressão da bomba EmrCAB é fortemente reprimida por ligação direta de EmrR no promotor do operon *emrCAB*, sendo induzida na presença de compostos como salicilato que atuam antagonizando a atividade de fatores de transcrição da família MarR. A ausência de um fenótipo claro de susceptibilidade a antibiótico do mutante $\Delta emrCAB$ deve ser em decorrência da não expressão da bomba EmrCAB nas condições testadas e/ou da preponderância de bombas de efluxo constitutivas;
- ✓ O escopo de ação de EmrR parece ir além de regular resistência a antibiótico, pois a análise global de seu regulon revelou que ele atua como repressor de vários outros genes além do operon *emrCAB*. Algumas evidências ainda preliminares deste trabalho sugerem um papel em resposta a estresse oxidativo e sua possível ação como um regulador redox.

7. BIBLIOGRAFIA

- ALDRIDGE, K. E.; VALAINIS, G. T.; SANDERS, C. V. Comparison of the *in vitro* activity of ciprofloxacin and 24 other antimicrobial agents against clinical strains of *Chromobacterium violaceum*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 10, n. 1, p. 31-39, 1988.
- ALEKSHUN, M. N. et al. The crystal structure of MarR regulator of multiple antibiotic resistance, at 2.3 Å resolution. **Nature Structural & Molecular Biology**, v.8, n.8, p.710-714, 2001.
- ALEKSHUN, M. N.; LEVY, S. B. Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the mar regulon. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 10, p. 2067-2075, 1997.
- AMINOV, R. History of antimicrobial drug discovery: Major classes and health impact. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 4-19, 2017.
- ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D.; KUBICEK-SUTHERLAND, J. Z. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. **Drug Resistance Updates**, v. 26, p. 43-57, 2016.
- ANTELMANN, H.; HELMANN, J. D. Thiol-based redox switches and gene regulation. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 14, n. 6, p. 1049-63, 2011.
- BENEDETTI, I. M.; DE LORENZO, V.; SILVA-ROCHA, R. Quantitative, non-disruptive monitoring of transcription in single cells with a broad-host range GFP-*luxCDABE* dual reporter system. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e52000, 2012.
- BIKARD, D. et al. Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 11, p. 1146-1150, 2014.
- BIRUKOU, I. et al. Structural mechanism of transcription regulation of the *Staphylococcus aureus* multidrug efflux operon *mepRA* by the MarR family repressor MepR. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 4, p. 2774-2288, 2013.
- BLAIR, J. M. A. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42-51, 2015.

- CHEN, H. et al. Structural insight into the oxidation-sensing mechanism of the antibiotic resistance of regulator MexR. **EMBO Reports**, v. 11, n. 9, p. 685-690, 2010.
- CHEN, H. et al. The *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux regulator MexR uses an oxidation-sensing mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 36, p. 13586-13591, 2008.
- CHEN, P. R.; BRUGAROLAS, P.; HE, C. Redox signaling in human pathogens. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 14, n. 6, p. 1107-1118, 2011.
- CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI M100-S23 Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.
- COHEN, S. P. et al. Salicylate induction of antibiotic resistance in *Escherichia coli*: activation of the *mar* operon and a *mar*-independent pathway. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 24, p. 7856-7862, 1993.
- COLMER, J. A.; FRALICK, J. A.; HAMOOD, Abdul N. Isolation and characterization of a putative multidrug resistance pump from *Vibrio cholerae*. **Molecular Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 63-72, 1998.
- COX, G.; WRIGHT, G. D. Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6, p. 287-292, 2013.
- DAVIDSON, A. L. et al. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, n. 2, p. 317-364, 2008.
- DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417-433, 2010.
- D'COSTA, V. M. et al. Antibiotic resistance is ancient. **Nature**, v. 477, n. 7365, p. 457, 2011.
- DE VECCHI, E. et al. In vitro selection of resistance in *Streptococcus pneumoniae* at in vivo fluoroquinolone concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 4, p. 721-727, 2009.
- DU, D. et al. Structure, mechanism and cooperation of bacterial multidrug transporters. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 33, p. 76-91, 2015.

- DURÁN, N. et al. Violacein: properties and biological activities. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 48, n. 3, p. 127-133, 2007.
- DURÁN, N.; MENCK, C. F. M. *Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial perspectives. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 201-222, 2001.
- DWYER, D. J. et al. Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 20, p. E2100-E2109, 2014.
- DWYER, D. J.; COLLINS, J. J.; WALKER, G. C. Unraveling the physiological complexities of antibiotic lethality. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 55, p. 313-332, 2015.
- ELLISON, D. W.; MILLER, V. L. Regulation of virulence by members of the MarR/SlyA family. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 153-159, 2006.
- FÀBREGA, A. et al. Mechanism of action of and resistance to quinolones. **Microbial Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 40-61, 2009.
- FANTINATTI-GARBOGGINI, F. et al. Drug resistance in *Chromobacterium violaceum*. **Genetics and Molecular Research**, v. 3, n. 1, p. 134-147, 2004.
- FERNÁNDEZ, L.; HANCOCK, R. E. W. Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 4, p. 661-681, 2012.
- FLOYD, J. L. et al. LmrS is a multidrug efflux pump of the major facilitator superfamily from *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 12, p. 5406-5412, 2010.
- FORSBERG, K. J. et al. The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. **Science**, v. 337, n. 6098, p. 1107-1111, 2012.
- GEORGE, A. M.; LEVY, S. B. Amplifiable resistance to tetracycline, chloramphenicol, and other antibiotics in *Escherichia coli*: involvement of a non-plasmid-determined efflux of tetracycline. **Journal of Bacteriology**, v. 155, n. 2, p. 531-540, 1983.
- GROVE, A. MarR family transcription factors. **Current Biology**, v. 23, n. 4, p. R142-R143, 2013.

- GUDETA, D. D. et al. *Chromobacterium* spp. harbour Ambler class A β -lactamases showing high identity with KPC. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 6, p. 1493-1496, 2016.
- GUÉRIN, F. et al. Overexpression of the novel MATE fluoroquinolone efflux pump FepA in *Listeria monocytogenes* is driven by inactivation of its local repressor FepR. **PloS one**, v. 9, n. 9, p. e106340, 2014.
- HAGIYA, H. et al. *Chromobacterium violaceum* nosocomial pneumonia in two Japanese patients at an intensive care unit. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 20, n. 2, p. 139-142, 2014.
- HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, v. 166, n. 4, p. 557-580, 1983.
- HERNANDO-AMADO, S. et al. Multidrug efflux pumps as main players in intrinsic and acquired resistance to antimicrobials. **Drug Resistance Updates**, v. 28, p. 13-27, 2016.
- HUANG, Y. et al. Characterization of a major facilitator superfamily (MFS) tripartite efflux pump EmrCABsm from *Stenotrophomonas maltophilia*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 11, p. 2498-2505, 2013.
- HUNGRIA, M. et al. Tolerance to stress and environmental adaptability of *Chromobacterium violaceum*. **Genetics and Molecular Research**, v. 3, p. 102-116, 2004.
- IMLAY, J. A. Diagnosing oxidative stress in bacteria: not as easy as you might think. **Current Opinion in Microbiology**, v. 24, p. 124-131, 2015.
- JAKTAJI J. R. P.; MOHITI, E. Study of mutations in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. **Iranian journal of Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 1, p. 43, 2010.
- KAATZ, G. W.; MCALEESE, F.; SEO, S. M. Multidrug resistance in *Staphylococcus aureus* due to overexpression of a novel multidrug and toxin extrusion (MATE) transport protein. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 1857-1864, 2005.
- KALDALU, N.; HAURYLIUK, V.; TENSON, Tanel. Persisters—as elusive as ever. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 15, p. 6545-6553, 2016.

- KAUFMAN, S. C.; CERASO, D.; SCHUGURENSKY, A. First case report from Argentina of fatal septicemia caused by *Chromobacterium violaceum*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 23, n. 5, p. 956-958, 1986.
- KEREN, I. et al. Killing by bactericidal antibiotics does not depend on reactive oxygen species. **Science**, v. 339, n. 6124, p. 1213-1216, 2013.
- KOHANSKI, M. A.; DWYER, D. J.; COLLINS, J. J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 6, p. 423, 2010.
- LAN, L. et al. *Pseudomonas aeruginosa* OspR is an oxidative stress sensing regulator that affects pigment production, antibiotic resistance and dissemination during infection. **Molecular Microbiology**, v. 75, n. 1, p. 76-91, 2010.
- LAXMINARAYAN, R. et al. Antibiotic resistance—the need for global solutions. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 12, p. 1057-1098, 2013.
- LEBRETON, F. et al. AsrR is an oxidative stress sensing regulator modulating *Enterococcus faecium* opportunistic traits, antimicrobial resistance, and pathogenicity. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 8, p. e1002834, 2012.
- LEE, E. H. et al. FarR regulates the *farAB*-Encode Efflux pump of *Neisseria gonorrhoeae* via an *mtrR* regulatory mechanism. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 24, p. 7145-7152, 2003.
- LEE, E.W. et al. EfrAB, an ABC multidrug efflux pump in *Enterococcus faecalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 12, p. 3733-3738, 2003.
- LEE, Y. H.; HELMANN, J. D. Mutations in the primary sigma factor σ A and termination factor Rho that reduce susceptibility to cell wall antibiotics. **Journal of Bacteriology**, v. 196, n. 21, p. 3700-3711, 2014.
- LERMA, L. L. et al. Role of EfrAB efflux pump in biocide tolerance and antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from traditional fermented foods and the effect of EDTA as EfrAB inhibitor. **Food Microbiology**, v. 44, p. 249-257, 2014.
- LEWIS, K. Platforms for antibiotic discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 5, p. 371-387, 2013.

- LIM, L. M. et al. Resurgence of colistin: a review of resistance, toxicity, pharmacodynamics, and dosing. **Pharmacotherapy**, v. 30, n. 12, p. 1279-1291, 2010.
- LIMA, D. C. et al. GeLC-MS-based proteomics of *Chromobacterium violaceum*: comparison of proteome changes elicited by hydrogen peroxide. **Scientific Reports**, v. 6, p. 28174, 2016.
- LIMA-BITTENCOURT, C. I. et al. Analysis of *Chromobacterium* sp. natural isolates from different Brazilian ecosystems. **BMC Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 58, 2007.
- LIU, Y.; IMLAY, J. A. Cell death from antibiotics without the involvement of reactive oxygen species. **Science**, v. 339, n. 6124, p. 1210-1213, 2013.
- LIVERMORE, D. M. Defining an extended-spectrum β -lactamase. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. s1, p. 3-10, 2008.
- LOMOVSKAYA, O., LEWIS, K. *Emr*, an *Escherichia coli* locus for multidrug resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n.1, p.8938–8942, 1992.
- LOMOVSKAYA, O.; LEWIS, K. I. M.; MATIN, A. EmrR is a negative regulator of the *Escherichia coli* multidrug resistance pump EmrAB. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 9, p. 2328-2334, 1995.
- MADI, D. et al. Case Report: Successful Treatment of *Chromobacterium violaceum* Sepsis in a South Indian Adult. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 5, n. 3, p. 1066-1067, 2015.
- MAGIORAKOS, A.-P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268-281, 2012.
- MAISONNEUVE, E.; GERDES, K. Molecular mechanisms underlying bacterial persisters. **Cell**, v. 157, n. 3, p. 539-548, 2014.
- MARTINEZ, P.; MATTAR, S. Fatal septicemia caused by *Chromobacterium violaceum* in a child from Colombia. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 6, p. 391-393, 2007.
- MARTINEZ, R. et al. *Chromobacterium violaceum* infection in Brazil. A case report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 42, n. 2, p. 111-113, 2000.

- MCALLEESE, F. et al. A novel MATE family efflux pump contributes to the reduced susceptibility of laboratory-derived *Staphylococcus aureus* mutants to tigecycline. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 1865-1871, 2005.
- MEHER-HOMJI, Z. et al. *Chromobacterium violaceum* infection in chronic granulomatous disease: a case report and review of the literature. **JMM Case Reports**, v. 4, n. 1, 2017.
- MORAR, M.; WRIGHT, G. D. The genomic enzymology of antibiotic resistance. **Annual Review of Genetics**, v. 44, p. 25-51, 2010.
- NARAYANA, J. L.; CHEN, J.Y. Antimicrobial peptides: possible anti-infective agents. **Peptides**, v. 72, p. 88-94, 2015.
- NIKAIDO, H.; PAGÈS, J. M. Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p. 340-363, 2012.
- NORDMANN, P.; DORTET, L.; POIREL, L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm!. **Trends in Molecular Medicine**, v. 18, n. 5, p. 263-272, 2012.
- OKANO, A.; ISLEY, N. A.; BOGER, D. L. Peripheral modifications of [Ψ [CH₂NH] Tpg₄] vancomycin with added synergistic mechanisms of action provide durable and potent antibiotics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 201704125, 2017.
- OKUSU, H.; MA, D.; NIKAIDO, H. AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 1, p. 306-308, 1996.
- PERERA, I. C.; GROVE, A. Molecular mechanisms of ligand-mediated attenuation of DNA binding by MarR family transcriptional regulators. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 2, n. 5, p. 243-254, 2010.
- PERRY, J. A.; WESTMAN, E. L.; WRIGHT, G. D. The antibiotic resistome: what's new?. **Current Opinion in Microbiology**, v. 21, p. 45-50, 2014.
- POOLE, K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 1, p. 20-51, 2005.

- POOLE, K. et al. Expression of the multidrug resistance operon *mexA-mexB-oprM* in *Pseudomonas aeruginosa*: *mexR* encodes a regulator of operon expression. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 9, p. 2021-2028, 1996.
- PREVIATO-MELLO M. et al. Global transcriptional response to organic hydroperoxide and the role of OhrR in the control of virulence traits in *Chromobacterium violaceum*. **Infection and Immunity**, v. 85:e00017-17, 2017.
- QUISTGAARD, E. M. et al. Understanding transport by the major facilitator superfamily (MFS): structures pave the way. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, n. 2, p. 123, 2016.
- RANAWEERA, I. et al. Structural comparison of bacterial multidrug efflux pumps of the major facilitator superfamily. **Trends in Cell & Molecular Biology**, v. 10, p. 131, 2015.
- RICE, L. B. Mechanisms of resistance and clinical relevance of resistance to β -lactams, glycopeptides, and fluoroquinolones. In: **Mayo Clinic Proceedings**. Elsevier, p. 198-208, 2012.
- ROBERTS, R. C. et al. Identification of a *Caulobacter crescentus* operon encoding *hrcA*, involved in negatively regulating heat-inducible transcription, and the chaperone gene *grpE*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 7, p. 1829-1841, 1996.
- ROCA, I. et al. CraA, a major facilitator superfamily efflux pump associated with chloramphenicol resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 9, p. 4013-4014, 2009.
- ROTEM, D.; SCHULDINER, S. EmrE, a multidrug transporter from *Escherichia coli*, transports monovalent and divalent substrates with the same stoichiometry. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 47, p. 48787-48793, 2004.
- ROTHSTEIN, D. M. Rifamycins, alone and in combination. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 7, p. a027011, 2016.
- SEOANE, A. S.; LEVY, S. B. Characterization of MarR, the repressor of the multiple antibiotic resistance (mar) operon in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 12, p. 3414-3419, 1995.

- SHAHEEN, A. et al. Characterization of putative multidrug resistance transporters of the major facilitator-superfamily expressed in *Salmonella Typhi*. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 21, n. 5, p. 357-362, 2015.
- SHARMA, A. et al. Fosfomycin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by efflux through a major facilitator superfamily (MFS) transporter—AbaF. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 1, p. 68-74, 2016.
- SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. **Nature Biotechnology**, v. 1, n. 9, p. 784-791, 1983.
- SMITH, K. P.; KUMAR, S.; VARELA, M. F. Identification, cloning, and functional characterization of EmrD-3, a putative multidrug efflux pump of the major facilitator superfamily from *Vibrio cholerae* O395. **Archives of Microbiology**, v. 191, n. 12, p. 903-911, 2009.
- SNEATH, P. H. A. et al. Fatal infection by *Chromobacterium violaceum*. **The Lancet**, v. 265, n. 6780, p. 276-277, 1953.
- SPIGAGLIA, P. et al. Molecular analysis of the *gyrA* and *gyrB* quinolone resistance-determining regions of fluoroquinolone-resistant *Clostridium difficile* mutants selected *in vitro*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2463-2468, 2009.
- SRIJARUSKUL, K. et al. Regulation by SoxR of mfsA, which encodes a major facilitator protein involved in paraquat resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. **PloS one**, v. 10, n. 4, p. e0123699, 2015.
- SULAVIK, M. C.; GAMBINO, L. F.; MILLER, P. F. The MarR repressor of the multiple antibiotic resistance (mar) operon in *Escherichia coli*: prototypic member of a family of bacterial regulatory proteins involved in sensing phenolic compounds. **Molecular Medicine**, v. 1, n. 4, p. 436, 1995.
- VAN HOEK, A. H. et al. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 1-27, 2011.
- VAN VEEN, H. W. et al. A bacterial antibiotic-resistance gene that complements the human multidrug-resistance P-glycoprotein gene. **Nature**, v. 391, n. 6664, p. 291, 1998.

- VASCONCELOS, A.T.R., ALMEIDA D. F., HUNGRIA M., 106 other authors. The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.100, n. 20, p.11660-11665, 2003.
- VELAMAKANNI, S. et al. Multidrug transport by the ABC transporter Sav1866 from *Staphylococcus aureus*. **Biochemistry**, v. 47, n. 35, p. 9300-9308, 2008.
- VETTING, M. W. et al. Structure of QnrB1, a plasmid-mediated fluoroquinolone resistance factor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 28, p. 25265-25273, 2011.
- WARRIER, T. T. et al. N-methylation of a bactericidal compound as a resistance mechanism in *Mycobacterium tuberculosis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 31, p. E4523-4530, 2016.
- WILKINSON, S; P.; GROVE, A. Ligand-responsive transcriptional regulation by members of the MarR family of winged helix proteins. **Current Issues in Molecular Biology**, v.8, n.1, p.51, 2006.
- WOOLLEY, R. C. et al. Characterization of the *Vibrio cholerae* *vceCAB* multiple-drug resistance efflux operon in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 15, p. 5500-5503, 2005.
- WRIGHT, G. D. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 10, p. 1451-1470, 2005.
- XIONG, A. et al. The EmrR protein represses the *Escherichia coli* *emrRAB* multidrug resistance operon by directly binding to its promoter region. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 10, p. 2905-2907, 2000.
- YAMAGUCHI, A.; NAKASHIMA, R.; SAKURAI, K. Structural basis of RND-type multidrug exporters. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015.
- YANG, C.; LI, Y. *Chromobacterium violaceum* infection: a clinical review of an important but neglected infection. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 74, n. 10, p. 435-441, 2011.

ZHANG, H. et al. A novel *marRAB* operon contributes to the rifampicin resistance in *Mycobacterium smegmatis*. **PloS one**, v. 9, n. 8, p. e106016, 2014.

ZHAO, X.; DRLICA, K. Reactive oxygen species and the bacterial response to lethal stress. **Current Opinion in Microbiology**, v. 21, p. 1-6, 2014.