**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

DIOGO DE ABREU MEIRELES

**Estudo da função do gene *kerV*
de *Pseudomonas aeruginosa***

Versão corrigida da Dissertação/Tese conforme Resolução CoPGr 5890

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

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

06/07/2011

DIOGO DE ABREU MEIRELES

Estudo da função do gene *kerV*
de *Pseudomonas aeruginosa*

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

Orientadora : Profa. Dra. Regina Lúcia Baldini

São Paulo

2011

*“Entre as coisas mais lindas que eu conheci
Só reconheci suas cores belas quando eu te vi...
... E as coisas lindas são mais lindas
quando você está, onde você está...”*

**Dedico esta tese a uma pessoa que fará parte de mim
eternamente, minha querida irmã,
Elaine (minha Nani), TE AMO!
(meu mundo não é mais tão bonito quanto era com você perto)**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a FAPESP e ao CNPq pelo suporte financeiro ao projeto.

Agradeço a Universidade de São Paulo e ao Instituto de Química por toda a infra-estrutura acadêmica.

Agradeço a todos os funcionários do Instituto de Química pela competência e prontidão em tudo o que foi necessário a minha formação e a realização deste trabalho.

Agradeço imensamente a Dra. Regina Lúcia Baldini por toda confiança e carinho oferecidos ao longo desses anos de convivência. Sobretudo por sua orientação, amizade e disposição em ajudar a encontrar melhor o caminho sobre nossos dilemas científicos.

Agradeço a Dra. Suely Lopes Gomes por fornecer grande parte da infra-estrutura que possibilitou a realização deste projeto, principalmente quanto à organização do laboratório.

Agradeço a Dra. Laurence G. Rahme, do Massachusetts General Hospital, Boston, USA, pela colaboração e por me aceitar para o estágio em seu laboratório. Também por toda a atenção e carinho prestados durante minha estada em Boston.

Agradeço ao Dr. Arunava Bandyopadhyaya, ao Dr. Jianxin He e ao Dr. Yiorgos Apidianakis pelos experimentos realizados que contribuíram significativamente para o projeto e todo o apoio dado durante o estágio no laboratório da Dra. Laurence G. Rahme.

Agradeço a Dra. Aikaterini Konstantinou, Dr. Panagiotis Panopoulos, Dr. Ronen Hazam e ao Dr. Yok Ai Que, e por todo o apoio, discussões e sugestões sobre o projeto durante meu estágio no laboratório da Dra. Laurence G. Rahme.

Agradeço a Dra. Waldely Oliveira Dias do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantã, pela doação da linhagem de *Bordetella pertussis* usada neste trabalho.

Agradeço ao Dr. Shaker Chuck Farah pelo suporte nos ensaios de duplo híbrido em leveduras.

Agradeço ao Dr. Frederico Gueiros Filho pela doação do plasmídeo para construir as fusões com GFP.

Agradeço a Ana Laura Boechat Borges pelos mais de oito anos de amizade, bancada e companheirismo.

Agradeço a Ana Paula Barbosa, Eliezer Stefanello, Gianluca Nicastro, Gilberto Kaihami, Patrícia Menegasso pelos nossos ricos momentos de discussão científica, mas também, sobretudo pela amizade e momentos de descontração que vivemos ao longo de todos esses anos.

Agradeço ao Rogério Lourenço, César Camilo, André Luiz Vieira, Karina Ribichich, Gabriela Mol, Raphaela Georg, Christian Kohler e Anne Krause pelos anos de convivência diária.

Agradeço a Luci Deise Navarro, a Marivon Pereira (Ivone) e a Sandra Mara Saraiva Fernandes pelo grande carinho oferecido ao longo de todos esses anos, sobretudo pela nossa amizade e trocas de experiência de vida.

Agradeço também a Maria Ivanilde (Nilde) pelo imenso carinho e atenção dada sempre.

Agradeço a todos os amigos do Departamento de Bioquímica pela troca de experiência e boas conversas pelos corredores do IQ.

Agradeço também a todos os professores do Instituto de Química que de alguma forma ajudaram na minha formação.

Agradeço ao meu companheiro André Luiz Cardoso Silva (mais conhecido por Juarez) por muitas coisas em todos esses anos que estivemos juntos.

Agradeço ao meu amigo Erick Burgoa pelo companheirismo e diversão em todos os nossos anos de 'baladas' em São Paulo e que permitiram exorcizar todas as frustrações do trabalho.

Agradeço ao Dr. Nelson Vieira do Carmo Júnior por ser essa pessoa tão especial e carinhosa e que é responsável por grande parte da minha felicidade.

Agradeço a minha família, minha mãe Norma, meu pai, Idevaldo e meu sobrinho, Gabriel por tudo que fui e serei. Amo vocês.

Enfim, agradeço ao Cosmos, ou, seja lá o que isso for, por poder viver essa aventura surreal que é o que chamamos de vida.

“Intelligence is the ability to adapt to change”
Stephen Hawking

RESUMO

Meireles, D. A. Estudo da função do gene *kerV* de *Pseudomonas aeruginosa*. Ano: 2011. 187 páginas. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química. Universidade de São Paulo, São Paulo.

P. aeruginosa PA14 é uma linhagem isolada de queimadura que apresenta vários fatores de patogenicidade comuns no quadro de infecção de hospedeiros filogeneticamente distintos (plantas, mamíferos ou invertebrados). O gene *kerV* foi revelado numa busca por mutantes atenuados em virulência em uma biblioteca de mutantes por transposons da linhagem PA14 (Rahme *et al.*, 1997). A caracterização da linhagem D12, mutante em *kerV*, confirmou sua virulência atenuada (Apidianakis *et al.*, 2005 e An *et al.*, 2009) e resultados do transcriptoma mostraram alteração na expressão de mais de 500 genes, sendo alguns relacionados com o sistema de “quorum sensing” (Rahme *et al.*, dados não publicados). O gene *kerV* está próximo à montante ao gene *gloB*, envolvido em detoxificação de metilglioxal, e à jusante aos genes *rnhA* e *dnaQ*, que codificam proteínas envolvidas na replicação e reparo do DNA. Este trabalho teve como objetivo estudar a função molecular do produto de *kerV* e a expressão dos genes do locus *kerV-rnhA-dnaQ*. Análises de bioinformática indicam que a proteína KerV é uma metiltransferase dependente de S-adenosil-metionina (SAM), apresentando um domínio conservado de ligação a SAM e uma arquitetura de domínio compatível com a organização em fitas-beta e hélices-alfa alternadas descritas para a família das metiltransferases dependentes de SAM. Ela não apresenta outros domínios conservados que indiquem seu substrato de metilação. A expressão heteróloga desta proteína em *E. coli*, mostrou que ela é expressa de maneira parcialmente solúvel quando co-expressa com as chaperoninas GroEL/GroES em baixas temperaturas ou quando fusionada a MBP ou GST. A purificação desta proteína mostra que ela é co-eluída com a chaperonina GroEL sugerindo que para atingir sua conformação nativa ela necessita dessas proteínas acessórias. MBP-KerV purificado foi usado para ensaios ‘*in vitro*’ de atividade de metiltransferase e ligação a SAM, que não foram conclusivos, pois não há certeza do seu correto estado de enovelamento. Ensaios de duplo-híbrido mostraram que KerV não interage com os produtos de *rnhA* e *dnaQ*, sugerindo que KerV não está diretamente relacionado com suas funções. A frequência de mutação na linhagem D12 está levemente aumentada (aproximadamente quatro vezes), o que sugere que KerV não está diretamente envolvida no reparo de DNA do tipo ‘mismatch repair’. Os ensaios usados para detectar metilação do DNA, proteínas e rRNAs não revelaram que KerV estaria envolvido com a metilação destes substratos. Os inícios de transcrição dos genes *kerV*, *rnhA* e *dnaQ* foram determinados. A deleção de *kerV* causa um efeito polar na transcrição do gene *rnhA*, que não se reflete nos níveis da proteína. A deleção

também afeta a expressão de *dnaQ*, sugerindo que KerV seja importante para sua regulação. Os ensaios de complementação da virulência em modelos invertebrados e de células epiteliais de pulmão mostram que apenas a presença dos três genes e seus produtos em níveis normais são capazes de reverter a maioria dos fenótipos atenuados. KerV se mostrou essencial para a inibição da translocação de NF- κ B para o núcleo das células, comprovando que esta proteína é relevante para a virulência de PA14, contribuindo com o silenciamento da resposta imune do hospedeiro. O conjunto dos resultados indicam uma complexa inter-relação entre a expressão dos genes *kerV*, *rnhA* e *dnaQ* e seu papel na biologia de *P. aeruginosa*.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*, regulação da expressão gênica, metiltransferase dependentes de S-adenosil-metionina, patogenicidade

ABSTRACT

Meireles, D. A. Function of *Pseudomonas aeruginosa* *kerV* gene 2011. 187 p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

P. aeruginosa PA14 is a burn isolate multi-host pathogen strain. The screening for virulence attenuated mutants in a PA14 transposon mutant library revealed the *kerV* gene (Rahme *et al.*, 1997). The characterization of D12 strain, a *kerV* mutant, confirmed the attenuated virulence phenotype (Apidianakis *et al.*, 2005 and An *et al.*, 2009) and transcriptome analysis showed the expression of more than 500 genes are affected in D12, some of these genes are related with quorum sensing (Rahme *et al.*, unpublished data). *kerV* is upstream of the *gloB* gene, related with methylglyoxal detoxification and downstream of the *rnhA* and *dnaQ* genes, both related with DNA replication and repair. The purpose of this work was to study the molecular function of *KerV* product and the expression of *kerV-rnhA-dnaQ* locus. Bioinformatics analysis indicated that *KerV* is a SAM dependent methyltransferase that have a conserved SAM binding domain with architecture compatible with classic alternating β -stranded and α -helical regions. *KerV* does not show any other conserved motif that could indicate its methylation substrate. Heterologous expression in *E. coli* showed that *KerV* is partially soluble only when co-expressed with GroEL/GroES chaperones at low temperatures or when *KerV* is in fusion with MBP or GST tag. During the purification process *KerV* was copurified with GroEL chaperone suggesting that this association may be required for the correct folding of *KerV*. Methyltransferase activity and SAM binding assays were done with purified MBP-*KerV* and the results were not conclusive since the proper conformation of MBP-*KerV* cannot be verified. Yeast two-hybrid assays indicated that RNaseH and DnaQ are not interaction partners of *KerV*, suggesting that their functions are not directly related. The mutation frequency of D12 strain increased only about four times in relation to PA14, suggesting that *KerV* is not directly involved with DNA mismatch repair. The assays to detect methylation in DNA, RNAs and proteins do not show that *KerV* is involved with methylation of these substrates. The transcription start sites of *kerV*, *rnhA* and *dnaQ* genes were mapped through 5'-RACE- and primer extension experiments. The *kerV* deletion causes a polar effect on the transcription of *rnhA* gene, which is not reflected on RNaseH protein levels. The *kerV* deletion also affects *dnaQ* expression, suggesting that *KerV* is important for its regulation. The virulence complementation assays in flies and lung epithelial cells showed that the fully rescue of the wild type phenotype was achieved only when the entire locus is present. *KerV* was essential to inhibit the NF- κ B nucleus translocation, demonstrating that *KerV* is relevant to PA14 virulence, contributing for the silencing of host immune system. Altogether, these data showed a complex inter-relation among *kerV*, *rnhA* and *dnaQ* genes and its role in *P. aeruginosa* biology.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, regulation of gene expression, SAM dependent methyltransferase, pathogenicity

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ap: Ampicilina

ATCC: American Type Culture Collection

ATP: Adenosine Triphosphate

BCA: Bicinchoninic Acid

BCIP: 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

BSA: Bovine Serum Albumin

C.P.M.: Contagens Por Minuto

Cb: Carbenicilina

CDD: Conserved Domain Database

cDNA: complementary DNA

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA: Deoxyribonucleic Acid

DO_{600nm}: Densidade Óptica medida no comprimento de onda de 600 nanômetros

EDTA: Ethylene Diamine Tetraacetic Acid

GEO: Gene Expression Omnibus

Gm: Gentamicina

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

Km: Canamicina

LB: Luria Broth

MOPS: 3-(N-morpholino)propanesulfonic Acid

msDNA: Multicopy single-stranded DNA

NBT: NitroBlueTetrazolium

NCBI: National Center for Biotechnology Information

ONPG: Ortho-NitroPhenyl-β-Galactoside

PBS: Phosphate-Buffered Saline

PCR: Polymerase Chain Reaction

PIPES: Piperazine-N,N'-bis(ethanesulfonic acid)

PMSF: Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride

PSI-BLAST: Position-Specific Iterative BLAST

MOI: Multiplicity of Infection

qRT-PCR: quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

Rif: Rifampicina

RNA: Ribonucleic Acid

Rpm: Rotações por minuto

RT-PCR: Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate-gel polyacrilamide electrophoresis

SSC: Saline-Sodium Citrate

TBE: Tris Borate EDTA

TBS: Tris-Buffered Saline

TCA: Trichloroacetic Acid

TE: Tris-EDTA

Tet: Tetraciclina

Tris: tris(hydroxymethyl)aminomethane

SSC: saline-sodium citrate buffer

X-gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-d-galactopyranoside

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Visão esquemática da célula de <i>P. aeruginosa</i> destacando seus componentes de superfície.....	23
Figura 2 - Visão esquemática dos três principais sistemas de secreção encontrados em <i>P. aeruginosa</i>	25
Figura 3 - Esquema mostrando os três sistemas de percepção de quorum em <i>P. aeruginosa</i>	26
Figura 4 - Organização genômica de <i>kerV</i> em PA14 e D12.....	28
Figura 5 - <i>P. aeruginosa</i> D12 é defectiva na produção de ramnolipídeos, na formação de “swarming” e “twitching”. A linhagem D12 também apresenta uma maior produção de piocianina.....	29
Figura 6 - Quantificação dos níveis das N-Acil-Homoserina-Lactonas (AHLs), C4-AHL e 3-oxo-C12-AHL, no sobrenadante de PA14 e D12.....	29
Figura 7 - Esquema mostrando a reação geral de transferência de grupamentos metil para um substrato genérico, a partir de S-adenosil metionina (SAM).....	31
Figura 8 - Padrão de metilação das bases do DNA.....	33
Figura 9 - Alguns exemplos de metilações que podem ser encontradas em moléculas de RNA.....	36
Figura 10 - Perfil de crescimento de PA14 em meio M63 contendo xilose como única fonte de C.....	60
Figura 11 - Resultado da busca por domínios conservados.....	73
Figura 12 - Alinhamento estrutural de duas metiltransferases dependentes de SAM – 2gs9 X 2p7i.....	75
Figura 13 - Predição da estrutura secundária de KerV e o alinhamento das proteínas 2gs9 (A) e 1vlm (B) com KerV realizados via Phyre2.....	77
Figura 14 - Predição da estrutura tridimensional de KerV utilizando os servidores Phyre2 e I-Tasser.....	78
Figura 15 - Predição do sítio de ligação a SAM feitos a partir do programa 3DLigandSite.....	79
Figura 16 - Frações de extratos de <i>E. coli</i> DH5 α super-expressando a proteína recombinante His-KerV.....	85
Figura 17 - Extratos de <i>E. coli</i> BL21 expressando as proteínas recombinantes His-KerV e GST-KerV sozinhas ou com coexpressão de GroEL ou Tiorredoxina.....	86
Figura 18 - Frações solúveis e insolúveis de extratos de <i>E. coli</i> BL21 superexpressando as proteínas recombinantes His-KerV e GST-KerV sozinhas ou com coexpressão de GroEL ou Tiorredoxina.....	86
Figura 19 - Purificação de GST-KerV recombinante através de cromatografia de afinidade em resina de glutationa-sefarose.....	87

Figura 20 - Expressão de His-KerV e GST-KerV na linhagem 'ArcticCells' BL21(DE3) com a co-expressão das chaperoninas Cpn60/Cpn10.....	87
Figura 21 - Purificação de His-KerV recombinante, obtida com a expressão na linhagem 'Arctic Cells' BL21(DE3) a 13 °C, através de cromatografia de afinidade (Ni ⁺⁺ -agarose).....	88
Figura 22 - Purificação de KerV-His recombinante (cauda de histidina na extremidade C-terminal) através de cromatografia de afinidade (Ni ⁺⁺ -agarose).....	88
Figura 23 - Expressão e purificação de MBP-KerV.....	91
Figura 24 - Purificação de MBP e MBP-KerV recombinante através de cromatografia de afinidade em resina de amilose.....	92
Figura 25 - Cinética da digestão de MBP-KerV com fator Xa.....	92
Figura 26 - Proteína de <i>B. pertussis</i> BP3212, um possível ortólogo de KerV.....	94
Figura 27 - Frações solúveis e insolúveis de extratos de <i>E. coli</i> BL21 super-expressando a proteína recombinante His-BP3212 em diversas temperaturas.....	95
Figura 28 - Purificação de His-BP3212 recombinante, induzida a 20 °C, através de cromatografia de afinidade em resina de níquel agarose.....	95
Figura 29 - Análise da localização celular de KerV expresso a partir de seu promotor natural.....	97
Figura 30 - Localização celular de KerV.....	99
Figura 31 - Estado de metilação do pUCp18 em diferentes linhagens de <i>P. aeruginosa</i> e <i>E. coli</i>	102
Figura 32 - Padrão de digestão do DNA genômico de PA14 e D12 digerido com diversas enzimas de restrição.....	104
Figura 33 - Sequência do fragmento de DNA usado como substrato do tratamento com bissulfito de sódio, contendo a origem de replicação cromossomal de PA14.....	106
Figura 34 - Inibição da tradução na linhagem PA14.....	109
Figura 35 - Proteínas metiladas pela adição de ³ H-metionina das linhagens PA14 e D12.....	110
Figura 36 - RNA extraído de células de PA14 e D12 alimentadas com ³ H-metionina em meio mínimo.....	114
Figura 37 - Gel de poli-acrilamida 12 % com frações solúveis e insolúveis de extratos de <i>E. coli</i> super-expressando as proteínas recombinantes His-DnaQ e His-RNaseHI.....	115
Figura 38 - Reatividade dos soros policlonais anti-His-RNaseHI e anti-His-DnaQ.....	115
Figura 39 - Níveis dos mRNAs de <i>rnhA</i> (A) e <i>dnaQ</i> (B) nas linhagens PA14 e D12 coletadas em DO _{600nm} 1 e 3, verificados por qRT-PCR.....	118

Figura 40 - Níveis das proteínas DnaQ e RnhA nas linhagens PA14 e D12 ao longo do crescimento em meio LB a 37 °C.....	119
Figura 41 - Atividade promotora das fusões de transcrição <i>rnhA-lacZ</i> (A) e <i>rnhAmut-lacZ</i> (B) integradas no no sítio <i>ctx</i> do cromossomo de PA14 e D12, durante o crescimento em meio LB a 37 °C, sob agitação.....	122
Figura 42 - Atividade promotora das fusões de transcrição <i>dnaQ-lacZ</i> (A) e <i>kerV-lacZ</i> (B) integradas no sítio <i>ctx</i> do cromossomo de PA14 ou D12, durante o crescimento em meio LB a 37 °C, sob agitação.....	123
Figura 43 - Atividade promotora da fusão de transcrição <i>dnaQ-lacZ</i> , na linhagem PA14 ou D12 contendo o vetor pUCp18 (A) ou pUCp18- <i>kerV</i> (B), durante o crescimento em meio LB a 37 °C, sob agitação.....	124
Figura 44 - Inícios de transcrição do gene <i>kerV</i> de PA14 determinados através primer extension e 5'-RACE.....	126
Figura 45 - Inícios de transcrição de <i>rnhA</i> mapeados através de primer extension.....	128
Figura 46 - Inícios de transcrição de <i>rnhA</i> mapeados através do sequenciamento dos clones obtidos por 5'-RACE.....	129
Figura 47 - Inícios de transcrição do gene <i>dnaQ</i> determinados através do seqüenciamento dos clones obtidos por 5'- RACE.....	131
Figura 48 - Mapa das construções pDM016, pDM018, pDM019 e pDM020.....	132
Figura 49 - Verificação dos níveis de mRNA de <i>kerV</i> , <i>rnhA</i> e <i>dnaQ</i> e da proteína DnaQ nas linhagens PA14, D12 e derivadas de D12.....	133
Figura 50 - Ensaios de complementação funcional, verificados pela produção de IL-8 e translocação de NF-kB por células de epitélio de pulmão A549.....	136
Figura 51 - Ensaios de complementação funcional verificados pela infecção no modelo de <i>Drosophila</i>	138
Figura 52 - Ensaios de complementação funcional, verificado através do ensaio de motilidade do tipo 'twitching'.....	140
Figura 53 - Produção de piocianina por PA14, D12 e derivadas.....	141
Figura 54 - Ensaios de infecção em células A549 mostrando a ativação da expressão do gene <i>kerV</i>	144
Figura 55 - Uma visão esquemática dos locais de inícios de transcrição mapeados por 5'-RACE para os genes <i>kerV</i> , <i>rnhA</i> e <i>dnaQ</i>	149
Figura 56 -Quando os três genes do locus <i>kerV-rnhA-dnaQ</i> estão presentes simultaneamente podem ser observadas duas diferentes configurações.....	153

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Linhagens usadas neste trabalho.....	40
Tabela 2 - Vetores e construções usadas neste trabalho.....	42
Tabela 3 - Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.....	45
Tabela 4 - Tentativas de expressão de KerV. Foram testadas diferentes linhagens, diferentes condições de indução e extração.....	82
Tabela 5 - Frequências de mutação observadas nas linhagens selvagem (PA14) e mutante para o gene <i>kerV</i> (D12).....	101
Tabela 6 - Putativos ortólogos em PA14 de proteínas de <i>E. coli</i> envolvidas com metilação dos rRNAs 16S e 23S.....	113
Tabela 7 - Crescimento de células de PA14 durante a infecção em células de A549.....	143
Tabela 8 - Resultados da busca de ortólogos a KerV por PSI-BLAST KerV como sequência sonda na pesquisa de banco de dados não-redundantes (nr) do NCBI.....	170

ÍNDICE GERAL

1-INTRODUÇÃO.....	22
1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
1.2- Regulação da expressão gênica.....	25
1.3. Linhagem PA14: modelo de estudo de patogenicidade.....	27
1.4- O gene <i>kerV</i>	30
1.5- Domínio de metiltransferase.....	30
1.6- Importância das reações de metiltransferase na fisiologia da célula.....	34
1.6.1- Metilação do DNA.....	34
1.6.2- Metilação de RNAs.....	35
1.6.3- Metilação de proteínas.....	37
1.6.4- Outros alvos de metilação.....	38
2- OBJETIVOS.....	39
2.1- Objetivos específicos.....	39
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1- As linhagens de microrganismos, vetores e oligos utilizados.....	40
3.2- Condições de cultivo.....	47
3.3- Técnicas básicas de Biologia Molecular.....	47
3.4- Isolamento do DNA genômico.....	47
3.5- Clonagens dos fragmentos <i>rnhA</i> , <i>dnaQ</i> e <i>kerV</i> para expressão e purificação.....	48
3.6- Clonagens dos fragmentos <i>kerV</i> , <i>pkerV</i> , <i>prnhA</i> , <i>pdnaQ</i> , <i>pkerV-rnhA-dnaQ</i> e <i>BP3212</i>	48
3.7- Integração dos fragmentos clonados no vetor mini-CTX2 no cromossomo de PA14 e D12.....	50
3.8- Clonagem das fusões de transcrição dos genes <i>kerV</i> , <i>rnhA</i> e <i>dnaQ</i>	50
3.9- Análises de bioinformática.....	50
3.10- Determinação da frequência de mutação.....	52

3.11- Expressão e purificação da proteína recombinante KerV.....	52
3.12- Expressão e purificação das proteínas recombinantes His-RNaseHI e His-DnaQ.....	52
3.13- Obtenção do soro policlonal em coelhos.....	54
3.14- Análise da indução da proteína His-RNaseHI e His-KerV recombinante por “Western Blot”.....	54
3.15- Análise da expressão de <i>rnhA</i> e <i>dnaQ</i> em PA14 e nos mutantes D12, DA17, DA20.....	55
3.16- Ensaios de interação entre Kerv, RNaseHI e DnaQ.....	55
3.16.1- Ensaios de ‘duplo-híbrido’.....	55
3.17- Expressão e purificação da proteína recombinante His-BP3212.....	56
3.18- Expressão e purificação da proteína recombinante MBP-KerV.....	57
3.19- Ensaio de atividade de metiltransferase de MBP-KerV.....	57
3.19.1- Obtenção dos híbridos DNA:RNA.....	58
3.20- Ensaio de ligação a S-adenosil metionina (SAM) por <i>cross-linking</i>	59
3.21- Ensaios de localização celular de KerV em PA14.....	59
3.22- Comparação do estado de metilação do DNA das linhagens PA14 e D12.....	61
3.22.1- Análise por enzimas de restrição.....	61
3.22.1.1- “Southern blot”.....	62
3.22.2- Tratamento com bisulfito de sódio.....	63
3.22.2.1- Tratamento do DNA.....	63
3.22.2.2- Amplificação.....	64
3.22.2.3- Clonagem e seqüenciamento.....	64
3.23- Marcação de células com ³⁵ S-metionina ou L-metil-[³ H]-metionina (³ H-metionina).....	64
3.23.1- Marcação para extração de proteínas.....	65
3.23.2- Marcação de células com ³ H-metionina para extração de DNA e RNA.....	66
3.24- Ensaios para medir a atividade de β-galactosidase.....	66
3.25- Determinação dos inícios de transcrição de <i>kerv</i> , <i>rnhA</i> e <i>dnaQ</i>	67
3.25.1- Análise por primer extension.....	67

3.25.2- 5'-RACE.....	68
3.26- Ensaio de complementação funcional.....	69
3.26.1- Monitoramento dos níveis de DnaQ e RnhA.....	69
3.26.2- Análise da expressão por qRT-PCR de <i>kerV</i> , <i>rnhA</i> e <i>dnaQ</i> nas linhagens PA14, D12 e derivadas de D12.....	70
3.26.3- Twitching.....	70
3.26.4- Infecção em <i>Drosophila</i>	70
3.26.5- Ensaio em células de epitélio de pulmão A549.....	71
3.26.6- Quantificação de piocianina.....	71
3.27- Análise da expressão do gene <i>kerV</i> de PA14 durante infecção em linhagens de células humanas de epitélio de pulmão A549.....	71
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
4.1- Análises ' <i>in silico</i> '.....	73
4.1.1- Motivos de ligação a SAM, alinhamento e predição de estrutura secundária e terciária de KerV.....	73
4.2- Expressão de KerV recombinante.....	80
4.2.1- Expressão de um ortólogo a KerV: BP3212.....	93
4.3- Ensaio de atividade de metiltransferase.....	96
4.4- Ensaio de localização subcelular de <i>kerV</i>	96
4.4.1- Ensaio de localização de KerV em PA14.....	96
4.5- Determinação da frequência de mutação.....	100
4.6- Investigação do estado de metilação do DNA.....	101
4.6.1- Análise por enzimas de restrição.....	101
4.7- Marcação de células com ³ H-metionina.....	106
4.7.1- Perfil de proteínas metiladas.....	106
4.7.2- Metilação do DNA genômico.....	110
4.7.3- Perfil de metilação de RNA.....	111
4.8- Expressão e purificação dos produtos de <i>dnaQ</i> e <i>rnhA</i> em <i>E. coli</i>	114
4.9- Ensaio de interação proteína-proteína entre KerV, RNaseHI e DnaQ.....	116
4.10- Análise da expressão de <i>rnhA</i> e <i>dnaQ</i> em PA14 e D12.....	116
4.11- Atividade dos promotores do locus <i>kerV-rnhA-dnaQ</i>	120
4.12- Determinação dos inícios de transcrição dos genes <i>kerV</i> , <i>rnhA</i> e <i>dnaQ</i>	125

4.12.1- <i>kerV</i>	125
4.12.2- <i>rnhA</i>	126
4.12.3- <i>dnaQ</i>	130
4.13- Ensaio de complementação.....	131
4.13.1- Ensaio de complementação funcional.....	131
4.13.2- Ensaio em <i>Drosophila</i>	136
4.13.3- Ensaio de ‘twitching’.....	139
4.13.4- Produção de piocianina.....	140
4.14- Ensaio de ativação da expressão do gene <i>kerV</i>	141
4.15- Considerações finais.....	145
4.15.1- Caracterização de KerV.....	145
4.15.2- Organização do locus.....	148
4.15.3- Experimentos de ‘complementação’ e infecção.....	151
5- CONCLUSÕES.....	154
6- REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS.....	156
7- APÊNDICE (S).....	170

1- Introdução:

1.1. *Pseudomonas aeruginosa*:

P. aeruginosa é uma bactéria gram-negativa que pertence ao grupo das gamaproteobactérias. É um patógeno oportunista metabolicamente versátil com capacidade colonizar diversos tipos de ambiente e infectar uma ampla variedade de hospedeiros, incluindo plantas, insetos e humanos. Em humanos é freqüentemente encontrada em infecções de pacientes imuno-comprometidos, com severas queimaduras, com infecções respiratórias agudas e portadores de fibrose cística (Chastre *et al.*, 2000; Govan *et al.*, 1996). Nestes casos, *P. aeruginosa* apresenta alta incidência e severidade. Outro aspecto bem explorado nesta bactéria é a resistência a antibióticos. Ela tem sido um modelo bem estudado por apresentar mecanismos intrínsecos de resistência a estes compostos, o que ao longo das últimas décadas permitiu a seleção de diversas linhagens resistentes aos tratamentos antimicrobianos convencionais (Obritsch *et al.*, 2004; Karlowsky *et al.*, 2003). *P. aeruginosa* também é causa comum de infecções hospitalares, uma vez que esse microrganismo tem capacidade formar biofilmes e, portanto tem o poder de se aderir a diversos materiais abióticos, contaminando cateteres, ventiladores, próteses e lentes de contato (Cao *et al.*, 2001).

As células de *P. aeruginosa* são móveis, podendo apresentar até três tipos de motilidade que são chamadas de “swimming”, “swarming” e “twitching”. A motilidade do tipo “swimming” é dependente de flagelo e se caracteriza pela capacidade das células nadarem em um meio líquido. Outro tipo de motilidade chamada “swarming” se caracteriza pelo movimento organizado das células sobre a superfície de um meio sólido e é dependente tanto do flagelo como de fímbria do tipo IV (Köhler *et al.*, 2000). Este movimento depende também da secreção de compostos denominados ramnolipídeos, que são biosurfactantes que além de facilitar o deslizamento das células sobre a superfície do meio, garantem um movimento polarizado (Tremblay *et al.*, 2007). O “twitching” é outro tipo de motilidade apresentado pelas células de *P. aeruginosa* que depende exclusivamente da fímbria do tipo IV. Ele é caracterizado pelo movimento das células através da expansão, adesão e retração da fímbria em uma superfície abiótica. Nos ensaios no laboratório este tipo de motilidade é

quantificado pelo movimento das células que ocorre na interface entre o meio de cultura e a superfície de plástico de uma placa de Petri.

Estes tipos de motilidade são importantes no processo de invasão e estabelecimento das células em diversos tipos de ambientes, como por exemplo, no estabelecimento da infecção por *P. aeruginosa* em células epiteliais de pulmão de pacientes com predisposição, tais como aqueles portadores de fibrose cística. Essas estruturas de superfície possuem receptores específicos na célula do hospedeiro que fornecem uma importante via de adesão facilitando o estabelecimento da infecção (Kipnis *et al.*, 2006).

Figura 1 - Visão esquemática da célula de *P. aeruginosa* destacando seus componentes de superfície

Outro tipo de estrutura presente na superfície de *P. aeruginosae* também em todas as bactérias gram-negativas, são os lipopolisacarídeos (LPS). Eles estão localizados na face externa da membrana externa, ficando inseridos na bicamada lipídica através de um domínio hidrofóbico chamado de lipídeo A. Este lipídeo A está ligado covalentemente a uma cadeia repetitiva de monômeros de açúcares chamada antígeno O. A composição da cadeia do antígeno O é única para cada linhagem, por isso o LPS é um importante fator na identificação das dessas linhagens. Os LPSs são importantes tanto sob o aspecto estrutural

quanto do ponto de vista da virulência, pois são capazes de desencadear uma forte reação imune em vários modelos de animal (Sperandeo *et al.*, 2009).

P. aeruginosa é capaz de produzir dois pigmentos com importantes funções tanto para a virulência quanto para a fisiologia da célula. A piocianina é pigmento azulado pertencente à classe das fenazinas que apresenta uma pronunciada atividade redox. É importante no processo de patogênese principalmente por induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) na célula do hospedeiro (Muller, 2002). Outro papel atribuído a piocianina diz respeito à fisiologia da célula já que na ausência de oxigênio pode atuar na reoxidação do NADH (Price-Whelan *et al.*, 2007). Outro pigmento produzido por *P. aeruginosa* é a pioverdina. Este composto é um sideróforo, tendo um papel fundamental na captação de ferro e virulência (Meyer *et al.*, 1996). Outros compostos produzidos por *P. aeruginosa* incluem uma série de fatores de virulência como proteases (principalmente protease alcalina e protease IV), elastases, fosfolipase C, exotoxina A e proteínas efetoras ExoS, ExoY, ExoT e ExoU. Uma boa revisão sobre a função destes fatores de virulência pode ser encontrada em Kipnis *et al.*, 2006.

A secreção da maioria destes fatores de virulência produzidos por *P. aeruginosa* depende da presença de sistemas especializados de secreção. Existem pelo menos cincotipos descritos em *P. aeruginosa* que estão envolvidos diretamente com a secreção destes fatores (Tseng *et al.*, 2009), sendo três deles melhor caracterizados.

O sistema de secreção do tipo I é o mais simples de todos sendo composto basicamente de um transportador do tipo ABC (ATP Binding Cassete), uma proteína de fusão de membranas e uma proteína de membrana externa. Um esquema simplificado é mostrado na figura 2. Moléculas de variados tamanhos podem ser secretadas e em *P. aeruginosa* a protease alcalina é o melhor exemplo de um fator de virulência que utiliza esta via (Guzzo *et al.*, 1991).

O sistema de secreção do tipo II é mais sofisticado e o transporte é feito em duas etapas. Primeiro ocorre o reconhecimento de um peptídeo sinal pelo sistema Sec ou Tat (Muller, 2005 e Driessen *et al.*, 1998) que faz o transporte do substrato até o periplasma. Uma vez no periplasma o substrato é transportado para o espaço extracelular através de um poro formado por um complexo protéico composto de varias subunidades (Fig. 2). Elastase,

fosfolipase C e exotoxina A são alguns fatores de virulência que são transportados via sistema de secreção do tipo II.

O sistema de secreção do tipo III envolve a secreção do substrato diretamente a partir do citoplasma da célula secretora para o citoplasma da célula hospedeira. Ele é o mais complexo de todos os sistemas de secreção e envolve a formação de uma estrutura parecida com uma agulha. Sua estrutura é semelhante ao corpo basal de um flagelo (Blocker *et al.*, 2003). Como os fatores de virulência são injetados diretamente no citoplasma da célula hospedeira eles são chamados de proteínas efetoras. ExoY, ExoS, ExoT e ExoU são as principais proteínas efetoras que se utilizam deste sistema de secreção, sendo extremamente importantes para o sucesso da infecção.

Figuras retiradas de: <http://en.wikipedia.org/wiki/Secretion>

Figura 2 - Visão esquemática dos três principais sistemas de secreção encontrados em *P. aeruginosa*. OM: membrana externa; IM: membrana interna; ABC: ATP binding cassette; MFP: proteína de fusão de membrana; OMP: proteína de membrana externa.

1.2-Regulação da expressão gênica:

P. aeruginosa possui um arsenal único de genes dedicados a regulação de seu magnífico repertório genético. Esta característica contribui para sua notável capacidade de colonizar os mais variados tipos de ambientes. Por exemplo, podem ser encontrados mais de 60 sistemas de dois componentes anotados em seu genoma (Rodrigue *et al.*, 2000), uma característica raramente encontrada em outros patógenos.

Outro aspecto bastante estudado em *P. aeruginosa* é a regulação da expressão gênica por um mecanismo conhecido como “quorum sensing” (percepção de quorum). Neste mecanismo, algumas moléculas, denominadas de auto-indutores, são produzidas pelas células e quando sua concentração no meio atinge um limiar, estas se ligam

ativadores de transcrição cognatos e que regulam a expressão de diversos genes, muitos deles envolvidos em patogenicidade e na formação de biofilmes (Schauder e Bassler, 2006; González e Keshavan, 2006). *P. aeruginosa* possui pelo menos três sistemas de QS já descritos. Dois destes sistemas, LasRI e RhlRI, são tipo LuxRI, onde os genes I codificam para as enzimas responsáveis pela síntese de auto-indutores acil-homoserina lactonas (AHLs) e os genes R codificam para os ativadores de transcrição. No terceiro sistema, os auto-indutores pertencem a uma família de heptil quinolinas, sendo PQS a primeira descrita. Neste último sistema, o ativador de transcrição pertence à família LysR e é denominado MvfR ou PqsR. (Xiao *et al.*, 2006; Déziel *et al.*, 2004).

Figura retirada de: Clin Infect Dis. (2008) 47:1070-1076

Figura 3 - Esquema mostrando os três sistemas de percepção de quorum em *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* apresenta dois sistemas do tipo LuxR/LuxI: LasR/LasI e RhlR/RhlI. LasI produz 3-oxo-C12-AHL enquanto RhlI produz C4-AHL. Estas AHLs se ligam aos seus respectivos receptores, LasR e RhlR. Uma vez ativados os receptores induzem a expressão de vários genes inclusive a sua própria (levando a sua auto-indução). LasR uma vez ativado, também aumenta a expressão do locus *rhl*, bem como *mvfR*, levando ao aumento da expressão de 4-hidroxi-2-heptilquinolona (HHQ) e *Pseudomonas* quinolone signal (PQS).

Atualmente, quatro genomas completos de *P. aeruginosa* estão anotados, incluindo o de PA14 (Stover *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2006), e o sequenciamento de mais dez genomas de

outras linhagens está em andamento (www.pseudomonas.com/viewAllGenomes.do). Além de possuir um grande genoma, que varia de 6,2 a 6,5 Mb entre as linhagens, *P. aeruginosa* ainda apresenta regiões altamente variáveis entre as linhagens, onde trechos de DNA podem ser inseridos ou deletados por transferência horizontal (Romling *et al.*, 2005), podendo conferir vantagens que aumentam ainda mais a adaptação da linhagem ao seu ambiente, sendo assim mantidos na população.

1.3- Linhagem PA14: modelo de estudo de patogenicidade

P. aeruginosa PA14 é uma linhagem isolada de queimadura (Rahme *et al.*, 1995) que apresenta vários fatores de patogenicidade comuns no quadro de infecção de diferentes tipos de hospedeiro filogeneticamente distintos (plantas, mamíferos ou invertebrados). Este último fato sugere a existência de mecanismos conservados de patogenicidade, possivelmente envolvidos na adaptação do organismo aos mais variados ambientes e tendo evoluído como uma ferramenta de exploração do organismo hospedeiro. Genes homólogos aos envolvidos na patogenicidade de PA14 encontram-se presentes também em outros patógenos de animais e plantas (Cao *et al.*, 2001, Tan *et al.*, 2002). Essas características tornam a linhagem PA14 um bom modelo para estudos dos genes e mecanismos envolvidos na patogenicidade. O genoma de PA14 apresenta-se maior (6,54 Mb) que o de PAO1. Estudos recentes associando a análise genômica e patogênese mostram que uma das características que parece contribuir para a virulência aumentada da linhagem PA14 em relação a outras linhagens de *P. aeruginosa* estudadas em laboratório é a presença de pelo menos duas ilhas de patogenicidade em seu cromossomo (He *et al.*, 2004).

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

antimicrobianos em *Drosophila melanogaster* (Apidianakis *et al.*, 2005). Uma publicação recente trazendo mais resultados sobre este gene foi feita por An *et al.*, 2009. Nesse trabalho também foi proposto uma nova nomenclatura para este gene *PA14_41070* que passou a ser denominado de *kerV*.

Figura 4 - Organização genômica de *kerV* em PA14 e D12. A figura mostra como foi feita a deleção na linhagem PA14 que deu origem a linhagem D12.

A linhagem D12, além do fenótipo atenuado em virulência, apresenta menor produção de ramnolipídeos e maior produção de piocianina do que PA14 (Baldini *et al.*, resultados não publicados) (Fig. 5). Como ambas as características são reguladas via sistema de percepção de quorum, a expressão de diversos genes sabidamente envolvidos neste sistema foram analisados, encontrando-se numerosas diferenças entre PA14 e D12, o que sugere que a função do gene *kerV* está de maneira direta ou indiretamente envolvida num passo de regulação gênica, provavelmente acima do sistema de percepção de quorum. Um exemplo disto é exemplificado na figura 6, onde se observa que a linhagem D12 apresenta um maior acúmulo de 3-oxo-C12-AHL na fase estacionária de crescimento.

Outra característica apresentada por esta linhagem é ser parcialmente defectiva nas motilidades do tipo 'swarming' e 'twitching', como observado na figura 5. Enquanto a linhagem D12 apresenta um atraso na formação do swarming quando comparado com a linhagem selvagem, no 'twitching' a linhagem D12 apresenta uma morfologia do centro da colônia alterada.

Outro dado importante neste trabalho se refere aos resultados de transcriptoma desta linhagem (Rahme *et al.*, dados não publicados). Foi observado que há mais de 500 genes que são pelo menos 3 vezes induzidos ou reprimidos na linhagem D12. Estes fatos serviram de base para explorar os mecanismos de ação deste gene.

Figura 5 - *P. aeruginosa* D12 é defeitiva na produção de ramnolipídeos, na formação de “swarming” e “twitching”. A linhagem D12 também apresenta uma maior produção de piocianina. **A.** Produção de ramnolipídeos em meio contendo CTAB e azul de metileno é visualizada através da formação de um halo transparente ao redor da colônia. **B.** Ensaio de motilidade do tipo “swarming” em placas de meio semi-sólido. **C.** Aspecto visual das culturas cultivadas em meio LB. Pode-se observar que a cultura da linhagem D12 apresenta uma coloração verde mais intensa, o que caracteriza maior produção de piocianina. **D.** D12 apresenta uma formação da motilidade do tipo “twitching” defeitiva, apresentando o centro da colônia diferenciado em relação a linhagem selvagem.

Figura 6 - Quantificação dos níveis das N-Acila-Homoserina-Lactonas (AHLs), C4-AHL e 3-oxo-C12-AHL, no sobrenadante de PA14 e D12. Enquanto os níveis de C4-AHL é semelhante entre as linhagens PA14 e D12(A), os níveis de 3-oxo-C12 estão aumentados na fase estacionária na linhagem D12 (B)(Baldiniet al., dados não publicados).

1.4- O gene *kerV*:

A organização da região que contém o gene *kerV* mostra que à jusante a este gene encontra-se o gene *rnhA* e logo em seguida o gene *dnaQ*. Eles apresentam a mesma orientação de transcrição e experimentos indicam que estes genes em PA14 podem ser transcritos como um único operon (A.P.B. Nascimento e RL Baldini, dados não publicados). *kerV* também se encontra à montante do gene *gloB* (PA14_41080).

Ao verificar a presença desses genes (*gloB*, *kerV*, *rnhA* e *dnaQ*) em outras linhagens de *Pseudomonas* observa-se que eles são conservados. Uma análise mais detalhada, da ocorrência destes genes, feita por An *et al.*, 2009, mostra que 51 % dos 196 ortólogos analisados, apresentam a exata disposição dos genes do locus *gloB-kerV-rnhA-dnaQ*.

DnaQ ou epsilon é a subunidade da DNA polimerase III responsável por correção de erros, com atividade exonucleásica 3'-5' (Scheuermann e Echols, 1984). *dnaQ*, também denominado *mutD*, foi caracterizado com um gene mutador (Takano *et al.*, 1986), o que significa que, na ausência ou diminuição de sua função, a frequência de mutação da bactéria fica aumentada.

RNase HI, produto do gene *rnhA*, é uma ribonuclease que possui uma função pouco compreendida em bactérias e está envolvida na degradação de fitas de RNA que são parte de fitas híbridas de DNA-RNA e, portanto está envolvida nos processos de replicação e transcrição (Drolet, 2006 e Kogoma, 1997), transcrição reversa (Ohtani *et al.*, 1999) e produção de msDNA (Lampson *et al.*, 2004).

PA14_41080 (*gloB*) codifica uma glioxalase II (hidroxiacilglutathione hidrolase) que está envolvida na etapa final de detoxificação do metilglioxal, um metabólito tóxico derivado do metabolismo da dihidroxiacetona fosfato (Ferguson *et al.*, 1998).

1.5- Domínio de metiltransferase:

A busca por domínios conservados na base de dados do CDD ou KEGG, revelaram que o produto codificado por *kerV* apresenta um domínio de metiltransferase pertencente a família de metiltransferases dependentes de S-adenosil metionina (SAM). Metiltransferases dependentes de SAM catalisam a transferência do grupamento metil que está ligado ao átomo de enxofre, a partir da molécula de S-Adenosil Metionina (SAM), para um

determinado substrato. Os produtos desta reação são S-adenosil homocisteína (SAH) e o substrato metilado (Fig. 7A). Os substratos que podem ser metilados são variados, sendo descritas metilações ocorrendo em DNA, RNAs, proteínas, lipídeos ou pequenas moléculas.

Outra característica é que as metiltransferases dependentes de SAM são uma grande família de proteínas que apesar de apresentarem pouca similaridade de sequência entre si, apresentam uma estrutura terciária bem característica. Geralmente esta estrutura é formada por fitas- β alternadas a α -hélices (Fig. 7B). Estas fitas β , geralmente seis ou sete, formam uma folha β -pregueada central com cerca de três α -hélices em cada lado, caracterizando dois domínios (Martin e McMillan, 2002). O domínio N-terminal geralmente apresenta os motivos de ligação a S-adenosil metionina (SAM), doador do grupamento metil, e o domínio C-terminal, apresenta os motivos de ligação ao seu substrato, que será alvo da metilação (Martin e McMillan, 2002).

Figura 7 - Esquema mostrando a reação geral de transferência de grupamentos metil para um substrato genérico, a partir de S-adenosil metionina (SAM). Como produtos desta reação de transferência têm S-adenosil homocisteína (SAH) e o substrato metilado. (A) Esquema geral destacando o tipo de enovelamento apresentado por metiltransferases dependentes de SAM. Geralmente o domínio N-terminal contém os motivos de ligação a SAM enquanto o domínio C-terminal os motivos de ligação ao substrato.

As metiltransferases dependentes de SAM podem ser estruturalmente classificadas em cinco famílias distintas, sendo a família de classe I (como descrito acima) a mais importante. Esta família possui o maior número de metiltransferases com estrutura cristalográfica resolvida sendo este, portanto, o tipo de enovelamento mais encontrado (Schubert *et al.*, 2003). Os membros das outras quatro famílias apresentam algumas variações em suas estruturas que não são frequentemente encontradas. Para exemplificar foi descrito apenas uma metiltransferase para cada uma das famílias de classe II e classe IV (Schubert *et al.*, 2003)

A localização na estrutura da molécula dos motivos que compõe o domínio de ligação ao SAM são muito bem conservados, porém há uma enorme variação nos resíduos que compõem estes motivos, gerando variadas possibilidades de interação com SAM. Na literatura, duas principais classificações, relacionadas aos motivos que compõe a ligação a SAM, podem ser encontradas. Uma classificação mais antiga, onde se destaca os motivos I, pós-I, II e III. Nesta classificação os motivos I e pós-I interagem diretamente com SAM, enquanto II e III interagem entre si e com uma porção do motivo I para formar a parte central da folha β (Kagan e Clarke, 1994; Niewmierzycka e Clarke, 1999). Esta classificação se enquadra em muitas metiltransferases descritas na literatura, principalmente as de leveduras, porém com um maior número de estruturas cristalográficas de metiltransferases dependentes de SAM sendo resolvidas, novos motivos foram sugeridos. Mais recentemente, o motivo I foi caracterizado como um motivo rico em glicinas, p. ex. DXFXGXG (Jeltsch, 2002) e RXXGGY (Schubert *et al.*, 2003), que interagem principalmente com a porção de aminoácido da molécula de SAM. O motivo II, localizado num loop entre uma fita β e uma α -hélice onde existem resíduos que interagem principalmente com a ribose da molécula de SAM. E, finalmente, um motivo III, que contém resíduos de aminoácidos que vão interagir principalmente com o anel de adenina da molécula de SAM (Martin e McMillan, 2002, Jeltsch, 2002).

O domínio C-terminal, que dá a especificidade a cada metiltransferase, é bem variado, pois cada enzima pode metilar um substrato diferente. Podem ser encontradas metiltransferases que metilam DNA, RNAs, proteínas, lipídeos ou pequenas moléculas.

1.6- Importância das reações de metiltransferase na fisiologia da célula:

SAM é o segundo substrato mais abundante na célula depois do ATP (Cantoni, 1975) podendo servir como fonte de uma série de grupamentos químicos importantes (Fontecave *et al.*, 2004). Porém são nas reações que envolvem a transferência do seu grupamento metil catalisadas por metiltransferases é que sua importância se torna mais evidente.

Como já mencionado, vários substratos podem ser alvos de metilação, sendo os exemplos mais bem estudados os que envolvem essas modificações covalentes no DNA, RNA e proteínas.

1.6.1- Metilação do DNA:

A metilação do DNA é descrita como uma das principais formas de controle epigenético. Os resíduos modificados podem ser considerados como a 5^o, 6^o e 7^o bases do DNA, pois apresentam propriedades distintas que permitem a regulação de diversos processos, tais como a replicação e a transcrição (Casadesus e Low, 2006 e Jeltsch, 2002). Enquanto em procariotos podem ser encontradas até três tipos de modificações mostrados na figura 9, em eucariotos somente pode ser encontrado a modificação do tipo 5-metilcitosina ($m^5\text{-C}$).

Adaptado de: ChemBioChem (2002)3:274-293

Figura 8 - Padrão de metilação das bases do DNA. Podem ser encontradas metilações no N6 do resíduo de adenina, N4 ou C5 do resíduo de citosina. Em eucariotos é encontrada somente a metilação no C5 do resíduo de citosina enquanto em procariotos é observado os três tipos de metilação.

O exemplo mais conhecido da função da metilação do DNA em procariotos envolve os sistemas de restrição e modificação (Wilson e Murray, 1991), porém há exemplos de outros processos onde a metilação do DNA também é importante.

Em *E. coli*, o estado de metilação do DNA, determinado pela metiltransferase Dam (Dideoxiadenosina metiltransferase), é importante em pelo menos três processos: o reparo tipo “mismatch repair”, por exemplo, acontece no sentido de restaurar o pareamento das fitas do DNA pós-replicação, utilizando como molde a fita-mãe, metilada, e corrigindo os erros introduzidos na fita-filha, que permanece desmetilada momentaneamente. O estado de metilação do DNA também está envolvido na regulação de genes em *E. coli*: a expressão do pili associado a pielonefrite (Pap) em linhagens de *E. coli* uropatogênicas pode ser regulada pela combinação da metilação em sítios Dam-específicos e ligação de certas proteínas na região regulatória do operon *pap* (Casadesus e Low, 2006). Outro exemplo onde Dam parece ser importante em *E. coli* é no controle da replicação do DNA. Os sítios GATC localizados na origem de replicação (*oriC*), hemimetilados imediatamente pós-replicação, servem de sítios de ligação da proteína SeqA, que impede temporariamente a ligação de DnaA, impedindo assim o re-início da replicação. A ligação de SeqA é temporária e assim que os sítios GATC são novamente metilados pela Dam, pode ocorrer o início da replicação novamente (Casadesus e Low, 2006)

Em *Salmonella enterica*, níveis alterados da expressão de Dam levam a defeitos na expressão de genes envolvidos em virulência, motilidade, síntese de flagelina e resistência a bile (Badie *et al.*, 2007). Os mecanismos descritos envolvendo a expressão de pili em *E. coli* e a regulação de genes relacionados à virulência em *S. enterica* fazem parte do mecanismo denominado variação de fase. Este mecanismo é reversível e permite uma alta adaptabilidade diante de diferentes situações encontradas ao longo do seu ciclo de vida e é mediado através de mutação, reorganização ou modificação da molécula de DNA (Saunders *et al.*, 2003). Em *P. aeruginosa*, uma série de processos, incluindo motilidade, produção de flagelo e formação de biofilme também envolve o fenômeno de variação de fase, porém os mecanismos moleculares envolvidos na regulação ainda não estão totalmente elucidados (Broek *et al.*, 2005).

No genoma de *P. aeruginosa*, não há nenhum gene homólogo a *dam* e, apesar dos genes *mutL* e *mutS* estarem presentes, também não existem homólogos a *mutH* (Løbner-Olesen *et al.*, 2005). Além disso, não se encontram quaisquer relatos na literatura sobre o estado de metilação do DNA e de como seria o funcionamento de um sistema de reparo do tipo “mismatch”. Entretanto, mutações em *mutL* e *mutS* estão relacionadas com fenótipos mutadores em *P. aeruginosa* (Oliver *et al.*, 2002). Outro dado interessante é que embora não haja um mecanismo proposto de como acontece o reconhecimento da fita a ser reparada em bactérias que não apresentam homólogos a *mutH*, existem evidências de que este reconhecimento é feito por extremidades 3'-hidroxil livres deixadas durante a replicação da fita descontínua (Genschel *et al.*, 2002).

Considerando esses fatos, uma hipótese atraente seria de que a metiltransferase codificada por *kerV* teria como alvo o DNA, agindo provavelmente em conjunto com outras proteínas, que poderiam conferir afinidade e especificidade a sua atividade. Essa hipótese se enquadra no fenótipo pleiotrópico da linhagem D12, que apresenta vários genes com expressão alterada em relação à linhagem selvagem.

1.6.2- Metilação de RNAs:

As moléculas de RNA apresentam metilações em posições mais diversificadas que as encontradas nas moléculas de DNA. Por exemplo, podem ser encontradas metilações em mais de 17 diferentes posições nas moléculas de adenosina, 10 nas citidinas, 14 nas guanosinas e 28 nas uridinas (<http://modomics.genesilico.pl/>), alguns desses exemplos são mostrados na figura 9. Porém, somente um número limitado de enzimas que catalisam essas modificações têm sido caracterizadas, sendo que a maior parte delas foram descritas em *E. coli* (Roovers *et al.*, 2004).

Figura 9 - Alguns exemplos de metilações que podem ser encontradas em moléculas de RNA. Os nomes dessas modificações são: m¹A, 1-metiladenosina; m⁶A, N⁶-metiladenosina; m²G, N²-metilguanosina; Gm, 2-O-metilguanosina; m³C, 3-metilcitidina; m⁴C, 4-metilcitidina; m³U, 3-metiluridina e Um, 2'-O-metiluridina.

As modificações pós-transcricionais no RNA ribossomal de *E. coli* são bem caracterizadas. Até hoje são conhecidas pelo menos 11 modificações que estão presentes na subunidade 16S, sendo 10 metilações e 25 modificações na subunidade 23S, sendo 14 metilações (MODOMICS - <http://modomics.genesilico.pl/>). A maioria das enzimas que catalisam estas modificações também já foram identificadas e caracterizadas e somente algumas aguardam identificação (Kimura e Suzuki, 2010 e Puerta *et al.*, 2009). A maioria destas modificações está localizada em regiões que participam de contatos intermoleculares de RNA-RNA (Korostelov *et al.*, 2006). Elas também parecem ter importância no processo de maturação destes rRNAs já que, embora não seja muito bem esclarecida, a eficiência da síntese protéica dos RNAs 16S e 23S que apresentam estas modificações são superiores aqueles que não as possuem (Green e Noller, 1999, Khaitovich *et al.*, 1999a e 1999b e Krzyzosiak *et al.*, 1987). Também foi mostrado que algumas modificações, principalmente metilações, estão envolvidas com o fenômeno de resistência a antibióticos (Gale *et al.*, 1981).

Também são descritas metilações em que ocorrem em tRNAs. Em *E. coli*, são descritas pelo menos cinco tipos de metilação que estão presentes em pelo menos 47 tRNAs (MODOMICS - <http://modomics.genesilico.pl/>). Embora ainda não haja uma função bem

definida descrita para essas modificações há alguns estudos que sugerem que são importantes para o processo de maturação e estabilidade dessas moléculas bem como importantes no reconhecimento dos códons durante o processo de tradução (Brahmachari e Ramakrishnan, 1984 e Peterkofsky *et al.*, 1971).

1.6.3- Metilação de proteínas:

A metilação de resíduos de aminoácidos em proteínas é bem diversificada, podendo ser encontradas metilações nos resíduos de lisina, arginina, glutamina, histidina, alanina, prolina, fenilalanina, asparagina e metionina (Poledova e Sherman, 2007).

O exemplo mais estudado em bactérias é a metilação de receptores envolvidos em quimiotaxia. Em *E. coli*, a transdução de sinais feita através destes receptores é regulada pela metilação de resíduos de ácidos glutâmicos presentes na porção citoplasmática destes receptores (Kim *et al.*, 1999). A metilação é catalisada por CheR, uma metiltransferase dependente de S-adenosil metionina (Springer e Koshland, 1977).

Outro exemplo estudado sobre metilação de proteínas é o que envolve a metilação de proteínas ribossomais. Em *E. coli* são descritas metilações ocorrendo em cerca de sete proteínas ribossomais. As proteínas S11, L3, L7/L12, L16, e L33 são todas monometiladas. S11 e L33 apresentam monometilações no resíduo de alanina, L16 apresenta monometilação no resíduo de metionina (Chen *et al.*, 1977) e L3 apresenta monometilação em um resíduo de glutamina (Lhoest e Colson, 1977). As proteínas L7/L12 apresentam diversas monometilações em resíduos de lisina, sendo a quantidade destas metilações reguladas pela temperatura (Chang, 1978). A proteína L11 apresenta nove metilações sendo duas trimetilações em resíduos de lisina (Lys3 e Lys39) e uma trimetilação em um resíduo N-terminal de alanina (Dognin and Wittmann-Liebold, 1980). Embora ainda não bem estudadas estas modificações em geral, por agregarem um caráter hidrofóbico as regiões as quais são adicionadas, devem alterar de maneira sutil interações que acontecem entre proteínas ribossomais e rRNAs durante a biogênese dos ribossomos (Kaczanowska e Rydén-Aulin, 2007), pois não produzem fenótipos aparentes. A única exceção descrita até o momento é a metilação da proteína L3, cujo mutante para a metiltransferase que catalisa esta reação apresenta defeito no crescimento e sensibilidade ao frio (Lewicki *et al.*, 1993).

Embora ainda existam poucos exemplos na literatura de fenômenos que sejam regulados por modificações pós-traducionais em bactérias, nos últimos anos um crescente número estudos mostram que outras proteínas envolvidas na tradução, como os fatores de liberação de polipeptídeos de classe 1, RF1 e RF2 (Heurgué-Hamard *et al.*, 2002), o fator de alongação Tu (Van-Noort *et al.*, 1986) também podem ser metilados em procariotos (Poledova e Sherman, 2007).

1.6.4- Outros alvos de metilação:

Os outros alvos de metilação podem incluir lipídeos e pequenas moléculas. Para estes substratos as reações em que as metiltransferases participam muitas vezes fazem parte da via de biossíntese dessas moléculas, diferentemente nas modificações pós-síntese observadas nas macro-moléculas descritas, onde suas funções parecem ser mais reguladas. Deste modo, como exemplo, podem ser encontradas metiltransferases dependentes de SAM participando na via de formação de ubiquinonas, UbiG e COQ3 (Szkopinska, 2000), na conversão de fosfatidiletanolamida em fosfatidilcolina em *Agrobacterium tumefaciens*, PmtA (Phospholipid N-methyltransferases) (Aktas e Narberhaus, 2009), na conversão de fenazina 1-ácido carboxílico em piocianina em *P. aeruginosa*, PhzM (Mavrod *et al.*, 2001) e outros exemplos.

2- Objetivo:

O objetivo deste trabalho foi estudar a função da proteína codificada pelo gene *kerV* de *Pseudomonas aeruginosa* PA14, envolvido em virulência e aparentemente em regulação gênica.

2.1- Objetivos específicos:

- Verificar a relação de *kerV* com o sistema de reparo de *P. aeruginosa*.
- Purificar a proteína codificada por *kerV* para ensaios *in vitro* de metilação e ligação a SAM.
- Analisar a expressão do locus *kerV-rnhA-dnaQ* e dissecar o efeito de cada gene no fenótipo do mutante *kerV*.

3- Material e métodos:

3.1- As linhagens de microrganismos, vetores e oligos utilizados:

Tabela 1- Linhagens usadas neste trabalho:

Linhagens	Características	Fonte ou referência
<i>P. aeruginosa</i>		
PA14 Rif^s	Isolado UCBPP-PA14 original, sensível a rifampicina	L. G. Rahme
PA14	Derivada de PA14 Rif ^s selecionada para resistência a rifampicina.	Rahme <i>et al.</i> , 1995
33C7	PA14 contendo um transposon TnPhoA inserido em <i>kerV</i> . Apresenta também uma mutação secundária não determinada responsável pela ausência do antígeno O do lipopolissacarídeo.	Rahme, 1997
D12	PA14 apresentando uma deleção correspondente a 209 aminoácidos na região codificadora de <i>kerV</i> , mantendo a fase de leitura.	Apidianakis <i>et al.</i> , 2005
DA17	PA14 apresentando uma deleção correspondente a 243 aminoácidos na região codificadora de <i>kerV</i> , mantendo a fase de leitura.	An <i>et al.</i> , 2009
DM01 e 02	PA14 e D12, carregando fragmento de DNA correspondente a <i>kerV</i> mais 500 pb a montante de sua região codificadora integrados no sítio <i>ctx</i> . Tet ^R	Este trabalho
DM03 e 04	PA14 e D12, respectivamente carregando fragmento de DNA correspondente a <i>rnhA</i> mais 762 pb a montante de sua região codificadora (suposta região promotora) integrados no sítio <i>ctx</i> . Tet ^R	Este trabalho
DM05 e 06	PA14 e D12, respectivamente carregando fragmento de DNA correspondente a <i>dnaQ</i> mais 515 pb a montante de sua região codificadora (suposta região promotora) integrados no sítio <i>ctx</i> do cromossomo de cada linhagem. Tet ^R	Este trabalho
DM07 e 08	PA14 e D12, respectivamente carregando fragmento de DNA correspondente a <i>kerV</i> mais 500 pb a montante de sua região codificadora mais região codificadora de <i>rnhA</i> e <i>dnaQ</i> integrados no sítio <i>ctx</i> do cromossomo de cada linhagem. Tet ^R	Este trabalho
DM09 e 10	PA14 e D12, respectivamente carregando fragmento de DNA correspondente a <i>rnhA</i> e <i>dnaQ</i> integrados no sítio <i>ctx</i> . Tet ^R	Este trabalho
DM11 e 12	PA14 e D12, respectivamente carregando fragmento de DNA correspondente a <i>kerV</i> e <i>rnhA</i>	Este trabalho

integrados no sítio <i>ctx</i> . Tet ^R		
DM13 e 14	PA14 e D12, respectivamente carregando o fragmento <i>dnaQ-lacZ</i> integrados no sítio <i>attTn7</i> . Gm ^R	Este trabalho
DM15 e 16	PA14 e D12, respectivamente carregando fragmento de DNA correspondente a <i>kerV</i> e <i>rnhA</i> integrados no sítio <i>attTn7</i> . Gm ^R	Este trabalho
DM17 e 18	PA14 e D12, respectivamente contendo a construção <i>lac::GFP-Kerv</i> integrados no sítio <i>attTn7</i> . Gm ^R	Este trabalho
DM19 e 20	PA14 e D12, respectivamente carregando fragmento de DNA correspondente 500 pb à montante de <i>kerV</i> em fusão de transcrição ao <i>lacZ</i> , integrado no sítio <i>ctx</i> . Tet ^R	Este trabalho
DM20 e 21	PA14 e D12, respectivamente carregando fragmento de DNA correspondente 754pb à montante de <i>rnhA</i> em fusão de transcrição ao <i>lacZ</i> , integrado no sítio <i>ctx</i> . Tet ^R	Este trabalho
DM22 e 23	PA14 e D12, respectivamente carregando fragmento de DNA correspondente 249pb à montante de <i>mut-rnhA</i> em fusão de transcrição ao <i>lacZ</i> , integrado no sítio <i>ctx</i> . Tet ^R	Este trabalho
DM24 e 25	PA14 e D12, respectivamente carregando fragmento de DNA correspondente 453pb à montante de <i>dnaQ</i> em fusão de transcrição ao <i>lacZ</i> , integrado no sítio <i>ctx</i> . Tet ^R	Este trabalho
DM26 e 27	DM24 e DM25, respectivamente carregando vetor pUCp18. Cb ^R e Tet ^R	Este trabalho
DM28 e 29	DM24 e DM25, respectivamente carregando a construção pUCp18 <i>kerV</i> . Cb ^R e Tet ^R	Este trabalho
DM30 e DM31	PA14 e D12, respectivamente carregando fragmento de DNA correspondente 618pb à montante de <i>kerV</i> em fusão de transcrição ao <i>lacZ</i> , integrado no sítio <i>ctx</i> . Tet ^R	Este trabalho
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	<i>supE44 lacU169(80 lacZM15) hsdR17recA1 endA11 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Invitrogen

DH10B	<i>F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ- rpsL nupG</i>	Invitrogen
BL21 (DE3)	<i>F⁻ ompTgaldcmlon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])</i>	Studier e Moffatt, 1986
S17-1	<i>prothirecA hsdR (r⁻ m⁺) T^p^R Sm^R Km^S [Ω RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7]</i>	Simon <i>et al.</i> , 1982
ArcticExpress™ (DE3)RP	<i>E. coli B F⁻ ompThsdS(rB⁻ mB⁻) dcm⁺ Tet^r gal λ(DE3) endA Hte [cpn10 cpn60 Gent^r] [argUproL Str^r]</i>	Stratagene
Outras linhagens		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> PJ694-a	<i>MATa trp1-901 leu2-3 112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ</i>	Alegria <i>et al.</i> , 2004
<i>Bordetella pertussis</i> 18323	ATCC 9797	Dias, W.D. (Instituto Butantan)

Tabela 2-Vetores e construções usadas neste trabalho:

Vetores e construções	Característica	Fonte
Vetores de expressão		
pGEX 4.T1	Adiciona uma Glutathione-S-transferase (GST) ao produto do gene clonado. Ap ^R	GE Helthcare
pPROEX-hta,	Adiciona cauda de poli-histidina na posição N-terminal do produto do gene clonado, Ap ^R	Invitrogen
pET43.1b	Adiciona cauda de poli-histidina na posição N-terminal ou C-terminal do produto do gene clonado, Ap ^R	Novagen
pET28.1a	Adiciona cauda de poli-histidina na posição N-terminal ou C-terminal do produto do gene clonado, Km ^R	Novagen
pMAL-c2	Adiciona uma Maltose Binding Protein (MBP) na posição N-terminal ao produto do gene clonado. Expressão no citoplasma. Ap ^R	NEB
pMAL-p2	Adiciona uma Maltose Binding Protein (MBP) na posição N-terminal do produto do gene clonado. Expressão no periplasma. Ap ^R	NEB
pUCp18	Vetor de expressão usado em <i>Pseudomonas spp.</i>	Schweizer <i>et al.</i> , 1991
pEA18	Adiciona GFP na posição N-terminal produto do gene clonado, Ap ^R	Gueiros-Filho e Losick, 2002
pUC18T-miniTn7 LAC	Promotor <i>lac</i> indutível por adição de IPTG	Choi e Schweizer, 2006
Outros vetores		
pOAD	Adiciona ao gene clonado o domínio de	Ueltz <i>et al.</i> , 2000

	ativação usado nos ensaios de duplo-híbrido na levedura <i>S. cerevisiae</i> pJ694a	
pOBD	Adiciona ao gene clonado o domínio de ligação usado nos ensaios de duplo-híbrido na levedura <i>S. cerevisiae</i> pJ694a	Ueltz <i>et al.</i> , 2000
mini-CTX2	Vetor usado para integração de fragmentos de DNA no sítio de integração <i>ctx</i> . Tet ^R	Hoang <i>et al.</i> , 2000
mini-CTX <i>lacZ</i>	Vetor usado para construção de fusões de transcrição com o gene <i>lacZ</i> . As fusões geradas podem ser integradas no sítio de integração <i>ctx</i> . Tet ^R	Becher e Schweizer, 2000
pGEM-T e pGEM-T “easy”	Vetores de clonagem para produtos de PCR. Ap ^R	Promega
Construções		
pDM001	<i>dnaQ</i> de PA14 clonado no vetor pGEM-T easy	Este trabalho
pDM002	<i>rnhA</i> de PA14 clonado no vetor pGEM-T easy	Este trabalho
pDM003	<i>kerV</i> de PA14 clonado no vetor pGEM-T easy	Este trabalho
pDM004	<i>dnaQ</i> de PA14 clonado no vetor pOBD	Este trabalho
pDM005	<i>dnaQ</i> de PA14 clonado no vetor pOAD	Este trabalho
pDM006	<i>rnhA</i> de PA14 clonado no vetor pOBD	Este trabalho
pDM007	<i>rnhA</i> de PA14 clonado no vetor pOAD	Este trabalho
pDM008	<i>kerV</i> de PA14 clonado no vetor pOBD	Este trabalho
pDM009	<i>kerV</i> de PA14 clonado no vetor pOAD	Este trabalho
pDM010	<i>dnaQ</i> de PA14 clonado no vetor pPROEXhta	Este trabalho
pDM011	<i>rnhA</i> de PA14 clonado no vetor pPROEXhta	Este trabalho
pDM012	<i>kerV</i> de PA14 clonado no vetor pGEX4T1	Este trabalho
pDM013	<i>kerV</i> de PA14 clonado no vetor pET43.1b	Este trabalho
pDM014	<i>kerV</i> de PA14 clonado no vetor pMAL-c2	Este trabalho
pDM015	<i>kerV</i> de PA14 clonado no vetor pMAL-p2	Este trabalho
pDM016	Região de 500 pb à montante da região codificadora de <i>kerV</i> mais região codificante de <i>kerV</i> de PA14 clonado no vetor mini-CTX2	Este trabalho
pDM017	Região de 500 pb à montante da região	Este trabalho

	codificadora de <i>kerV</i> mais região codificante de <i>kerV</i> de PA14 clonado como fusão de tradução com eGFP no vetor pUC18T-mini Tn7T-eGFP	
pDM018	Região de 764 pb à montante da região codificadora de <i>rnhA</i> mais região codificante de <i>rnhA</i> de PA14 clonado no vetor mini-CTX2	Este trabalho
pDM019	Região de 541pb à montante de <i>dnaQ</i> mais região codificante de <i>dnaQ</i> de PA14 clonado no vetor mini-CTX2	Este trabalho
pDM020	Região de 500 pb à montante da região codificadora de <i>kerV</i> mais região codificante de <i>kerV</i> , <i>rnhA</i> e <i>dnaQ</i> de PA14 clonado no vetor mini-CTX2	Este trabalho
pDM021	Região de 500 pb à montante da região codificadora de <i>kerV</i> mais região codificante de <i>kerV</i> e <i>rnhA</i> de PA14 clonado no vetor mini-CTX2	Este trabalho
pDM022	Região de 762 pb à montante da região codificadora de <i>rnhA</i> mais região codificante de <i>rnhA</i> e <i>dnaQ</i> de PA14 clonado no vetor mini-CTX2	Este trabalho
pDM023	Região codificante de <i>kerV</i> de PA14 clonado como fusão de tradução com GFP no vetor pUC18T-mini Tn7 LAC	Este trabalho
pDM024	BP3212 de <i>B. pertussis</i> clonado no vetor pET23.1a	Este trabalho
pRB320	<i>kerV</i> de PA14 clonado no vetor pPROEX-Hta	R. L. Baldini
pUCp1814	Região correspondente de 500 pb à montante da região codificadora de <i>kerV</i> mais região codificante de <i>kerV</i> clonada no vetor pUCp18	R. L. Baldini
pUCp18kerV	Região correspondente a região codificadora de <i>kerV</i> clonada no vetor pUCp18	Este trabalho
pEXΔC7	Derivado do pEXAp, Cb ^r , <i>sacB</i> carregando <i>kerV</i> com deleção 504 pb de em fase de leitura.	Apidianakis <i>et al.</i> , 2005
pT-GroELS	Expressão das chaperoninas GroEL e GroES. Usado para aumentar a solubilidade de proteínas heterólogas em <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Yasukawa <i>et al.</i> , 1995
pT-Trx	Expressão da proteína Tiorredoxina. Usado para aumentar a solubilidade de proteínas heterólogas em <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Yasukawa <i>et al.</i> , 1995

Tabela 3-Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho:

Oligo-nucleotídeo	Sequência ¹	Utilização	Temp. hibridização
dnaQLeft	AAGAATTCATGCGTAGCGTCGTACTG	Amplificação da região codificadora de <i>dnaQ</i> .	60 °C
dnaQRight	AACTGCAGAGTTCTGCGACACCTTGCT		
rnhLeft	AAGAATTCAGTCAGCCGGCGAGATTC	Amplificação da região codificadora de <i>rnhA</i> .	60 °C
rnhRight	AAGTCGACGCTGGTGAACGCTTGTTTC		
41070upper	CCCGGGGAATTCATGAACGAACCGCAAGCCTTC	Amplificação da região codificadora de <i>kerV</i> .	65 °C
41070lower	CCCGGGGTCGACCTAAATTCGGAATCTCGCCG		
DM3F	AACATATGAACGAACCGCAAGCC	Amplificação da região codificadora de <i>kerV</i> sem ‘stop códon’.	60 °C
DM3R	ACAAGCTTATCTCGCCGGCTGACTTT		
DM4F	CCGGGGCGGCCGCATGAACGAACCGCAAGCCTTC	Amplificação da região codificadora de <i>kerV</i> .	65 °C
DM4R	CCGGGGATTCTCTAAATTCGGAATCTCGCCG		
Ori_left	AAGAATTCCTCCGTACCGGATAAATCAGA	Amplificação da região que corresponde à origem de replicação de PA14.	60 °C
Ori_right	AACTGCAGGAGATCCACGCACTGCT		
qRTnha_left	CCGATCCGTCTGATCACC	qRT-PCR do gene <i>rnhA</i>	60 °C
qRTnha_right	TTGACAGGCTGCTTGCTG		
qRTdnaQ_left	TGCGTAGCGTCGTACTGG	qRT-PCR do gene <i>dnaQ</i>	60 °C
qRTdnaQ right	GCTCGACACAGCCGATCT		
1814_upper	CGAGCACCGGGCAGATTCA	qRT-PCR do gene <i>kerV</i>	60 °C
1814_lower	CGGCTTCGCGCAGGAGAC		
nadB_upper	CTACCTGGACATCAGCCACA	normalizador do qRT-PCR	60 °C
nadB lower	GGTAATGTCGATGCCGAAGT		
Ori_right ²	AAGAATTCCTCCGTACCGGATAAATCAGA	Amplificação da região correspondente a origem de replicação de PA14	60 °C
Ori_left ²	AACTGGACGAGAAGATCCACGCACTGCT		

BP3212_right BP3212_left	TTAAGCTTC GGAATGAAAGTACGGCATT ATGAATTCT ATTGGAAAGGGATCGACAGC	Amplificação da região codificadora do gene <i>BP3212</i> de <i>B. pertussis</i> ATCC 9797	60 °C
Δ C75' upper	CGAATTC GTCTCCGCCGGGTGGTAGTAGG	Amplificação de <i>kerV</i> com 500 pb a montante de sua região codificadora (região promotora)	60 °C
<i>racednaQ1</i> <i>racednaQ2</i> <i>racednaQ4</i>	GGTCATCGCCAGGTAGACG CGTTGTTGATGAAGCCGATA TATCCAGTACGACGCTACGC	5'RACE e primer extension do gene <i>dnaQ</i>	55 °C
<i>racernhA1</i> <i>racernhA2</i> <i>racernhA3</i>	GACCCACTGCCACTCCAC ATTCTTGACAGGCTGCTTGC CGCCGTCGGTATAGATCACT	5'RACE e primer extension do gene <i>rnhA</i>	55 °C
<i>racekerV1</i> <i>racekerV2</i> <i>racekerV3</i> <i>racekerV4</i>	TTGCGTGCCACCAATAGATA ACAGGCTCCATGGGTTGAT ACCAGGTAGCCACCGAAGTA GGCTTGCGGTTCTGTTTCAT	5'RACE e primer extension do gene <i>kerV</i>	55 °C
2TRAD <i>rnhA</i> _left 2TRAD <i>rnhA</i> _right	AAAAGCTT AGGAGCGACGCCTGTTGT TAGAATTC GATCACTACCTGTTCTTTATCTGTCA	Fusão de transcrição da região promotora de <i>rnhA</i> no vetor mini-CTX <i>lacZ</i>	60 °C
2TRAD <i>dnaQ</i> _left 2TRAD <i>dnaQ</i> _right	AAAAGCTT GGCATGACAGATAAAGAACAGG TAGAATTC ATCCAGTACGACGCTACG	Fusão de transcrição da região promotora de <i>rnhA</i> no vetor mini-CTX <i>lacZ</i>	60 °C
TRAD <i>kerV</i> _left TRAD <i>kerV</i> _right	TAAAGCTT CCGGGTGGTAGTAGGCGATA AAGAATTC AAGGCTTGCGGTTCTGTTTC	Fusão de transcrição da região promotora de <i>rnhA</i> no vetor mini-CTX <i>lacZ</i>	60 °C

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

² Os resíduos sublinhados são potenciais sítios onde haverá perda de hibridização devido ao tratamento com bisulfito de sódio.

3.2- Condições de cultivo:

Culturas de *P. aeruginosa* e *E. coli* foram cultivadas em meio LB, a 37°C, com os antibióticos apropriados: 300 µg/ml de carbenicilina 50 µg/ml de gentamicina, 100 µg/ml de tetraciclina ou 500 µg/ml de estreptomicina para *P. aeruginosa* e 100 µg/ml de ampicilina, 10 µg/ml de gentamicina, 100 µg/ml de tetraciclina e 50 µg/ml de espectinomicina para *E. coli*. A cultura de *S. cerevisiae* pJ694a foi cultivada em meio YAPD (extrato de levedura, 10 g/L; peptona, 20 g/L; adenina 40 mg/L; glicose, 20 g/L). As culturas de PA14 e D12 são mantidas em estoque congeladas em 20 % de glicerol a -80 °C. A cada ensaio, novas culturas são feitas a partir do estoque congelado a fim de evitar variações nos resultados obtidos.

3.3- Técnicas básicas de Biologia Molecular.

Isolamento de DNA plasmidial, digestão, reações de polimerase em cadeia (PCR), ligações, transformação e outras técnicas básicas de biologia molecular foram realizadas de acordo com metodologia padrão, descritas em manuais de referência (Sambroock e Russell, 2001 e Ausubel *et al.*, 1996). DNA genômico de *P. aeruginosa* foi isolado pela técnica de Chen e Kuo ou com o kit de purificação de DNA genômico Wizard da Promega. Isolamento de RNA total será com o reagente Trizol (Invitrogen) ou com o kit de purificação de RNAeasy (Qiagen).

3.4- Isolamento do DNA genômico:

Usualmente o DNA genômico de *P. aeruginosa* foi isolado pela técnica de Chen e Kuo (Chen e Kuo, 1993) ou pelo kit de purificação de DNA genômico Wizard da Promega. Alternativamente, para fins específicos foram testadas extrações de DNA usando o protocolo de extração de DNA genômico usando CTAB e fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) descritas em Sambrook e Russell, 2001 ou acrescentando pelo menos três etapas de extração com fenol:clorofórmio na técnica de extração descrita por Chen e Kuo (Chen e Kuo, 1993).

O isolamento do DNA genômico na linhagem de *B. pertussis* ATCC 9797 foi realizada usando o kit de purificação de DNA genômico Wizard da Promega.

3.5- Clonagens dos fragmentos *rnhA*, *dnaQ* e *kerV* para expressão e purificação:

Os fragmentos *rnhA*, *dnaQ* e *kerV* foram amplificados pela PCR utilizando os respectivos oligos e temperaturas de hibridização descritos na tabela 3. Após a confirmação da amplificação de fragmentos com tamanhos esperados (825 pb para *dnaQ*, 515 pb para *rnhA* e 762 pb para *kerV*), eles foram purificados com o kit de purificação de produtos de PCR (Promega). Em seguida esses fragmentos foram quantificados em gel de agarose e clonados no vetor pGEM-T 'easy' (Promega) de acordo com protocolo do fabricante. As colônias brancas obtidas foram verificadas quanto a presença dos respectivos insertos através de um PCR de colônia (cada colônia foi diluída em 20 µL de TE pH 8.0 e esta suspensão fervida por 5 minutos em banho-maria e imediatamente após incubadas no gelo por 2 minutos. Logo em seguida a suspensão foi centrifugada por 10 minutos em temperatura ambiente. 1 µL deste sobrenadante foi utilizado como molde para as reações de PCR). As colônias que apresentaram amplificação dos fragmentos esperados foram repicadas para novas placas LB-Ap e incubadas por 16 horas a 37 °C. Em seguida essas colônias foram inoculadas em meio LB-Ap líquido para ser efetuada a extração dos plasmídeos ('minipreps'). Para confirmar a clonagem, cada plasmídeo foi digerido, com as enzimas de restrição apropriadas, e separado por eletroforese em gel de agarose. A presença da banda correspondente ao fragmento clonado, no tamanho correto confirmou a clonagem. Em seguida os plasmídeos selecionados foram sequenciados para verificar a fidelidade da amplificação.

Para as sub-clonagens, cada fragmento foi digerido com as enzimas de restrição apropriadas e o fragmento liberado usado para uma reação de ligação com os vetores desejados, previamente digeridos com as mesmas enzimas de restrição. Deste modo, os genes *rnhA* e *dnaQ* foram clonados nos vetores pPROEX hta, pOAD e pOBD (tabela 2). O gene *kerV* foi clonado nos vetores pPROEX hta, pGEX 4T-1, pET43.1b, pOAD, pOBD e pUCp18 (tabela 2).

3.6- Clonagens dos fragmentos *kerV*, *pkerV*, *prnhA*, *pdnaQ*, *pkerV-rnhA-dnaQ* e *BP3212*:

Os fragmentos *kerV* e *BP3212* foram amplificados pela PCR utilizando os respectivos pares de oligos e temperaturas de hibridização descritos na tabela 3. O fragmento *pkerV* foi amplificado utilizando os oligos $\Delta C75'$ upper e 41070_right. O fragmento *prnhA* foi

amplificado utilizando os oligos *41070_left* e *rnhA_right*. O fragmento *pdnaQ* foi amplificado utilizando os oligos *rnhA_left* e *dnaQ_right*. A amplificação de todo o lócus (*pkerV-rnhA-dnaQ*) foi realizada utilizando os oligos $\Delta C75'$ upper e *dnaQ_right*. Após a confirmação da amplificação de fragmentos com tamanhos esperados (751 pb para *BP3212*, 762 pb para *kerV*, 1262 pb para *pkerV*, 1241 pb para *prnhA*, 1350 pb para *pdnaQ* e 2584 pb para o lócus inteiro *pkerV-rnhA-dnaQ*), eles foram purificados com o kit de purificação de produtos de PCR (Promega). Em seguida esses fragmentos foram quantificados em gel de agarose e clonados no vetor pGEM-T ou pGEM-T 'easy' (Promega) de acordo com protocolo do fabricante. As colônias brancas obtidas foram verificadas quanto a presença dos respectivos insertos através de um PCR de colônia (cada colônia foi diluída em 20 μ L de TE pH 8,0 e esta suspensão fervida por 5 minutos em banho-maria e imediatamente após incubadas no gelo por 2 minutos. Logo em seguida a suspensão foi centrifugada por 10 minutos em temperatura ambiente. 1 μ L deste sobrenadante foi utilizado como molde para as reações de PCR). As colônias que apresentaram amplificação dos fragmentos esperados foram repicadas para novas placas LB-Ap e incubadas por 16 horas a 37 °C. Em seguida essas colônias foram inoculadas em meio LB-Ap líquido para ser efetuada a extração do DNA plasmidial usando kit de extração Wizard da Promega. Para confirmar a clonagem, cada plasmídeo foi digerido com enzimas de restrição apropriadas e em seguida os fragmentos obtidos separados por eletroforese em gel de agarose. A presença da banda correspondente ao fragmento clonado, no tamanho correto confirmou a clonagem. Em seguida os plasmídeos selecionados foram seqüenciados para verificar a fidelidade da amplificação.

Para as sub-clonagens, cada fragmento foi digerido com as enzimas de restrição apropriadas (sítios desenhados nos oligos usados na amplificação ou combinação de sítios próprios do vetor de clonagem) e o fragmento liberado usado para uma reação de ligação com os vetores desejados, previamente digeridos com as mesmas enzimas de restrição. Deste modo, os genes *pkerV*, *prnhA*, *pdnaQ* e lócus *pkerV-rnhA-dnaQ* foram sub-clonados no vetor mini-CTX2 (tabela 2), enquanto o gene *BP3212* foi clonado no vetor pET281.a e *kerV* clonado nos vetores pMAL-c2 e pMAL-p2 (tabela 2).

3.7- Integração dos fragmentos clonados no vetor mini-CTX2 no cromossomo de PA14 e D12:

Os fragmentos de DNA clonados no vetor mini-CTX2 foram eletroporados na linhagem conjugativa de *E. coli* S17-1-1 λ pir. Após crescer as receptoras PA14, D12 e a doadora S17-1-1 portadora com cada uma das construções, foi realizada uma conjugação que consistiu em coletar uma alçada de cada bactéria doadora e receptora e misturá-la no centro de uma placa contendo meio LB, incubada em estufa 37 °C durante a noite. No dia seguinte, os transconjugantes, ou seja, somente as células de *Pseudomonas* que tiveram a cópia integrada no cromossomo, foram selecionadas em meio contendo LB+tet. Células de *E.coli* S17-1-1 foram contra-selecionadas pela adição de ácido nalidíxico às placas com LB+tet. A integração foi confirmada por PCR.

3.8- Clonagem das fusões de transcrição dos genes *kerV*, *rnhA* e *dnaQ*:

As regiões promotoras dos genes *kerV*, *rnhA* e *dnaQ* amplificadas a partir do DNA extraído da linhagem PA14 e a região promotora *mut-rnhA*, amplificada a partir do DNA extraído da linhagem D12 foram clonadas nos sítios *EcoRI* -*HindIII* do vetor mini-CTX-*lacZ* (Becher e Schweizer, 2000) como fusões de transcrição ao gene repórter *lacZ*. Estas construções foram integradas no sítio *ctx* no genoma de PA14 ou D12 conforme descrito no item 3.7.

3.9- Análises de bioinformática:

A busca por domínios conservados foi feita utilizando as bases de dados EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/>), CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>) e KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>), o alinhamento aos pares foi feito usando o BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), o alinhamento múltiplo foi feito usando o programa ClustalW (www.ebi.ac.uk/clustalw). As predições de estrutura secundária e modelamento foram feitos usando o programa Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) e i-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). A visualização dos modelos gerados e a sobreposição de estruturas foram feitas usando o programa Pymol (<http://www.pymol.org/>) ou Deep View–SwissPDBViewer (<http://spdbv.vital-it.ch/>). A busca por ortólogos a KerV foi feita na base de dados

<http://targetdb.pdb.org> e durante o modelamento usando os programas Phyre2 e i-Tasser. A identificação de resíduos na porção N-terminal de 2GS9 que interagem com S-adenosil homocisteína foi feito usando o programa 3DLigandsite (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/3dligandsite/>) ou Ligand Explorer (www.ligand-explorer.software.informer.com). A predição de hélices transmembranas foi feita usando os programas Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>) e TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

3.10- Determinação da frequência de mutação.

Um dos métodos mais utilizados para se determinar a frequência de mutação em bactérias é a determinação do número de colônias resistentes ao antibiótico rifampicina que aparecem espontaneamente em culturas (uma boa revisão sobre este assunto em Hall e Henderson-Begg, 2006). Isso se deve ao fato de que mutações de ponto em determinadas regiões no gene *rpoB* que codifica a subunidade catalítica da RNA polimerase são suficientes para contornar a inibição da transcrição na presença de rifampicina (Garibyan *et al.*, 2003). Entretanto, a linhagem PA14 que vem sendo estudada em diversos laboratórios é resistente a esse antibiótico, por ter sido selecionada deliberadamente para essa marca de seleção (L.G. Rahme, comunicação pessoal). Consequentemente, todos os mutantes derivados desta linhagem também são resistentes. Para ensaios iniciais, na ausência da linhagem mutante sensível a rifampicina, foi usado um protocolo alternativo que se baseia no mesmo princípio descrito acima: uma mutação de ponto no gene *rpsL*, que codifica para a proteína ribossômica S12, confere resistência ao antibiótico estreptomicina (Timms *et al.*, 1992). Brevemente, para a linhagem PA14 e D12, 50 mL de meio LB foram inoculados a partir de uma colônia isolada. Em seguida este meio foi incubado sob agitação (200 rpm) a 37 °C por 16 horas. Após o período de incubação, 1 mL e 100 µL de cada cultura foram semeados em placa de LB contendo 500 µg/mL de estreptomicina. Para determinar o número total de unidades formadoras de colônias (u.f.c.) na cultura original, diluições seriadas de 10^{-3} a 10^{-8} foram semeadas em placas de LB sem antibiótico. A frequência de mutação foi obtida dividindo-se o número de u.f.c. que cresceram em estreptomicina e o número de u.f.c. na cultura crescida na ausência de antibióticos, como descrito em Hall e Henderson-Begg, 2006;

Galhardo *et al.*, 2005; Oliver *et al.*, 2002. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e foram reproduzidos a partir de duas réplicas biológicas distintas.

3.11- Expressão e purificação da proteína recombinante KerV:

Várias condições foram testadas para se obter KerV recombinante na forma solúvel. As condições estão listadas na tabela 4 do item resultados e discussão. Para cada condição testada, o protocolo inicial foi realizado basicamente como descrito a seguir. Para cada condição de lise, 50 mL de LB contendo 100 µg/mL de ampicilina foi inoculado com 800 µL de cultura de *E. coli* (ver tabela 4) carregando o plasmídeo a ser testado, cultivada em LB com ampicilina por 16 horas. Essa cultura foi incubada sob agitação de aproximadamente 200 rpm, a 37 °C até atingir uma DO_{600nm} de 0.5 – 0.8 ou 2, quando 0,1 – 0,6 mM de IPTG foi adicionado para induzir a expressão de KerV.

Após esse primeiro ensaio, as condições foram variadas, sendo que algumas culturas foram incubadas a 37 °C por 3 horas, outras a 30 °C por 16 horas, por exemplo (ver tabela 4). Para verificar a solubilidade da proteína expressa, alíquotas das células obtidas após indução eram submetidas a quatro ciclos de sonicação de 1 minuto cada (30 s sonicando e 30 s resfriando a amostra) em 2 mL de tampão de lise (tabela4). Posteriormente, o lisado celular foi centrifugado a 12000 x g, 4 °C por 20 minutos. Após a centrifugação, o precipitado e o sobrenadante obtidos foram processados para análise por SDS-PAGE.

Todos os protocolos de purificação cujos resultados são descritos foram feitos em colunas empacotadas por gravidade sem o uso de sistemas de purificação sofisticados.

3.12- Expressão e purificação das proteínas recombinantes His-RNaseHI e His-DnaQ:

Para expressar as proteínas recombinantes, 800 µL de cultura de *E. coli* DH5α carregando o plasmídeo pDM010 ou o pDM011 foram incubados sob agitação a 37 °C por 16 horas e usadas para inocular 50 mL de LB contendo 100 µg/mL de ampicilina. Essa nova cultura foi incubada sob agitação de 200 rpm, a 37 °C até atingir uma DO_{600nm} entre 0.5 – 0.8. Para indução da expressão das proteínas recombinantes, foi adicionado à cultura 0,6 mM (IPTG). Após a adição de IPTG, a cultura foi mantida sob agitação sob as mesmas

condições por mais 3 h. Após o tempo total de indução, a cultura foi centrifugada e as células separadas. Para verificar a solubilidade da proteína expressa, uma alíquota das células obtidas após indução foi submetida a quatro ciclos de sonicação de 1 minuto cada (30 s sonicando e 30 s resfriando a amostra) em 2 mL de tampão de lise (β -mercaptoetanol 7 mM, sacarose 25% e Tris-HCl 50 mM pH 8 e 300 μ g do inibidor de proteases PMSF. Posteriormente, o lisado celular foi centrifugado a 12000 x g, 4 °C por 20 minutos. Após a centrifugação, o precipitado e o sobrenadante obtidos foram analisados por SDS-PAGE em minigel de poliacrilamida a 12%, a 200 V, por 50 minutos, no sistema MiniProtean 3 (BioRad). Essas condições de eletroforese foram utilizadas sempre que a proteína KerV e derivadas foi analisada.

O extrato solúvel contendo a proteína recombinante fusionada à cauda de histidina foi submetida a uma cromatografia de afinidade em resina de Ni^{++} -agarose seguindo o protocolo de purificação do manual “The Recombinant Protein Handbook” (Amershan Biosciences). Brevemente, 2 mL e 8 mL dos extratos celulares concentrados (equivalente a 50 mL de cultura para His-RNaseHI e 400 mL de cultura para His-DnaQ, respectivamente) foram passados por uma coluna contendo 1 mL de resina Ni^{++} -agarose previamente equilibrada com 5 volumes do tampão (10 mM de Imidazol, 200 mM de NaCl e 50 mM de Tris-HCl pH 8,0). Em seguida, a coluna foi lavada com 10 volumes do mesmo tampão. A eluição da proteína His-RNaseHI da resina foi realizada através da passagem de um gradiente crescente de imidazol, usando 5 volumes de cada tampão de eluição (200 mM de NaCl e 50 mM de Tris-HCl pH 8,0 e 50, 100, 150 ou 200 mM de imidazol). Para a proteína His-DnaQ, a eluição da resina foi feita pela passagem de 5 volumes do tampão de eluição contendo 500 mM de imidazol. Para concentrar as amostras e realizar a troca de tampão (tampão de eluição contendo imidazol para PBS pH 7.4), foi utilizado Centricon YM-10 (Millipore). A fim de acompanhar o processo de purificação em cada etapa descrita acima, foram retiradas alíquotas para análise por SDS-PAGE.

As proteínas purificadas foram quantificadas pelo método de BCA ou pela comparação da intensidade das bandas obtidas por SDS-PAGE com a intensidade de bandas de BSA com concentrações conhecidas.

3.13- Obtenção do soro policlonal em coelhos:

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

3.14- Análise da indução da proteína His-RNaseHI e His-KerV recombinante por “Western Blot”

Para confirmar a indução de His-Kerv, His-RNaseHI e His-DnaQ as amostras foram submetidas a eletroforese do tipo SDS-PAGE e transferidas para membranas de nitrocelulose a 45 mA, por 50 minutos, segundo protocolo de transferência semi-seca utilizando o sistema Novablot (Amersham-Pharmacia Biotech). Após a transferência, as proteínas na membrana foram coradas com Ponceau S (0,1% em ácido acético 10%) e descoradas com água destilada. As membranas foram bloqueadas por 2 horas em TBS (10 mM Tris-HCl pH 8,0 e 150 mM NaCl) contendo 5% de leite desnatado. A solução foi trocada e o soro policlonal adicionado na diluição de 1:5000, 1:1000 ou 1:300 em TBS-Leite ou TBS-T (TBS adicionado de 0,05% de Tween 20). O soro anti-RNaseHI foi obtido como descrito acima, assim como o soro anti-Kerv já disponível no laboratório. Após o tempo de incubação de 2 horas, as membranas foram lavadas por 5 minutos duas vezes em TBS-T e uma vez TBS, procedendo-se então a incubação com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina 1:30000, seguindo-se nova lavagem como descrito acima. As membranas foram reveladas com 150 µL NBT 10 mg/mL e 50 µL BCIP 50 mg/mL em 5 mL de tampão para fosfatase alcalina (10 mM Tris-HCl pH 9, 100 mM NaCl e 5 mM MgCl₂). A reação foi interrompida com EDTA 10 mM e o perfil de bandas reveladas analisadas.

3.15- Análise da expressão de *rnhA* e *dnaQ* em PA14 e nos mutantes D12, DA17, DA20:

Foram feitas análises de expressão dos genes *rnhA* e *dnaQ* nas linhagens PA14, D12, DA17 e DA20 por ensaios de RT-PCR quantitativo.

O RNA total das células crescidas em meio LB a 37 °C em DO_{600nm} 1 (fase exponencial) e em DO_{600nm} 3 (fase estacionária) foram extraídos, tratados com RQ-DNase I (Promega) e utilizados como molde para a síntese de cDNA com a enzima transcriptase reversa Improm (Promega) e oligonucleotídeos randômicos. O cDNA foi então amplificado com oligonucleotídeos específicos para os genes *rnhA* e *dnaQ* com o SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) em triplicatas técnicas, utilizando o seguinte programa: 60°C por 2 minutos; 95 °C por 10 minutos; 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos; 60 °C 1 minuto. As taxas de expressão foram calculadas de acordo com o método de $-2^{\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001). O gene *nadB* foi utilizado como normalizador. Os erros experimentais foram calculados de acordo com o descrito em Bookout e Mangelsdorf, 2003.

3.16- Ensaios de interação entre Kerv, RNaseHI e DnaQ :

3.16.1- Ensaios de ‘duplo-híbrido’:

Os plasmídeos pDM004, 006 e 008 (tabela 2) foram usados para transformar células de *S. cerevisiae* PJ694-a. Brevemente, 1 mL de uma cultura saturada de *S. cerevisiae* PJ694-a crescida em meio YAPD a 30 °C foi centrifugada e em seguida lavada com 1 mL de água estéril. Logo depois foram adicionados às células os reagentes na seguinte ordem: 240 µL de PEG 3350 50%; 30 µL de acetato de lítio 1M; 50 µL de DNA de esperma de salmão 2 mg/mL; 2 µL das construções pDM004, 006 ou 008, construções derivadas no vetor pOBD (extraídos a partir de uma ‘miniprep’ de kit (Promega)) e 34 µL de água. Em seguida essa mistura foi suavemente agitada e incubada a 42°C por 40 minutos. Após incubação, a suspensão de células foi centrifugada e o pellet suspenso em 200 µL de água e incubada novamente por cinco minutos em temperatura ambiente. Após essa nova incubação, as amostras foram semeadas em placas contendo o meio SC-Triptofano (Base nitrogenada sem aminoácidos, 6,7 g/L; glicose, 20 g/L; adenina, 30mg/L; histidina, 20 mg/L; leucina, 30 mg/L) e incubadas por 5 dias em estufa a 30 °C. Após o crescimento das colônias, uma colônia de cada clone foi escolhida e mantida através de repiques sucessivos em meio SC-Triptofano. A partir destas

culturas foram feitos testes de auto-ativação dos genes repórteres de cada uma das construções derivadas do vetor pOBD. Após determinar a concentração mínima inibitória de 3-amino-triazol para cada clone, foi efetuada a transformação com as construções pDM005, 007 e 009 (construções baseadas no vetor pOAD), usando o mesmo protocolo descrito acima, porém a seleção dos clones que carregam as duas construções derivadas dos vetores pOBD e do pOAB, foram feitas semeando as células transformadas em meio SC sem triptofano e sem leucina, marcas de seleção dos vetores. Depois de obtidas as colônias, estas foram testadas quanto à capacidade de crescer em meio na ausência de histidina e adenina. Os clones que crescerem na ausência destes dois aminoácidos podem ser considerados positivos, ou seja, há interação entre os produtos dos genes clonados, o que ativa a transcrição dos genes repórteres HIS e ADE. Como controle positivo do ensaio foram usados duas proteínas de *Xanthomonas citri*, XAC1940 (clonada no pOBD) e XAC1877 (clonada no vetor pOAD) gentilmente cedidas pelo prof. Dr. Chuck S. Farah.

Deste modo, foram testadas as interações entre os produtos: RnhA-RnhA (pDM006 e 007), DnaQ-DnaQ (pDM004 e 005), Kerv-KerV (pDM008 e 009), RnhA-DnaQ (pDM006 e 005), DnaQ-RnhA (pDM004 e 007), KerV-RnhA (pDM008 e 007), RnhA-KerV (pDM006 e 009), KerV-DnaQ (pDM008 e 005), DnaQ-KerV (pDM004 e 009) e XAC1940-XAC1877 (controle positivo do ensaio).

3.17- Expressão e purificação da proteína recombinante His-BP3212:

Para se obter BP3212 recombinante na forma solúvel, foram testadas três temperaturas de indução, 37, 30 e 20 °C. O protocolo de indução para as três condições foi testado conforme descrito a seguir. Cerca de 10 mL de LB contendo 15 µg/mL de canamicina foram inoculados com 500 µL de uma cultura saturada de *E. coli* carregando o plasmídeo pET28a-BP3212. Em seguida esta cultura foi incubada a 37 °C sob agitação até alcançar uma DO_{600nm} entre 0.5-0.8, quando 0,6 mM de IPTG foi adicionado para induzir a expressão de KerV. Quando necessário, esperou-se a cultura chegar a temperatura de indução antes da adição do IPTG. Em seguida, as culturas foram novamente incubadas a 37 °C, 30 °C ou 20 °C. Para verificar a solubilidade da proteína expressa, alíquotas das células obtidas após indução eram submetidas a quatro ciclos de sonicação de 1 minuto cada (30 s sonicando e 30 s

resfriando a amostra) em 2 mL de tampão de lise (25% sacarose, 50 mM Tris-HCl pH 8.0 e 7 mM de β -mercaptoetanol). Posteriormente, o lisado celular foi centrifugado a 12000 $\times g$, 4°C por 20 minutos. Após a centrifugação, o precipitado e o sobrenadante obtidos foram processados para análise por SDS-PAGE.

A purificação de BP3212 foi realizada em coluna de Ni^{++} -agarose conforme procedimento já descrito para a purificação de outras proteínas.

3.18- Expressão e purificação da proteína recombinante MBP-KerV:

Para obter KerV fusionado a MBP culturas saturadas de *E. coli* BL21 (DE3) carregando o plasmídeo pMAL-c2 ou pMAL-p2 foram inoculados em 10 ou 500 mL de LB contendo 100 $\mu g/mL$ de ampicilina. Em seguida esta cultura foi incubada a 37 °C ou 20°C sob agitação até alcançar uma DO_{600nm} entre 0,5-0,8, quando 0,6 mM de IPTG foi adicionado para induzir a expressão de MBP-KerV. Em seguida, as culturas foram novamente incubadas a 37 °C ou 20°C. Para verificar a solubilidade da proteína expressa, alíquotas das células obtidas após indução foram submetidas a quatro ciclos de sonicação de 1 minuto cada (30 s sonicando e 30 s resfriando a amostra) em 2 mL de tampão de lise (25% sacarose, 50 mM Tris-HCl pH 8.0 e 7 mM de β -mercaptoetanol). Posteriormente, o lisado celular foi centrifugado a 12000 g , 4 °C por 20 minutos. Após a centrifugação, o precipitado e o sobrenadante obtidos foram processados para análise por SDS-PAGE.

3.19- Ensaio de atividade de metiltransferase de MBP-KerV:

A atividade de metiltransferase foi verificada utilizando o kit colorimétrico de atividade de metiltransferase (Cayman Chemical 700140). Este kit se baseia na quantificação de S-adenosil homocisteína (SAH), um dos produtos de reação da atividade de metiltransferase. O kit é fornecido com S-adenosil metionina (SAM), tampão de reação e duas enzimas que degradam SAH a hipoxantina (adenina deaminase e SAH nucleosidase), que, através de reação com reagentes colorimétricos, produz uma coloração que é proporcional a quantidade de SAH formada durante a reação (Dorgan *et al.*, 2006). Para

realização do ensaio, todos os reagentes fornecidos pelo kit foram misturados a MBP-KerV purificada e seu substrato teste.

MBP-KerV (metiltransferase), MBP (controle negativo) e os potenciais substratos His-RNaseHI e His-DnaQ foram purificados de acordo com protocolos já descritos e armazenados em freezer -80 °C até a realização do ensaio. O DNA genômico ou plasmidial, RNA total foram purificados de acordo com metodologias já descritas nesta seção. Os híbridos de DNA:RNA foram obtidos conforme protocolo descrito no item abaixo. Os extratos totais de PA14 e D12 foram obtidos a partir da sonicação em banho de gelo de culturas coletadas na fase exponencial e na fase estacionária de crescimento.

Todas as reações foram realizadas em placas de 96 poços com absorbância medida a 520 nm a cada 30 segundos durante 40 minutos, usando o leitor de placas Sunrise (Tecan Group). Como controle positivo da reação de conversão de SAH à hipoxantina, foi adicionado a cada tampão usado no ensaio além de SAM, SAH, que foi fornecido juntamente com o kit.

3.19.1- Obtenção dos híbridos DNA:RNA:

Para a obtenção dos híbridos DNA:RNA, foi realizada a transcrição '*in vitro*' utilizando a enzima T7 RNA polimerase (NEB). O molde foi obtido pela digestão do vetor pGEM-T easy contendo o gene *rnhA* clonado com as enzimas *PvuI* e *NdeI*. Esta digestão libera um fragmento que contém o fragmento clonado sob controle do promotor T7. Vale ressaltar que a construção contendo o gene *rnhA* foi utilizada apenas por conveniência, pois qualquer outro fragmento de DNA poderia ter servido de molde para a transcrição *in vitro*, já que a sequência do híbrido DNA:RNA não deve interferir no resultado do ensaio. Cerca de 50 unidades da enzima T7 RNA polimerase foram incubadas com 400 ng do molde, tampão apropriado, 0,8 mM de cada NTPs e inibidor de RNase A. A reação foi incubada durante 1 hora e 30 minutos a 37 °C. Como a T7 RNA polimerase tem uma alta eficiência, é esperado que, ao final da reação, a maioria do ácido nucléico presente seja constituída de RNA. Depois de realizada a transcrição, foram adicionados à solução 400 ng de molde de DNA e o tampão de hibridização (50 % formamida, 0,6 M de NaCl, 10 mM de PIPES, 1 mM de EDTA e 0,05 % de SDS). A amostra foi esfriada naturalmente até a temperatura de 50 °C e incubada durante aproximadamente 16 horas. Após a incubação, a amostra foi purificada com fenol:clorofórmio e precipitada em etanol.

3.20- Ensaio de ligação a S-adenosil metionina (SAM) por *cross-linking*:

Para testar a capacidade de ligação de MBP-KerV e His-KerV a SAM foram realizados experimentos de acordo com metodologias adaptadas descritas em Hamahata, *et al.*, 1996; Takata e Fujioka, 1992 e Som e Friedman, 1990.

Brevemente, cerca de 6 µg de MBP-KerV ou 30 µg de extratos totais de culturas de *E. coli* que superexpressam MBP-KerV induzidas e não induzidas foram adicionados a 0,24, 0,12 ou 0,06 µCi de ¹⁴C-SAM (0,02 µCi/µL com atividade específica de 40 mCi/nmol adquirido de Perkin-Elmer) em tampão contendo 200 mM de NaCl, 25 mM de Tris-HCl pH 8.0, 2,5 % de glicerol e 1 mM de β-mercaptoetanol. As reações foram realizadas em um volume final de 30 µL em placas de polipropileno de 96 poços. Após a adição de todos os reagentes, a placa foi exposta durante 20 minutos a 10 cm de quatrolâmpadas UV contidas na câmara do aparelho GeneLinker da BioRad, em banho de gelo, a fim de causar um cross-linking da proteína com ¹⁴C-SAM. Após a exposição, foi adicionado o mesmo volume de tampão de amostra para SDS-PAGE. As amostras foram separadas por SDS-PAGE (12 % de poliacrilamida) e a corrida foi realizada a 200 V durante 50 minutos. Concluída a eletroforese, os géis foram fixados por 30 minutos em uma solução contendo 30% de metanol e 7% de ácido acético, incubados por 30 minutos em Amplify (GE Biosciences - reagente usado para intensificar a detecção da radiação) e secos através de vácuo sobre papel de filtro e exposto em filme de raio-X do tipo Hyperfilm (GE Biosciences) a - 80 °C e revelado após 8 a 15 dias de exposição.

3.21- Ensaios de localização celular de KerV em PA14:

Inicialmente tentou-se expressar KerV em fusão de tradução com GFP usando o vetor pEA18, que rotineiramente é usado em *Bacillus*. Neste plasmídeo, o gene de interesse fica sob controle de um promotor induzido por xilose. Porém, *P. aeruginosa* não possui um sistema de transporte de xilose anotado no seu genoma (www.pseudomonas.com). Para verificar estes dados, PA14 foi inoculada em meio mínimo contendo xilose como única fonte de carbono. Como observado na figura 10, foi verificado que PA14 realmente não é capaz de crescer tendo xilose como fonte única de carbono, indicando possivelmente que promotores induzíveis por xilose não seriam ativos nesta linhagem.

Figura 10 - Perfil de crescimento de PA14 em meio M63 contendo xilose como única fonte de C. As células foram inoculadas em uma densidade inicial de 0.2 e incubadas sob agitação a 37 °C.

Portanto, outra alternativa foi adotada. Foi construída em nosso laboratório pela aluna de Iniciação Científica Patrícia Menegasso um plasmídeo que possibilita clonar o seu produto de interesse em uma fusão de tradução com eGFP (fragmento eGFP foi derivado do vetor pEGFP-N2, Clontech). Neste caso, a expressão de *kerV* se dá através de seu promotor natural. Para isso, *kerV* foi amplificado juntamente com 500 pb a montante da sua região codificadora. Esta região contendo *kerV* sob controle de sua própria região promotora fusionado a eGFP foi integrada no sítio de integração *attTn7*.

Após a seleção dos transconjugantes e confirmação da integração por PCR, as novas linhagens foram crescidas em meio LB e as células observadas através de microscopia de fluorescência, utilizando filtro específico para emissão do eGFP.

Paralelamente, para aumentar a expressão e permitir sua visualização por microscopia de fluorescência, uma nova construção *kerV* fusionado a GFP foi clonada sob controle de um promotor induzível por IPTG.

Para clonagem, o fragmento correspondente a região codificante de *kerV* foi primeiramente amplificado utilizando-se os oligos DM4F e R clonados no vetor de clonagem pGEM-T-easy. Após a confirmação da fidelidade da replicação foi realizada uma subclonagem no vetor pEA18, nos sítios *NotI* e *BamHI*. Este vetor adiciona uma molécula de GFP à extremidade N-terminal da proteína expressa, é rotineiramente usado para análise de localização de proteínas em *Bacillus subtilis* e foi gentilmente cedido pelo Dr. F. Gueiros-

Filho, IQ-USP. Para ser integrado no genoma das linhagens de *P. aeruginosa*, o fragmento GFP-*kerV* foi retirado do vetor pEA18 com as enzimas *EcoRI* e *BamHI* e subclonado no vetor pUCBM21. Em seguida este vetor de clonagem foi digerido com as enzimas *EcoRI* e *HindIII* para uma nova subclonagem no vetor pUC18-mini-Tn7T-LAC (Choi e Schweizer, 2006). Este contém um promotor *lac* que pode ser induzido por adição de IPTG. Em seguida, esta construção foi integrada no sítio *attTn7* das linhagens PA14 e D12 de acordo com metodologia descrita por Schweizer e Choi, 2006.

Após a seleção dos transconjugantes e confirmação da integração por PCR, as novas linhagens foram crescidas em meio LB até a fase exponencial de crescimento. Para a indução, foram adicionados 2 mM de IPTG e as células observadas por microscopia de fluorescência, utilizando filtro específico para emissão do GFP.

A expressão de GFP-KerV também foi verificada por 'Western blot' usando soros policlonais anti-KerV e anti-GFP.

3.22- Comparação do estado de metilação do DNA das linhagens PA14 e D12:

3.22.1- Análise por enzimas de restrição:

Inicialmente, para validar esta abordagem, verificamos se resíduos de adenina dos sítios GATC se encontram metilados em *P. aeruginosa*. Para isto, foram feitas digestões do vetor pUCp18 extraídos de PA14, D12 e de *E. colidam*⁺ com as enzimas *Mbol*, cuja atividade é bloqueada quando o resíduo de adenina se encontra metilado, e *Sau3AI*, com atividade independente do estado de metilação do mesmo resíduo.

O DNA genômico extraído de PA14 e D12 foi incubado também com outras enzimas de restrição cuja atividade é inibida ou não por metilação em bases presentes em sequências específicas. Após separação por eletroforese em gel de agarose, o DNA foi transferido para membrana de náilon e hibridizado com sondas correspondentes a diferentes regiões do genoma de *P. aeruginosa* de acordo com protocolos padrão de "Southern blot" (descrito abaixo). Diferenças nos tamanhos dos fragmentos de DNA correspondentes às bandas obtidas poderão ser indicativas do estado de metilação e das sequências metiladas, de acordo com a especificidade das enzimas de restrição utilizadas.

Para análise por Southern blot, amostras de DNA genômico extraídos de PA14 e D12 foram digeridas com as enzimas (sítios de restrição sempre representados no sentido 5'→3'): *AatI* (AGG↓CCT), *AluI* (AG↓CT), *Sau3A* (↓GATC) *PstI* (CTGCA↓G), *PvuII* (CAG↓CTG), *SpeI* (A↓CTAGT), *XhoI* (C↓TCGAG), *StuI* (AGG↓CCT), *SalI* (G↓TCGAC), *HpaI* (GTT↓AAC), *HpaII* (C↓CGG), *XmaI* (CCCGG↓G), *XbaI* (T↓CTAGA), *HindIII* (A↓AGCTT), *HinfI* (G↓ANTC), *HincII* (GTY↓RAC), *BglI* (GCCNNNN↓NGGC), *EagI* (C↓GGCCG), *NotI* (GC↓GGCCGC), *NcoI* (C↓CATGG), *Clal* (AT↓CGAT), *DraI* (TTT↓AAA), *PvuI* (CGAT↓CG), *KpnI* (GGTAC↓C), *SmaI* (CCC↓GGG), *ApaI* (GGGCC↓C) e *AvaI* (G↓YCGRG).

3.22.1.1- “Southern blot”:

Os produtos das reações de digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% por 2 horas. Após a separação das bandas, o gel foi corado com brometo de etídeo a fim de verificar a eficiência da digestão. Em seguida, o gel foi tratado com tampão de depurinação por 10 minutos, tampão de desnaturação por 20 minutos e com tampão de neutralização por 20 minutos. As amostras digeridas foram transferidas por pressão para a membrana de nylon (Hybond N⁺ Amershan) em tampão SSC 10x por 1 hora, usando o sistema de transferência Posi-Blot (Stratagene). O DNA transferido para a membrana foi fixado sob luz UV no “GS Gene linker” (Biorad). A membrana foi armazenada para posteriormente ser incubada com a sonda, fragmento de aproximadamente 600 pb correspondente ao gene *cupD1*, previamente marcada radioativamente.

Para a hibridização, a membrana foi colocada em uma garrafa de hibridização e hidratada em um pequeno volume de uma solução de SSC 1X (150 mM NaCl e 15 mM de citrato trissódico, pH 7.0). Após esta etapa, foram adicionados 5 mL da solução de hibridização RAPID HYB (Amershan Biosciences) e realizada uma pré-hibridização a uma temperatura de 65 °C durante 15 minutos. Em seguida aproximadamente 10⁶ c.p.m da sonda marcada (previamente desnaturada em banho a 95 °C) foram adicionados a solução de hibridização. A hibridização foi feita durante 2,5 horas a 65 °C. Após a hibridização a membrana foi lavada uma vez na solução de lavagem I (SSC 1X e SDS 0,1 %) durante 15 minutos a temperatura ambiente e duas vezes na solução de lavagem II (SSC 0,1X e SDS 0,1%) a 65 °C durante 20 minutos. Após as lavagens a membrana foi seca e exposta na tela de fósforo (Screen PhosphorImager STORM) para ser revelada.

3.22.2- Tratamento com bisulfito de sódio:

Para avaliar o estado de metilação do DNA, foi utilizado o protocolo de tratamento do DNA genômico com bisulfito de sódio descritos no site <http://www.epigenome-noe.net/researchtools/protocol.php?protid=34>. No tratamento com bisulfito de sódio, somente os resíduos de citosina que não apresentam metilação no C5 serão modificados para resíduos de uracila. Em seguida, regiões candidatas a possíveis alvos de metilação, como genes cuja expressão está alterada no mutante D12 e o fragmento de DNA correspondente à origem de replicação, foram amplificadas por PCR e as sequências comparadas. Vale reforçar que por esta técnica somente podemos detectar a metilação no C5 dos resíduos de citosina, ficando de fora a metilação no N4 do resíduo de citosina e N6 do resíduo de adenina.

3.22.2.1- Tratamento do DNA:

A 2 µg de DNA genômico extraídos de PA14 ou D12 em 50 µL foram adicionados 5,7 µL de solução de NaOH 3M. Em seguida, essa solução foi incubada a 37 °C por 10 minutos e adicionados 33 µL de uma solução de hidroquinona 17 mM e 530 µL de solução de bisulfito de sódio 3M. As amostras foram incubadas por 16 horas a 50 °C. Após a incubação, o DNA foi purificado usando o kit de purificação de DNA (Macherey-Nagel) segundo instruções do fabricante e eluídos num volume de 50 µL de água ultrapura. À solução contendo o DNA purificado foram adicionados mais 5,7 µL de NaOH 3M, que em seguida foi incubada a 37 °C por 20 minutos. Esta etapa finaliza o processo de conversão dos resíduos de citosina em uracila. Após esse tempo, o DNA foi precipitado por adição de 10 µL de solução de glicogênio (1 mg/mL), 17 µL de solução de acetato de amônia 3M pH 5.2 e 520 µL de etanol absoluto. Após homogeneização, a solução foi incubada por 1 hora no gelo seco e em seguida centrifugada por 20 minutos, 12000 *xg* a 4°C. O precipitado formado foi lavado com 500 µL de etanol 70 % e centrifugado por mais 15 minutos a 12000 *xg* a 4°C. O precipitado foi seco por liofilização e em seguida dissolvido em 40 µL de água ultrapura.

3.22.2.2- Amplificação:

Para reação de amplificação foram utilizados oligonucleotídeos específicos para amplificar a região correspondente à origem de replicação. O ciclo para amplificação foi 95 °C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, hibridização a 60 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto. Após este programa, a amplificação do fragmento esperado foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 0,8 %.

3.22.2.3- Clonagem e sequenciamento:

O produto de PCR amplificado foi purificado usando kit de purificação Millipore e em seguida cerca de 4 µL deste produto de reação foram usados para montar reação de ligação com o vetor pGEM-T. Após o tempo da reação, a ligação foi usada para transformar por eletroporação células de DH5α, que após o tempo de recuperação foram semeadas em placas contendo LB + Ap + X-gal e incubadas durante a noite em estufa 37 °C. As colônias brancas foram repicadas para tubos contendo LB+Ap e crescidas a 37 °C durante a noite e tiveram o DNA plasmidial extraído usando um kit (Macherey-Nagel). A clonagem dos fragmentos foi confirmada através de digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *PstI*. As amostras submetidas a reação de sequenciamento. Os cromatogramas obtidos foram analisados quanto a presença de modificações de C→T em resíduos de citosina não metilados na fita 5'→3' e de G→A correspondentes a fita 3'→5' pelo tratamento com bisulfito de sódio.

As análises se baseiam na interpretação do tratamento por bisulfito de sódio feitos no DNA coletado a partir de duas amostras independentes, comparando-se as linhagens PA14 e D12.

3.23- Marcação de células com ³⁵S-metionina ou L-metil-[³H]-metionina (³H-metionina):

O objetivo deste experimento foi tentar identificar um possível alvo de metilação de KerV utilizando uma estratégia global. Foram analisadas possíveis diferenças no perfil de marcação de DNA, RNA e proteínas.

3.23.1- Marcação para extração de proteínas:

As linhagens PA14 e D12 foram inoculadas em 5 mL de meio mínimo M63 + glicose (2% glicose, 100 μM FeSO_4 , 10 mM MgSO_4 , 15 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 22 mM KH_2PO_4 e 40 mM K_2HPO_4) a uma $\text{DO}_{600\text{nm}}$ 0.2 e incubadas a 37 °C sob agitação até a $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 1. Ao atingir essa densidade, foi retirada uma alíquota de 500 μL de cada cultura. A essa alíquota foram adicionados 5 μCi de ^{35}S -metionina e incubada por 5 minutos. Após a incubação, foi adicionado 500 μL de uma solução de TCA 25% (ácido tricloroacético) e o tubo mantido no gelo por 30 minutos. Este foi o tempo 0 (zero). Em seguida, foram adicionados às culturas 500 $\mu\text{g/mL}$ de uma solução de estreptomicina ou 100 $\mu\text{g/mL}$ de uma solução de cloranfenicol e incubadas novamente a 37 °C sob agitação. Alíquotas de 500 μL foram retiradas após 30 minutos, 1 hora e duas horas da adição do antibiótico. Novamente, para cada alíquota retirada foi dado um pulso de 5 minutos de 5 μCi de ^{35}S -metionina, as amostras foram precipitadas com TCA 25% por 30 minutos no gelo e lavadas em acetona 100% duas vezes e diluídas em solução O 2X para análise por SDS-PAGE. O volume de solução O (tampão de amostra para eletroforese SDS-PAGE) foi ajustado de acordo com a densidade de cada cultura de modo que todas representassem o mesmo número de células por unidade de volume. As amostras foram separadas em minigéis de poliacrilamida 12% ou em gel com gradiente de 8-20% de acrilamida. O tempo de corrida para os minigéis foi de aproximadamente 50 minutos a 200 V e para o gel de gradiente, o tempo foi de aproximadamente 5 horas a 200 V. Após a corrida, os géis foram fixados por 30 minutos em uma solução contendo 30% de metanol e 7% de ácido acético, incubados por 30 minutos no Amplify (GE Biosciences - reagente fluorescente usado para intensificar a detecção da radiação) e então o gel foi seco a vácuo sobre papel de filtro e exposto em filme de raio-X do tipo Hyperfilm (GE Biosciences) a - 80 °C e revelado após um tempo que variou de 8 a 25 dias de exposição.

Após a escolha do inibidor da tradução mais eficiente, o ensaio acima foi repetido. Após 2 horas da adição de cloranfenicol a culturas de PA14 e D12 crescidas em meio M63, alíquotas de 500 μL foram retiradas e submetidas a pulsos de 5, 10 ou 20 minutos tanto com 5 μCi de ^{35}S -metionina ou ^3H -metionina. Após cada pulso as amostras foram precipitadas com TCA 25%, lavadas com acetona 100 % e suspensas em um volume variável de solução O

de modo que todas as amostras fossem normalizadas, e foram processadas como descrito anteriormente.

3.23.2- Marcação de células com ^3H -metionina para extração de DNA e RNA:

As linhagens PA14 e D12 foram inoculadas em 5 mL de meio mínimo M63 + glicose (2% glicose, 100 μM FeSO_4 , 10 mM MgSO_4 , 15 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 22 mM KH_2PO_4 e 40 mM K_2HPO_4) a uma $\text{DO}_{600\text{nm}}$ 0.2 e crescidas a 37 °C sob agitação até a $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 1, quando foram adicionados cerca de 30 μCi de ^3H -metionina. Após 40 minutos a 37 °C, mais 30 μCi foram adicionados, seguido de nova incubação por 40 minutos. As células foram coletadas e tiveram seu RNA total e DNA extraídos. Tanto o DNA quanto o RNA extraídos foram quantificados por espectrofotometria.

Cerca de 20 μg do DNA extraídos de PA14 e D12 foram digeridos com uma enzima de restrição de corte freqüente e separados em gel de agarose 1%, por 2 horas a 110 V. Após a eletroforese, o DNA foi depurinado em solução de HCl 0,25 M, desnaturado em solução de NaOH 1,5 M e NaCl 0,5 M e neutralizado em Tris-HCl pH 7.5 para em seguida ser transferido para membrana de nylon Hybond N+ (GE biosciences) em tampão SSC 10x por 1 hora, usando o sistema de transferência Posi-Blot (Stratagene).

Cerca de 2, 4 e 8 μg de RNA total foram separados em gel de agarose desnaturante (MOPS/formaldeído) e em seguida transferidos para membrana de nylon Hybond N+ (GE Biosciences) em tampão SSC 10x por 2 horas, usando o sistema de transferência Posi-Blot (Stratagene).

Os ácidos nucléicos foram fixados às membranas sob radiação UV usando 'GS Gene linker' (BioRad) e em seguida incubadas com Amplify (GE Biosciences) por 30 minutos e expostos em filme de raio-X do tipo Hyperfilm (GE Biosciences) a - 80 °C e revelado após um tempo que variou de 8 a 15 dias de exposição, para RNA e de 8 a 60 dias para DNA.

3.24- Ensaios para medir a atividade de β -galactosidase:

As linhagens DM19 a DM29 foram incubadas em meio LB a 37 °C sob agitação. Alíquotas foram coletadas durante o crescimento para monitorar a DO_{600nm} e medir a atividade de β -galactosidase.

A atividade de β -galactosidase foi medida de acordo com o descrito por Miller *et al.*, 1972. Brevemente, a 100 μ L da cultura coletada foram adicionados 800 μ L de tampão Z (40 mM Na_2HPO_4 , 60 mM $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 10 mM KCl, 1 mM $MgSO_4$ e 37 mM β -mercaptoetanol), 50 μ L de SDS 0,1% e 50 μ L de $CHCl_3$. As amostras foram vortexadas e incubadas durante 5 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, foram adicionados 200 μ L de uma solução a 4 mg/mL de ONPG. Os tubos foram imediatamente homogeneizados e incubados a temperatura ambiente até ocorrer o aparecimento de uma coloração amarela. O tempo em que ocorreu o aparecimento desta coloração amarelada foi anotado. A reação foi paralisada pela adição de 400 μ L de uma solução 1M de Na_2CO_3 . As amostras foram centrifugadas por 3 minutos a 12000 rpm à temperatura ambiente e a absorbância a 420 nm medida. A atividade de β -galactosidase (unidades Miller) foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Unidades Miller} = \frac{DO_{420nm} \times 1000}{\text{tempo (min)} \times \text{vol. inicial da cultura } (\mu\text{L}) \times DO_{600nm}}$$

3.25- Determinação dos inícios de transcrição de *kerV*, *rnhA* e *dnaQ*:

3.25.1- Análise por primer extension:

Os oligonucleotídeos complementares a região 5' próxima ao início de tradução de cada gene foram marcados radioativamente na sua extremidade 5' com γ -[P^{32}]-ATP usando a enzima T4 polinucleotídeo quinase (Fermentas). Brevemente, cerca de 30 μ Ci de γ -[P^{32}]-ATP foram incubados com 50 pmols dos respectivos oligonucleotídeos e a enzima T4 polinucleotídeo quinase suplementada com seu tampão de reação apropriado durante 30 minutos a 37 °C. Após a incubação, os oligonucleotídeos foram precipitados em etanol para eliminar o excesso de nucleotídeos marcados não incorporados. Para o gene *kerV* foi usado

o oligo *racekerV4*, para o gene *nhhA* foi utilizado o oligo *racernhA3* e para o gene *dnaQ* o oligo *racednaQ4* (tabela 3).

O RNA total foi extraído a partir de culturas de PA14 e D12 na DO_{600nm} 1.0 usando o reagente Trizol seguido por tratamento com DNase I (Fermentas). Para a transcrição reversa cerca de 30 µg de RNA foram precipitados em etanol juntamente com aproximadamente 10^6 c.p.m. do oligo marcado radioativamente. Após a precipitação, os híbridos de mRNA-oligo foram suspensos no tampão de hibridização (20 mM PIPES, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA e 80% formamida) e incubados por 16 horas a 55°C. Os híbridos de mRNA-oligos foram novamente precipitados em etanol e finalmente usados como molde para a reação de transcrição reversa. A transcrição reversa foi feita com 400 unidades da enzima transcriptase reversa (Fermentas) acompanhada do tampão apropriado e dNTPS. A reação foi incubada a 50 °C durante duas horas. Após o fim da reação, a enzima foi desativada por calor e os produtos de reação digeridos com 2 µg/µl de RNase A durante 30 minutos a 37 °C. Em paralelo, reações de sequenciamento manual, utilizando-se como molde a região 5' à montante ao início de tradução de cada gene, foram feitas de acordo com instruções do fabricante do kit Promega fmol DNA Cycle Sequencing System (PROMEGA).

Os produtos de extensão e as reações de seqüenciamento foram analisadas em paralelo em gel de poliacrilamida desnaturante 6% em tampão TBE. Antes da aplicação das amostras, foi realizada uma pré-corrida durante 30 minutos para ocorrer o aquecimento das placas da cuba de eletroforese, condição necessária para este tipo de gel de sequencia para auxiliar a manter o DNA desnaturado durante a corrida. As amostras foram aquecidas e aplicadas no gel. A corrida foi realizada a 37 W de potência. Após o tempo de corrida, o gel foi cuidadosamente transferido para um suporte de papel Whatman, seco através de vácuo e exposto a filmes de raio-X ou telas de fósforo.

A procura por regiões conservadas de ligação da RNA polimerase (região -10) foram realizadas usando a software on-line 'Footprint tool' do site www.prodoric.de. Para ser considerado um putativo sítio de ligação só foram considerados os sítios encontrados na fita codificante (fita positiva).

3.25.2- 5'-RACE:

Para determinação dos inícios de transcrição dos genes *kerV*, *nhhA* e *dnaQ* através de experimentos de 5'-RACE ,culturas de PA14 e D12 foram cultivadas em meio LB sob agitação

até atingirem a DO_{600nm} 1.0 ou 1.5. Também foi cultivada em LB uma cultura da linhagem DM02 coletada na DO_{600nm} 1.5. O RNA total foi extraído a partir de 1 mL de cada cultura usando kit de miniprep RNA easy (Qiagen). A descontaminação do DNA genômico foi feita pela digestão com DNase I (Qiagen) na própria coluna de acordo com instruções do fabricante. As reações de 5'-RACE foram feitas com o kit da Invitrogen seguindo instruções do fabricante (Invitrogen Version 2.0). Brevemente, 1 µg de RNA total foi usado como molde para síntese de cDNA utilizando o oligo número 1 específico de cada gene (tabela 3). Em seguida o cDNA foi purificado usando o kit de purificação MiniElute PCR (Qiagen) e às extremidades 5' das moléculas de cDNA foram adicionadas caudas de policitosina usando-se a enzima Terminal C transferase. Este cDNA tratado foi amplificado por PCR usando-se um segundo oligo específico (mais 5' à montante da região de hibridização do primeiro oligo usado mas ainda dentro da região codificante do respectivo gene) e um oligo poli-dG. O produto da primeira PCR foi diluído e usado como molde para uma segunda etapa de amplificação (nested PCR), agora usando como molde um terceiro oligo específico (ainda mais 5' à montante em relação ao segundo oligo mas ainda dentro da região codificante do gene) e outro oligo poli-dG. Os produtos de reação da primeira e segunda PCR foram separados e visualizados em gel de agarose 1 % em TBE. Os respectivos oligos específicos usados nas reações de amplificação estão listados na tabela 3.

Os produtos da segunda reação de PCR (nested PCR) foram também purificados e clonados no vetor pGEM-Teasy (PROMEGA) para serem sequenciados e os transcritos analisados para a determinação dos seus inícios de transcrição.

3.26- Ensaios de complementação funcional:

O objetivo deste conjunto de experimentos foi determinar a contribuição da deleção em *kerV* para o fenótipo da linhagem D12, a fim de descartar a possibilidade de efeito polar nos genes à jusante. Os fragmentos utilizados para complementação são descritos nas tabelas 3.

3.26.1- Monitoramento dos níveis de DnaQ e RnhA:

Para acompanhar os níveis das proteínas DnaQ e RnhA em PA14 e D12, as linhagens foram cultivadas em meio LB 37 °C sob agitação e alíquotas retiradas quando a

DO_{600nm} alcançou 0.5, 1, 2 e 2.5. Para cada alíquota retirada foi adicionado um volume determinado de solução O (tampão de amostra eletroforese em SDS-PAGE) de modo que todas as amostras correspondessem ao mesmo número de células. Em seguida, as amostras foram submetidas à SDS-PAGE e processadas de acordo com o descrito no item 3.14.

3.26.2- Análise da expressão por qRT-PCR de *kerV*, *rnhA* e *dnaQ* nas linhagens PA14, D12 e derivadas de D12:

Foram feitas análises de expressão dos genes *rnhA*, *dnaQ* e *kerV* nas linhagens PA14, DM02, DM04, DM06, DM08 e DM10 por ensaios de RT-PCR quantitativo, conforme já descrito no item 3.15.

3.26.3- Twitching:

Os experimentos de twitching foram realizados inoculando-se, com o auxílio de um palito de dente estéril, culturas de PA14, D12 ou das linhagens derivadas cultivadas por 16 horas no fundo de uma placa contendo meio LB com 1% de NaCl. Após o inóculo, as placas foram incubadas durante a noite em estufa 37 °C. No dia seguinte, o meio de cultura foi descartado e as bactérias que cresceram aderidas a superfície da placa (na interface do meio de cultura com o fundo da placa) foram coradas com uma solução de cristal violeta. Este ensaio foi feito a partir de três réplicas biológicas.

3.26.4- Infecção em *Drosophila*:

Os ensaios de virulência das linhagens no modelo de *Drosophila melanogaster*, linhagem Canton-S (Bloomington Stock Center, BSC#1) foram realizados por Yiorgos Apidianakis, pós-doutor do laboratório da Dra. Laurence G. Rahme do Massachusetts General Hospital, Boston, USA. Os experimentos de infecção por 'feeding' ou 'pricking' foram realizados conforme descritos em Apidianakis, 2007. Resumidamente, no 'feeding', uma suspensão de bactérias (crescida em LB até DO_{600nm} 3) é misturada ao meio de cultura para o cultivo de *Drosophila* e em seguida as moscas são mantidas a 21 °C. No 'pricking', uma suspensão de bactérias, de 5×10^7 /mL, é inoculada no meio da região dorsolateral do tórax das moscas anestesiadas por CO₂, com o auxílio de uma microagulha. Desse modo, as bactérias são inoculadas diretamente no músculo. Todos os experimentos são realizados em

triplicata com o uso de no mínimo de 50 moscas em cada experimento. Nos dois casos, diariamente são anotados os números de moscas mortas nos frascos.

3.26.5- Ensaios em células de epitélio de pulmão A549:

Os ensaios de virulência em células humanas de epitélio de pulmão A549 foram realizados por Arunava Bandyopadhyaya, pós-doutor do laboratório da Dra. Laurence G. Rahme do Massachusetts General Hospital, Boston, USA. Resumidamente, para monitorar o nível de produção de interleucina 8 (IL-8), células da linhagem A549 foram infectadas com PA14, D12 e linhagens derivadas numa multiplicidade de infecção de 100 durante 3 horas. O sobrenadante foi coletado e o nível de IL-8 quantificado por ELISA. Para monitorar a ativação de NF- κ B, as células A549 foram coletadas 30 minutos após o início da infecção e processadas para realização de Western blot usando-se anticorpos específicos para as vias de ativação de NF- κ B.

3.26.6- Quantificação de piocianina:

A quantificação de piocianina foi realizada após a extração do pigmento no sobrenadante de culturas crescidas em meio LB+Tet (100 μ g/mL) até DO_{600nm} de 3, centrifugadas a 12000 g por 15 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante reservado. A cada 5 mL de sobrenadante foram adicionados 2,5 mL de clorofórmio. As amostras foram agitadas vigorosamente no vortex por cerca de 30 segundos e em seguida centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente para separação das fases. A fase aquosa foi descartada e à fase orgânica foi adicionado 1 mL de uma solução de HCl 0.2M. Novamente esta solução foi agitada vigorosamente por 30 segundos para extração e em seguida submetida a centrifugação para ocorrer a separação das fases. A fase aquosa foi recolhida e reservada para posteriormente ser lida a 520 nm. A concentração de piocianina em μ g/mL foi calculada de acordo o seu coeficiente de extinção molar (17,072) (Kurashi, 1958 e Essar *et al.*, 1990). O experimento foi feito em triplicatas técnicas a partir de duas réplicas biológicas.

3.27- Análise da expressão do gene *kerV* de PA14 durante infecção em linhagens de células humanas de epitélio de pulmão A549:

Numa busca em um bando de dados de transcriptomas de *P. aeruginosa* (GEO do NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/profiles>), verificou-se que a expressão de *kerV* (presente nesse banco como PA1814, que corresponde à anotação de *kerV* no genoma da linhagem PAO1) foi induzida quando células de PA14 foram incubadas em contato com células de epitélio de pulmão (Chugani e Greenberg, 2007). Assim, a resposta de células da linhagem A549 frente a PA14, D12 e derivadas foi analisada.

As células A549 foram mantidas em meio DMEM suplementado 10 % de soro fetal bovino e 50 U/mL de gentamicina e em estufa com aporte de 5% de CO₂ e repicadas periodicamente.

Para os ensaios de infecção, culturas de A549 foram repicadas em placas de 6 poços e cultivadas até formarem uma monocamada confluyente (aproximadamente 1×10^6 células). Após as células atingirem a densidade desejada, elas foram privadas de soro fetal bovino por pelo menos 18 horas antes do ensaio. Culturas de PA14 na densidade de 1.0, 2.5 ou 3.0, correspondendo a diferentes fases de crescimento, foram coletadas, lavadas e diluídas em 10 mM MgSO₄ para uma densidade de 1×10^8 células/mL (multiplicidade de infecção de 100). Alíquotas de 1 mL das suspensões bacterianas foram adicionadas a cada poço contendo as células A549 em 1 mL de DMEM. Como controle negativo, células de PA14 foram adicionadas em poços que continham somente 1 mL do meio DMEM. As células de PA14 coletadas na DO_{600nm} 1.0 foram incubadas com as células A549 durante 3 e 6 horas, enquanto as células coletadas na DO_{600nm} de 2.5 e 3.0 foram incubadas somente por 4 horas.

Após a infecção, as células de PA14 foram coletadas por centrifugação do sobrenadante e o RNA total extraído utilizando-se o reagente Trizol e o qRT-PCR foi realizado como já descrito.

Para determinar o número total de unidades formadoras de colônias (u.f.c.) na cultura inicial e nas culturas incubadas somente em meio DMEM ou com as células de epitélio A549, diluições seriadas de 10^{-3} a 10^{-8} dessas suspensões foram semeadas em placas de LB. A contagem foi feita a partir de triplicatas técnicas de uma única réplica biológica.

4- Resultados e discussão:

4.1- Análises 'in silico':

4.1.1- Motivos de ligação a SAM, alinhamento e predição de estrutura secundária e terciária de KerV:

O produto de *kerV* apresenta 253 resíduos de aminoácidos e a busca por similaridades de domínios em banco de dados (KEGG e CDD) mostrou que esta seqüência apresenta um motivo de metiltransferase do tipo 11 pfam08241 (Fig.11). Este motivo de metiltransferase possui a aproximadamente 41 resíduos de aminoácidos e está localizado ainda na porção N-terminal de KerV e, portanto, na região onde geralmente são encontrados os motivos de ligação a SAM.

As buscas não retornaram qualquer outra semelhança na porção C-terminal de KerV seja com domínios de ligação a DNA, RNAs, proteínas, ou outras moléculas, não permitindo estabelecer sua especificidade.

Figura 11 - Resultado da busca por domínios conservados. A busca por similaridades no banco de dados A. CDD (Conserved Domain Database) ou B. KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) indicou um domínio de metiltransferase do tipo 11 (pfam08241) na porção N-terminal de KerV. Não foi observada a presença de outros domínios conservados na porção C-terminal de KerV que permitissem estabelecer sua especificidade.

Para o alinhamento foi usado o método PSI-BLAST do NCBI. Três iterações do PSI-BLAST foram realizadas utilizando KerV como sequência sonda na pesquisa de banco de dados não-redundantes (nr) do NCBI. No apêndice 1 são mostrados os 500 primeiros resultados obtidos nesta busca. Como se pode observar KerV apresenta-se conservado em diversos gêneros de bactérias, patogênicas ou não. Há a prevalência da ocorrência em espécies de gama-proteobactérias, incluindo enterobactérias como *E. coli* e *Salmonella enterica* mas também sendo observados alguns representantes de beta-proteobactérias, como *Bordetella pertussis* e *Ralstonia solanacearum*. Este resultado está de acordo com o

descrito em An *et al.*, 2009, que também descreve dados de sintenia que mostram a co-ocorrência dos genes do locus, *gloB*, *rnhA* e *dnaQ*. A exata sequência *gloB-kerV-rnhA-dnaQ* é observada em 51 % das 197 putativos ortólogos descritos neste trabalho. Todas as proteínas do alinhamento possuem um motivo conservado de metiltransferase (geralmente um motivo de metiltransferase do tipo 11) e não apresentam função conhecida.

Outra observação pertinente foi que dentre os ortólogos de KerV mostrados no alinhamento feito no PSI-BLAST não há metiltransferases com estruturas cristalográficas resolvidas.

Como já mencionado as metiltransferases dependentes de SAM apresentam apesar de possuírem baixa identidade de sequência possuem uma alta conservação em sua conformação tridimensional. A figura 12 mostra os resultados do alinhamento estrutural de duas putativas metiltransferases que mesmo com somente 16 % de identidade entre as suas sequências primárias, se apresentam quase idênticas do ponto de vista estrutural, como observada na sobreposição de suas estruturas. Apesar de não terem funções conhecidas ambas foram cristalizadas com SAM, reforçando suas funções de metiltransferase.

Utilizando a plataforma Phyre2 e I-TASSER (classificados entre os melhores programas de predição de estrutura terciária segundo dados do CASP9 - Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction - de 2010), foi possível fazer a predição da estrutura secundária, o modelamento e predição dos sítios de ligação a SAM em um único ambiente. Ambos os programas apresentam uma interface simples sendo somente necessário inserir a sequência primária da proteína de interesse.

Os resultados do programa Phyre2 encontraram como melhores proteínas-molde para o modelamento de KerV duas putativas metiltransferases, uma de *Thermus thermophilus* cujo número de acesso ao PDB é 2gs9 e outra de *Thermotoga maritima* cujo número de acesso ao PDB é 1vlm (estruturas tridimensionais representadas pela figura 14 A e B, respectivamente). Pode-se observar que a ordem das fitas- β nas estruturas 2gs9 e 1vlm seguem a ordem mais comum observada entre as metiltransferases dependentes de SAM, 3214576, com a sétima fita antiparela em relação às demais (Martin e McMillan, 2002). A predição da estrutura secundária mostra que KerV apresenta regiões com alto grau de confiança com a presença de uma alternância de regiões de α -hélices e fitas β . Este padrão também é semelhante ao encontrado na maioria das metiltransferases dependentes de

SAM.O alinhamento das estruturas secundárias destas proteínas com KerV é mostrado na figura 13 A e B. Enquanto a proteína 2gs9 apresenta 28 % de identidade de sequência com cobertura de 84 %, a proteína 1vlm apresenta somente 18 % de identidade de sequência com cobertura de 81 %.

Structural Similarities for the Entities in PDB 2GS9

The following structural similarities have been found using the jFATCAT-rigid algorithm. In order to reduce the number of hits, a 40% sequence identity clustering has been taken from each cluster.

Figura 12 - Alinhamento estrutural de duas metiltransferases dependentes de SAM – 2gs9 X 2p7i, para exemplificar que metiltransferases dependente de SAM apesar de possuírem baixa identidade de sequência, neste caso 16 %, possuem na maioria das vezes suas estruturas terciárias bem conservadas.

A figura 14 C e D mostra o predição do modelo da estrutura tridimensional de KerV gerados pelo programa Phyre2 e I-TASSER, respectivamente. Pode-se observar que neste modelamento KerV apresentou um enovelamento que se aproxima do observado para outras metiltransferases dependentes de SAM. Há a presença de uma folha β central composta por 5-6 fitas centrais e antiparalelas que é alternada com α -hélices. O modelamento feito a partir de dois servidores diferentes gerou modelos com estruturas terciárias semelhantes.

Utilizando o programa 3DLigandSite foi possível predizer também quais resíduos de aminoácidos na estrutura tridimensional do modelo de KerV podem fazer contato com SAM. A partir do modelo gerado servidor Phyre2 o programa faz uma busca automática de estruturas homólogas que possuem ligantes, utilizando o MAMMOTH - Matching Molecular Models Obtained from Theory (Ortis *et al.*, 2002). A partir das estruturas homólogas encontradas é feito um alinhamento de suas sequências primárias com sua proteína alvo e assim é feita a predição dos prováveis sítios de ligação. Esses prováveis sítios são mostrados em detalhes na figura 15 A, B, C e D. A predição dos sítios de ligação foi feita a partir de 23 estruturas homólogas ao modelo de KerV encontradas. 10 dessas estruturas foram cristalografadas com SAM (número de acesso ao PDB 3kkz, 3dh0, 2fk8, 3e23, 1ve3, 1p91, 3dlc, 1i9g, 2yqz e 3g2o) e 13 foram cristalografadas com SAH (2gs9, 3jwh, 1jqd, 3bus, 1jqe, 1l1e, 2pwy, 3go4, 1l3i, 2ex4, 2pxx, 3gu3 e 2p35). A sobreposição das moléculas de SAM e SAH obtidas dos dados de cristalografia é mostrada na figura 15 E. Pode-se observar que os sítios de ligação preditos se encontram na porção N-terminal de KerV. Os resultados desta predição concordam parcialmente com o apresentado por An *et al.*, 2009, onde os motivos I, pós-I e II são coincidentes entre as duas predições. A exceção é o motivo III, onde não foram encontrados resíduos de contato coincidentes (Fig. 15 F). É importante ressaltar que as metiltransferases dependentes de SAM, assim como na maioria das proteínas, a ligação ao substrato depende do correto posicionamento espacial de determinados resíduos de aminoácidos, portanto é crucial que haja um correto enovelamento da proteína para que estes sítios estejam corretamente posicionados para que ocorra a ligação a esse substrato.

Figura 13 - Predição da estrutura secundária de KerV e o alinhamento das proteínas 2gs9 (A) e 1vIm (B) com KerV realizados via Phyre2. A predição da estrutura secundária de KerV e sua sequência primária são mostrados na primeira de segunda linha de cada figura. Os graus de confiança das predições são mostrados na legenda na parte inferior da figura B.

Figura 14 – Predição da estrutura tridimensional de KerV utilizando os servidores Phyre2 e I-Tasser. A. e B. Estruturas das proteínas 2GS9 e 1VLM, respectivamente, que foram encontradas como melhores moldes para a confecção do modelo tridimensional de KerV. C. Predição da estrutura terciária de KerV baseado no servidor Phyre2, 84% dos resíduos foram modelados com mais de 90% de confiança. Os 41 últimos resíduos nesta predição foram modelados no modo *ab initio*. D. Predição da estrutura terciária de KerV baseado no servidor I-Tasser. A acurácia estimada do modelo foi dada pelo próprio programa foi C-score de -1,63 (a escala vai de [-5,2], onde quanto maior o C-score maior é a confiança do modelo). É dado também o TM-score de 0.52 ± 0.15 (um TM-score > 0.5 sugere uma correta topologia).

(legenda no início da página seguinte)

Figura 15 – Predição do sítio de ligação a SAM feitos a partir do programa 3DLigandSite. Foi utilizado como modelo a predição da estrutura tridimensional de KerV gerado pelo servidor Phyre2. **A.** Predição da estrutura terciária de KerV representada em forma de ‘cartoon’ colorido. A coloração destaca a direção N-terminal (azul) para C-terminal (vermelho); **B.** A mesma predição, agora em cinza destacando em azul os locais de ligação a SAM. **C.** Visão detalhada representada em cartoon da parte de KerV que faz contato com SAM ou SAH. **D.** Visão detalhada, representada agora em estrutura em palito dos resíduos que estão em contato com a molécula de SAM ou SAH. **E.** Sobreposição das moléculas de SAM e SAH na exata posição em que se apresetam nas metiltransferases que foram usadas como parâmetro para a predição do sítio de ligação a SAM ou SAH. **F.** Sequência primária e predição da estrutura secundária de KerV, onde estão destacados em azul os resíduos preditos que fazem contato com SAM ou SAH. Também estão destacados os motivos I, pós-I, II e III de acordo com o descrito em An *et al.*, 2009. Pode-se observar que os motivos de ligação a SAM estão localizados na região N-terminal de KerV e que os resíduos preditos concordam com os motivos já descritos na literatura.

4.2- Expressão de KerV recombinante:

A expressão de KerV recombinante foi realizada a partir de diferentes vetores, usando diferentes condições de indução (mudanças na concentração de IPTG, cultivo em diversas temperaturas com ou sem agitação, adição de metais e/ou SAM ao meio) em diferentes linhagens de *E. coli*, visando aumentar sua solubilidade. Um resumo dos ensaios está apresentado na tabela 4.

Como exemplo dos resultados encontrados, a figura 16 mostra a expressão de His-KerV a partir do vetor pPROEX. Pode-se observar que a proteína foi expressa de maneira insolúvel. Na tentativa de otimizar condições de expressão para aumentar a solubilidade de KerV, foram testadas a co-expressão com GroELS e tiorredoxina (Trx) - duas proteínas rotineiramente usadas para aumentar a solubilidade de algumas proteínas insolúveis (George *et al.*, 2002, Yasukawa *et al.*, 1995 e LaVallie *et al.*, 1993). A figura 17 mostra a expressão de His-KerV com tiorredoxina (raias 2 e 3) e com GroELS (raias 4 e 5) e GST-KerV com Tiorredoxina (raias 6 e 7) e com GroELS (raias 8 e 9). Também é mostrada a expressão destas proteínas sem co-expressão. Dentre todas as alternativas, ocorreu a expressão de uma pequena quantidade da proteína solúvel foi obtida quando se co-expressou as chaperoninas GroEL e GroES com a proteína KerV fusionada a glutathione-S-transferase (GST) na linhagem de *E. coli* BL21, apesar da solubilidade da proteína ainda ser pequena (Fig.18). Foi observado que, durante o processo de purificação, ocorreu a co-purificação da chaperona GroEL (Fig.19), sugerindo que a proteína fusionada não apresentava seu enovelamento correto.

Em uma nova abordagem, usando a linhagem de *E.coli* Arctic Cells, onde a indução é feita a 13 °C e com a co-expressão de duas chaperoninas Cnp60/Cnp10, também ocorreu a expressão de uma pequena quantidade de GST-KerV solúvel(Fig. 20). Porém, durante a purificação também foi observada a co-purificação com aschaperoninas Cnp60/Cnp10 (não mostrado). O uso desta nova linhagem também favoreceu o aumento na solubilidade da proteína recombinante onde somente a cauda de histidina foi adicionada na porção N-terminal de KerV(Fig. 20).Mas,como anteriormente, novamente foi observada a co-purificação das chaperoninas (Fig. 21).

Um fato que vale ser mencionado é que,durante as tentativas de purificação, grande parte da proteína que está no extrato solúvel não se liga a resina. Isto suscitou a possibilidade de que a cauda de histidina ou de GST poderia não estar acessível à ligação à resina de Ni^{++} -agarose ou glutathiona sefarose. Para tentar solucionar este problema, tentamos expressar a proteína KerV fusionada a uma cauda de histidina C-terminal – KerV-His (no vetor pET43.1b) na linhagem de *E. coli* Arctic Cells. Novamente, a maior parte da proteína solúvel não se ligou à resina de afinidade e ainda foi observado que a chaperona Cpn60 também co-purificou com KerV (dados não mostrados).

Tabela 4 – Tentativas de expressão de KerV. Foram testadas diferentes linhagens, diferentes condições de indução e extração.

Linhagem/construção	Meio de indução	DO _{600nm} inicial para indução	[IPTG] mM	Condições de indução	Tampão de lise usado na extração*	Solubilidade
DH5α/pRB320	LB ou LB+Zn (1 mM) ou LB+Mg(1 mM)	0,5-0,8	0,6	agitação 200 rpm 37 °C 3 horas	1, 2, 3, 4, 5, 6,7 e 8	insolúvel
Origami B (DE3)/pRB320	LB	1,0	0,6	agitação 200 rpm 20 °C 16 horas	1	Insolúvel
DH5α/pRB320	LB	0,5-0,8	0,6	agitação 200 rpm 30 °C 24 horas	1	insolúvel
DH5α/ pRB320	LB	2	0,1	agitação 200 rpm 37 °C 3 horas	1	insolúvel
DH5α/ pRB320	LB	2	0,1	15 minutos agitação 37 °C seguido de incubação em temperatura ambiente sem agitação	1	insolúvel
DH5α/ pDM012	LB	0,5-0,8	0,6	agitação 200 rpm 37 °C 3 horas	1, 3 e 8	insolúvel
DH5α/ pDM012	LB	0,5-0,8	0,6	agitação 200 rpm 30 °C 24 horas	1 e 3	insolúvel
DH5α/ pDM012	LB	0,5-0,8	0,6	agitação 200 rpm 20 °C 24 horas	1, 3 e 8	insolúvel
DH5α/ pDM012	LB	2	0,1	agitação 200 rpm 37 °C 3 horas	1	insolúvel
DH5α/ pDM012	LB	2	0,1	15 minutos agitação 37 °C seguido de incubação em temperatura ambiente sem agitação	1	insolúvel
BL21 (DE3)/ pRB320	LB	0,5-0,8	0,6	agitação 200 rpm 20 °C 24 horas	1	insolúvel
BL21(DE3)/ pDM012	LB	0,5-0,8	0,6	agitação 200 rpm 37 °C 3 horas	1	insolúvel
BL21 (DE3)/ pRB320	LB	0,5-0,8	0,6	agitação 200 rpm 37 °C 3 horas	1	insolúvel
BL21 (DE3)/ pDM012	LB	0,5-0,8	0,6	agitação 200 rpm 20 °C 24 horas	1	insolúvel
BL21 (DE3)/ pDM014	LB	0,5-0,8	0,6 ou 0,01	Agitação 200 rpm 20 °C 16 horas	1	Pouco solúvel
BL21/pTGROEL/pRB320	LB	0,5-0,8	0,6	agitação 200 rpm 37 °C 3 horas	11	Baixa expressão

BL21/pTTrx/pRB320	LB	0,5-0,8	0,6	agitação 200 rpm 37 °C 3 horas	1	insolúvel
BL21/pTGROEL/pDM012	LB	0,5-0,8	0,6	agitação 200 rpm 37 °C 3 horas	1, 3 e 8	Pouco solúvel
BL21/pTTrx/ pDM012	LB	0,5-0,8	0,6	agitação 200 rpm 37 °C 3 horas	1	insolúvel

*a formulação dos tampões é descrita abaixo:

- 1- Tampão A (7 mM de β -mercaptoetanol, 50 mM Tris-HCl pH 8,0 e 25 % sacarose);
- 2- Tampão A com adição de 1 mM de S-adenosil metionina SAM;
- 3- PBS pH 7,4 com 1 mM de SAM;
- 4- PBS pH 3;
- 5- PBS pH 9;
- 6- Extração do pellet insolúvel obtida da lise em tampão A (1) com solução de 0,25 % Tween 20 e 1 mM de EGTA;
- 7- Tampão STE (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl e 1 mM EDTA) seguido de adição de 5 mM DTT, 1,5 % sarkosil e 2 % de Triton X-100 (Frangoni *et al.*, 1993);
- 8- Tampão B (20 mM HEPES, 60 mM NH_4Cl , 10,5 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ e 10 mM de β -mercaptoetanol (Basturea *et al.*, 2006).

Existem vários exemplos na literatura de proteínas que tem sua solubilidade aumentada quando co-expressas com GroEL e GroES (para citar alguns: George *et al.*, 2002, Vonrhein *et al.*, 1998). Nestes trabalhos, os processos de separação da proteína recombinante das chaperoninas, usando lavagem com ATP-Mg⁺⁺ ou por filtração em gel, são usados com relativo sucesso.

Na tentativa de desfazer o complexo His-KerV ou KerV-His/Cpn60, foi usado um protocolo de lavagem da coluna com ATP-Mg⁺⁺ antes da eluição, para que fosse possível desfazer o complexo His-KerV ou KerV-His/Cpn60, mas as tentativas não foram bem sucedidas, ou seja, não foi possível obter KerV recombinante sem as contaminações das chaperoninas. Também foi realizada uma tentativa de separação por gel-filtração em resina Sephadex G-200, mas novamente a proteína His-KerV/KerV-His eluiu juntamente com a chaperona.

A adição da cauda de histidina à extremidade C-terminal de KerV com a diminuição da temperatura de indução para 20 °C parece ter aumentado a solubilidade de KerV, já que, usando a linhagem BL21 (sem a superexpressão concomitante de chaperoninas), conseguiu-se uma pequena quantidade de KerV na fração solúvel (Fig. 22). Para nossa surpresa, ao passar este extrato pela coluna de afinidade, observamos que também ocorre a co-purificação de três proteínas com peso molecular entre 60 e 70 kDa e uma com peso molecular de aproximadamente 20 kDa. Inicialmente pensamos que essas proteínas ou poderiam ser dímeros de KerV (as de maior peso molecular) ou algum produto de degradação (de menor peso molecular), já que no extrato induzido (Fig.22) é possível observar duas bandas, bem próximas, que desaparecem quando é adicionado 10 mM de DTT, 10 vezes mais que o usual no tampão de amostra (dados não mostrados). Porém ao adicionar mais DTT, SDS e deixar por mais tempo em banho-maria (100 °C) não houve o desaparecimento das bandas de 20 kDa e das com peso molecular entre 60 e 70 kDa no extrato purificado. Portanto, essas bandas não correspondiam a oligômeros de KerV estabilizados por pontes dissulfeto, nem produtos de degradação. Como estas bandas são aproximadamente do mesmo tamanho das HSPs 60 e 70, e como tínhamos disponíveis anticorpos policlonais anti-GroEL (Baldini *et al.*, 1998), realizamos um Western blot que confirmou a identidade das bandas maiores (Fig.22). Também realizamos um Western blot com anticorpo anti-KerV que confirmou a banda de 30 kDa como KerV-His (Fig.22). Apesar

de não identificarmos a banda menor de 20 kDa, esta se trata de uma proteína de *E.coli*, provavelmente também uma chaperona.

Deste modo, concluímos que a solubilidade da proteína nessas condições é devido a interação com as chaperoninas e que KerV provavelmente não permanecerá solúvel quando o complexo for desfeito, não atingindo sua conformação nativa *in vitro*.

Figura 16 - Frações de extratos de *E. coli* DH5 α super-expressando a proteína recombinante His-KerV. Raia 1 – Marcador de peso molecular; raia 2 e 3 – Extratos correspondentes a fração insolúvel e solúvel da linhagem de *E. coli* super-expressando a proteína recombinante His-KerV a partir do vetor pPROEX, respectivamente. A indução foi feita a 37 °C com adição de 1 mM de IPTG a culturas de *E.coli* DH5 α em fase exponencial de crescimento. His-KerV possui uma massa aparente aproximada de 30 kDa e está indicada na figura.

Figura 17 - Extratos de *E. coli* BL21 expressando as proteínas recombinantes His-KerV e GST-KerV sozinhas ou com coexpressão de GroEL ou Tiorredoxina. Raia 1 - Marcador de peso molecular; raias 2 e 3 – Co-expressão pTTrx/His-KerV - extrato de 3 e 0 horas de indução, respectivamente; raias 4 e 5 – Co-expressão pTGroEL/His-KerV - extrato de 3 e 0 horas de indução, respectivamente; raias 6 e 7- Co-expressão pTTrx/GST-KerV - extrato de 3 e 0 horas de indução, respectivamente; raias 8 e 9- Co-expressão pTGroEL/GST-KerV; raias 10 e 11- His-KerV - extrato de 3 e 0 horas de indução, respectivamente e raias 12 e 13- GST-KerV - extrato de 3 e 0 horas de indução, respectivamente. A indução foi feita a 37 ° C com adição de 1 mM de IPTG a culturas de *E.coli* BL21 em fase exponencial de crescimento. Massas moleculares aparentes: GroEL – 60 kDa, GST-KerV – 56 kDa, His-KerV – 30 kDa e Trx – 10 kDa.

Figura 18 - Frações solúveis e insolúveis de extratos de *E. coli* BL21 superexpressando as proteínas recombinantes His-KerV e GST-KerV sozinhas ou com coexpressão de GroEL ou Tiorredoxina. Raia 1 - Marcador de peso molecular; raias 2 e 3 – Co-expressão pTGroEL/His-KerV - extrato de 0 e 3 horas de indução, respectivamente; raias 4 e 5 – Co-expressão pTGroEL/GST-KerV - extrato de 0 e 3 horas de indução, respectivamente; raias 6 e 7- Co-expressão pTGroEL/GST-KerV – fração solúvel e insolúvel, respectivamente; raias 8 e 9- Co-expressão pTGroEL/His-KerV – fração solúvel e insolúvel, respectivamente; raias 10 e 11- GST-KerV – fração solúvel e insolúvel, respectivamente e raias 12 e 13- His-KerV – fração solúvel e insolúvel, respectivamente; raias 14 e 15- Co-expressão pTTrx/GST-KerV, fração solúvel e insolúvel, respectivamente. Massas aparentes: GroEL – 60 kD, GST-KerV – 56 kDa, His-KerV – 30 kDa e Trx (não visualizada neste gel) – 10 kDa. O asterisco destaca a condição onde a proteína GST-KerV está na fração solúvel.

Figura 19 - Purificação de GST-KerV recombinante através de cromatografia de afinidade em resina de glutationa-sefarose. Raia 1 - Marcador de peso molecular; raias 2 e 3 – 5 e 10 μ L, respectivamente, da fração solúvel do extrato de *E. coli* BL21/pTGroEL super-expressando o produto de *kerV*; raias 4 e 5 – 5 e 10 μ L, respectivamente do extrato solúvel após passagem pela resina; raia 6 e 7- Material obtido após lavagem da coluna; raias 8, 9 e 10- proteínas eluídas da resina após lavagem com 10 mM de glutathione reduzida.

Figura 20 - Expressão de His-KerV e GST-KerV na linhagem 'Arctic Cells' BL21(DE3) com a co-expressão das chaperoninas Cpn60/Cpn10. Raia 1- Marcador de peso molecular; raias 2, 3, 4 e 5 – GST-KerV – extratos de 0, 16 horas, fração insolúvel e solúvel, respectivamente; raias 6, 7, 8 e 9 – His-KerV – extratos de 0, 16 horas, fração insolúvel e solúvel, respectivamente; Massas moleculares aparentes: Cpn60 – 60 kDa, GST-KerV – 56 kDa, His-KerV – 30 kDa. A indução foi feita a 13 °C durante 16 horas com adição de 1 mM de IPTG a culturas de *E. coli* 'Arctic Cells' BL21(DE3) em fase exponencial de crescimento.

Figura 21 - Purificação de His-KerV recombinante, obtida com a expressão na linhagem 'Arctic Cells' BL21(DE3) a 13°C, através de cromatografia de afinidade (Ni^{++}). Raia 1 - Marcador de peso molecular; raia 2 – extrato de cultura não induzida; raia 3- extrato de *E.coli* recolhido 20 horas após indução; raia 4- fração solúvel do extrato de *E.coli* superexpressando KerV; raia 5 - fração insolúvel do extrato de *E. coli* super-expressando o produto de *kerV*; raia 6 - eluato após passagem pela coluna; raia 7 –proteínas eluídas da resina com tampão contendo 300 mM de imidazol; Massas moleculares aparentes: Cpn60 – 60 kDa e His-KerV – 30 kDa.

Figura 22 - Purificação de KerV-His recombinante (cauda de histidina na extremidade C-terminal) através de cromatografia de afinidade (Ni^{++}). Raia 1 – marcador de peso molecular; raia 2 – extrato de *E.coli* não induzido; raia 3 e 4- extrato de *E.coli* após 20 horas de indução; raia 5- fração solúvel do extrato de *E.coli* super-expressando KerV; raia 6 material recolhido após passagem pela coluna; raia 7- lavagem da coluna; raia 8 e 9 –proteínas eluídas da resina com tampão contendo 300 mM de imidazol; raia 10- western blot das proteínas eluídas incubado com soro anti-GroEL e raia 11- western blot de proteínas eluídas incubado com soro anti-KerV.

A fim de evitar a co-purificação com chaperoninas constitutivamente expressas, o que já que era um indicativo do mau enovelamento de KerV recombinante, escolhemos outra abordagem, agora utilizando vetores que adicionam MBP à proteína de interesse. Esta proteína também tem sido utilizada com sucesso para aumentar a solubilidade de diversas proteínas insolúveis. Para isto, foram utilizados dois vetores, pMAL c2 e pMAL p2. Enquanto no primeiro a proteína de fusão é expressa no citoplasma, no segundo a proteína é direcionada ao periplasma, onde as condições são mais oxidantes (Debarbieux e Beckwith, 2000). As tentativas de expressão mostraram que somente ocorreu a expressão da proteína recombinante no vetor pMAL-c2 e sua solubilidade parcial foi alcançada somente em temperaturas abaixo de 30 °C (Fig. 23 B). A Figura 23 também mostra a indução de duas bandas com massas aparentes muito próximas, que permanecem mesmo na presença de 10 mM de DTT, o que indica que não são diferentes estados de oxidação da proteína. A purificação em resina de amilose foi relativamente bem sucedida. Pode-se notar o aparecimento de uma banda (Fig. 24) que não estava evidente na raia correspondente ao extrato total e que foi enriquecida durante o processo de purificação. Esta mesma banda não é observada quando se purifica somente MBP expressa a partir do vetor pMAL-c2 (Fig. 24) e portanto não se trata de um contaminante do extrato de *E. coli* com afinidade pela resina. Essa proteína contaminante não é reconhecida pelo soro anti-KerV nem pelo anticorpo anti-MBP (dados não mostrados). Como em tentativas anteriores de expressar KerV tivemos problemas com a co-purificação de chaperoninas, mesmo chaperoninas nativas, especulamos que esta banda seja GroEL, o que evidencia o fato de KerV necessitar de condições especiais de dobramento, sem que isso signifique que a função de KerV esteja diretamente associada à de GroEL.

Mesmo havendo a co-purificação da chaperonina, foram realizados ensaios na tentativa de separar MBP de KerV. A clivagem foi feita através do uso da protease fator Xa. A figura 25 mostra a cinética da digestão de MBP-KerV na presença de fator Xa em temperatura ambiente. O resultado mostra que, em apenas 4 horas de incubação, já houve a digestão quase completa, com o surgimento de uma banda com uma massa aparente de 40 kDa que corresponde a MBP. Há também o surgimento de duas bandas com massas aparentes entre 30 e 25 kDa. A banda mais próxima de 30 kDa deve corresponder a KerV (28 kDa) mais resíduos de aminoácidos que são adicionados pelo vetor, e a banda menor ser

devido resultado da presença de um sítio de clivagem do fator Xa, a sequência NRARDW, que está presente no início da sequência protéica de KerV (segundo o programa de predição <http://asqa.iis.sinica.edu.tw/fXaWeb>), o que subtrai cerca de 2,2 kDa da massa aparente de KerV.

Estes experimentos foram realizados em uma escala pequena, a partir de 10 mL de cultura. Porém, no processo de escalonamento realizado pela purificação de MBP-KerV a partir de um volume 500 mL de cultura, foi observada a formação de precipitados no processo de digestão, ou seja, ao ser separada de MBP em uma concentração maior, KerV precipitou, demonstrando que é a presença desta fusão que estabiliza sua forma solúvel.

Em outra abordagem, também foram testados alguns protocolos de renaturação descritos na literatura, em adição a todas as tentativas de obter a proteína recombinante solúvel, descritas anteriormente. O principal se baseou na purificação de His-KerV ou KerV-His em condições desnaturantes (na presença de 8M de uréia) seguida da sua renaturação por diluição. A técnica consistiu em gotejar uma solução que continha KerV desnaturada na presença de uréia em um grande volume de tampão sem uréia. Tentamos diversas condições, com diversos tampões em diferentes pHs, mas todas com relativo insucesso: quando se obtinha KerV renaturada, na última diálise para retirar o imidazol restante da purificação, a proteína precipitava. A falta de um ensaio para acompanhar a recuperação da atividade da proteína também foi um fator desestimulante. Um dado interessante é que, quando desnaturada, KerV se liga fortemente a coluna, de modo contrario ao observado quando se tenta purificar a proteína recombinante na forma solúvel. Estes últimos dados parecem confirmar o fato de que grande parte da solubilidade de KerV se deve a associação com chaperoninas, e que provavelmente KerV não se encontra em seu correto enovelamento.

Foram realizados incontáveis experimentos na tentativa de obter KerV em sua forma nativa. A obtenção de uma proteína recombinante com atividade é um obstáculo recorrente quando se trabalha com proteínas desconhecidas. Como não há um ensaio padronizado para se dosar a atividade da enzima em questão, não há como determinar se esta se encontra em estado funcional quando purificada. Por outro lado, como a superexpressão da proteína em um sistema heterólogo pode não resultar em sua conformação nativa, os ensaios para a

determinação de sua atividade esbarram na dúvida se os resultados negativos encontrados se devem à falta de um substrato ou de outras condições experimentais adequadas, como a presença de cofatores essenciais, ou de outras condições do meio, como pH e força iônica. Assim, infelizmente este trabalho não conseguiu superar este obstáculo, apesar de muitas estratégias perseguidas e de variações nos protocolos, tanto de expressão, purificação, re-novelamento e atividade de KerV recombinante. Vale salientar que a maioria dos procedimentos usados para otimizar a solubilidade e purificação de proteínas foram abordados (para uma boa revisão Gräslund *et al.*, 2008).

Apesar do relativo insucesso ao longo da otimização do processo de indução e purificação, foram realizados alguns ensaios de atividade de metiltransferase usando a fusão MBP-KerV e ensaios de cross-link na tentativa de mostrar que KerV se liga a SAM, adicionando uma evidência experimental à predição de função desta proteína.

Figura 23 -Expressão e purificação de MBP-KerV. Em **A.** Gel de poliácridamida 12 % mostrando a expressão de MBP-KerV clonado no vetor pMAL-p2 (raia 3) e pMAL-c2 (raia 4). A raia 1 representa o marcador de peso molecular e a raia 2, amostra antes da indução. Em **B.** gel de poliácridamida 12% mostrando MBP-KerV expresso de maneira solúvel a partir da construção pMAL-c2-kerV à 20 °C. Raia 1 - Marcador de peso molecular; raia 2 – amostra antes da indução; raia 3- extrato após 3 horas de indução; raia 4- fração solúvel do extrato induzido e raia 5 – fração insolúvel do extrato induzido.

Figura 24 -Purificação de MBP e MBP-KerV recombinante através de cromatografia de afinidade em resina de amilose. Raia 1 - Marcador de peso molecular; Para MBP - raia 1 e 2- fração insolúvel e solúvel, respectivamente; raia 3- material não ligado a coluna (flow-through); raia 4 - lavagem da coluna com tampão de ativação e raia 5 - material eluído da coluna após a lavagem com tampão de ativação com 10 mM de maltose. Para MBP-KerV - raia 7 e 8- fração insolúvel e solúvel, respectivamente; raia 9- material não ligado a coluna (flow-through); raia 10 - lavagem da coluna com tampão de ativação e raia 11 - material eluído da coluna após a lavagem com tampão de ativação com 10 mM de maltose.

Figura 25 -Cinética da digestão de MBP-KerV com fator Xa. A digestão foi realizada em temperatura ambiente. As raia 2 e 3 correspondem a 2 horas de digestão do extrato incubado na ausência (controle) e na presença do fator Xa. As raia 4 e 5 correspondem a 4 horas de digestão do extrato incubado na ausência (controle) e na presença do fator Xa. As raia 6 e 7 correspondem a 8 horas de digestão do extrato incubado na ausência (controle) e na presença do fator Xa. As raia 8 e 9 correspondem a 24 horas de digestão do extrato incubado na ausência (controle) e na presença do fator Xa.

4.2.1- Expressão de um ortólogo a KerV: BP3212:

Uma busca no banco de dados de um consórcio que visa expressar e purificar um grande número de proteínas de vários organismos (<http://targetdb.pdb.org>) mostrou que uma proteína de *Bordetella pertussis*, BP3212, seria um candidato promissor para ensaios de atividade. Os dados do projeto mostram que ela foi expressa de maneira solúvel, mas ainda não teve sua estrutura cristalográfica resolvida. Assim, foi interessante para nosso estudo já que o problema da solubilidade de KerV poderia ser contornado.

Bordetella pertussis é uma β -proteobactéria, e o agente etiológico da coqueluche e a comparação entre as sequências de KerV e BP3212 mostra que BP3212 apresenta 256 resíduos de aminoácidos, enquanto KerV apresenta 253. Um alinhamento feito por BLAST das duas proteínas mostra que elas apresentam uma identidade de 31% e uma similaridade de 46%, com uma cobertura de 80% entre as sequências (Fig.26 A). A análise da organização do genoma mostra que BP3212 está ao lado de *rnhAe gloB* mas não de *dnaQ*, como *kerV* em PA14 (Fig.26 B).

Para avaliar sua expressão heteróloga, a região codificadora de BP3212 foi amplificada a partir do DNA genômico de uma linhagem de *B. pertussis* gentilmente cedida pela Profa. Dra. Waldely de Oliveira Dias (Instituto Butantan) e em seguida clonada no vetor pET28a.

O uso de proteínas ortólogas a KerV é uma alternativa interessante já que, como já mencionado na introdução, mutantes de *Vibrio cholerae* O395 e *Yersinia pseudotuberculosis* em ortólogos de KerV, VC0395_A1827 e YPK_1107, respectivamente, apresentam virulência atenuada no modelo de virulência em *Drosophila* (An et al., 2009).

A.

Score = 103 bits (257), Expect = 4e-27, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 69/216 (31%), Positives = 100/216 (46%), Gaps = 14/216 (6%)

```

P.aer 23   DWFQGPLGSLMLAEERRLLCDELTRYFGGYLVHYGPHAE---LPPSTGQIQRGVRLGPPL 79
          +WFQ P G +LA E+   + +   FG Y   G AE L +   + V G P
B.per 13   EWFQTPPGQYVLAWEQAFDEAVADIFGYAWQVG-LAEPNLLRANRMPFKAWVGAGVPP 71

P.aer 80   PGVD-----IACEEGAWPLSEHAADVLLQHGLDFCLSPHRLRLREAARTVRPGHLLLI 133
P +       +AA P   + D+++L H +   +PH +LRE R + P G +++
B.per72   PELAQGWQACVAAPEALPFESQSVDLLVLPFAFECAEAPHLVLRVERVLVPEGRVVIS 131

P.aer134   GINPWSLWGIRHYFAGDA---LRQARCIPPSRACDWLNLLGFALEKRRFGCYRPLASA 189
          G NPWSLWG R+G   L + +   R DW LL F +E+ RFGCY P +
B.per132   GFNPWSLWGARNLMPGMEAWLPLPLSAQVALPRLKDWFKLLSFEVERGRFGCYAPACRTD 191

P.aer190   AWQSRLARLERWGDWQSSGAGFYLLVARKLVVGLR 225
          WR +ER+G W G Y++ A K V +R
B.per192   KWLRRWRFMERYGQRWWGLGGAVYVVTATKKVAAMR 227

```

B.

Figura 26 - Proteína de *B. pertussis* BP3212, um possível ortólogo de KerV (a) Alinhamento BLAST de um ortólogo de KerV, BP3212. A proteína apresenta 31 % de identidade e 46 % de similaridade com 80% de cobertura quando comparada a sequência de KerV. (b) A organização da região do genoma mostra que BP3212 apresenta-se adjacente a *rnhA* e *gloB*, mas não a *dnaQ*.

A tentativa de expressar o ortólogo de KerV, BP3212 foi bem sucedida. Na figura 27, podemos observar a indução de uma banda de aproximadamente 30 kDa. Para verificar em que condições a proteína é expressa de maneira solúvel a indução em diferentes temperaturas foi realizada. A figura 27 mostra que BP3212 foi expressa de maneira insolúvel (corpos de inclusão) a 37 °C, porém em temperaturas mais baixas de expressão, 30°C e 20°C, foi observado um aumento da sua solubilidade (asteriscos na Fig.27).

A purificação de BP3212 mostrado na figura 28 revelou que durante a purificação, grande parte da proteína que está no extrato solúvel não se ligou a resina, mostrando um comportamento muito similar ao observado na tentativa de purificar His-KerV (Figs.21 e 22). Observa-se também a co-purificação das mesmas bandas de quando se expressa KerV. Como já mencionado, há vários relatos na literatura de proteínas recombinantes que são co-

purificadas com GroEL (Bair e Black, 2007 e George *et al.*, 2002) e este fato sugere que essas proteínas não estão completamente dobradas (Gräslund *et al.*, 2008).

Figura27 -Frações solúveis e insolúveis de extratos de *E. coli* BL21 super-expressando a proteína recombinante His-BP3212 em diversas temperaturas. Raias 1 a4 – Expressão a 37 °C. Extratos de 0 e 3 horas de indução, fração insolúvel e solúvel, respectivamente; Raias 5 a 8 – Expressão a 30 °C. Extratos de 0 e 3 horas de indução, fração insolúvel e solúvel, respectivamente; Raias 10 a 13 – Expressão a 20 °C. Extratos de 0 e 3 horas de indução, fração insolúvel e solúvel, respectivamente; A seta indica indução de uma proteína com massa aparente que equivale a His-BP3212 – 30 kDa. Os asteriscos destacam onde a proteína His-BP3212 está presente na fração solúvel.

Figura28 -Purificação de His-BP3212 recombinante, induzida a 20 °C, através de cromatografia de afinidade em resina de níquel agarose. Raia 1 - marcador de peso molecular; raia 2 – tempo não induzido; raia 3- fração solúvel; raia 4- material não ligado a coluna (flow-through); raia 5 - material eluído da coluna após a lavagem com tampão de ativação com 300 mM de imidazol. É interessante notar que o perfil de purificação de His-BP3212 se assemelha ao perfil de purificação de His-KerV mostrado na figura 11.

4.3- Ensaios de atividade de metiltransferase:

A proteína recombinante MBP-KerV foi purificada a sua atividade de metiltransferase foi testada, usando um kit colorimétrico para metiltransferases. Diversos potenciais substratos de metilação foram utilizados: RnhA, DnaQ, MBP, DNA, RNA total e um híbrido de DNA:RNA.

Não foi possível detectar atividade de metiltransferase de MBP-KerV com os substratos utilizados. Foram feitas diversas variações nos ensaios, com diferentes concentrações dos substratos purificados, sem sucesso. Os resultados negativos com MBP-KerV purificada podem indicar que esta não está no seu correto enovelamento. O enriquecimento, durante a purificação, de uma banda de tamanho semelhante à chaperonina GroEL (60 KDa) já era um indicativo desta possibilidade. Extratos totais de PA14 e D12 foram também usados como fontes de enzimas para os ensaios, na tentativa de se verificar diferenças entre eles, porém nenhuma atividade de metiltransferase foi detectada com o uso deste kit.

Os ensaios de ligação a SAM sejam eles realizados com a enzima purificada ou a partir de extratos totais de *E.coli* expressando MBP-KerV, também não apresentaram resultados conclusivos, visto que o resultado negativo pode ser explicado pela ausência de um correto enovelamento de KerV. Outro fator a ser considerado diz respeito ao fato de que algumas metiltransferases só ligam a SAM quando na presença do seu substrato de metilação (Aktas e Narberhaus, 2009). MBP-KerV foi utilizada nos ensaios logo após sua purificação, sem prévia incubação com um substrato candidato.

4.4- Ensaios de localização subcelular de *kerV*:

4.4.1- Ensaios de localização de KerV em PA14.

A determinação da localização intracelular de KerV pode trazer novas informações em relação a sua função.

Numa tentativa inicial, em células que continham uma cópia de *pkerV-gfp* (promotor natural) integrada no cromossomo, não foi possível detectar um sinal de fluorescência que fosse devido a expressão de GFP-KerV (Figs. 29 A e 29 B). Células de PA14, que não carregam a construção, também apresentaram fluorescência, provavelmente devido a pigmentos

como piocianina e pioverdinaproduzidos pela bactéria, que emitem fluorescência em comprimentos de onda próximos ao da GFP. Para efeito de comparação, na figura 29C é mostrada a intensidade de fluorescência de células que carregam um vetor de expressão multi-cópia contendo uma fusão *cupD1-gfp* (Menegassoet *al.*, em preparação). Neste controle, pode-se observar uma forte emissão de fluorescência que parece estar difusa no citoplasma da célula e de acordo com o esperado para a GFP, que na maior parte das vezes é expressa de maneira solúvel. Como a expressão de KerV a partir de seu promotor natural parece ser baixa, sendo este fato corroborado pela difícil detecção KerV em extratos de PA14 utilizando o soro policlonal produzido (dados não mostrados), KerV foi fusionado a GFP sob controle de um promotor forte induzível por IPTG. A construção foi integrada como cópia única no cromossomo de PA14 e D12, conforme descrito em Material e Métodos, dando origem às linhagens DM17 e DM18, respectivamente.

Figura 29 –Análise da localização celular de KerV expresso a partir de seu promotor natural. Fotomicrografias de células em contraste de fase (A, C e E) e excitadas em comprimento de onda de 470 - 490 nm (B, D e F). A. e B., células de PA14 carregando em cópia única *pkerV-GFP*, C. e D., células de PA14. Em E. e F., células de PA14 carregando plasmídeo multi-cópia expressando GFP. Fotos capturadas com objetiva com aumento de 100 X. A diferença observada no tamanho das células em E e F se deve a uma diferente configuração (zoom) na captação das fotos pelo computador.

As células da linhagem DM17 na presença de IPTG foram detectadas no microscópio de fluorescência e seus extratos foram analisados por Western blot.

Os resultados do Western blot mostraram que, após 30 minutos da adição de IPTG à cultura, pode ser observado o aparecimento de uma banda de massa aparente de 56 KDa (Fig. 30A). Esta banda foi reconhecida tanto pelo soro anti-KerV quanto pelo anti-GFP, indicando que a construção está correta, já que corresponde à soma das massas moleculares de KerV e GFP.

A observação das células ao microscópio de fluorescência (Fig. 30) mostrou que após aproximadamente 30 minutos a indução não foi homogênea e somente algumas células parecem apresentar a fluorescência de GFP-KerV. Este fato é curioso, pois a expressão é dependente de um promotor induzível, então se esperava que todas as células apresentassem o mesmo padrão de fluorescência. Porém, como o promotor *lac* está sob controle do seu repressor LacI, que foi integrado juntamente com a fusão, é possível que a heterogeneidade da expressão seja atribuída a diferenças na regulação do promotor *lac*, como relatado em *E. coli* (Elowitz *et al.*, 2002). Também foi observado que em algumas células, ocorre a predominância da fluorescência nas bordas das células, como se formasse um halo (Fig. 30B1). Isto sugere que GFP-KerV poderia se acumular na região do envelope celular. Regiões transmembrana não foram detectadas pelo uso de ferramentas de bioinformática, como os programas Phobius e TMHMM, mas não se pode descartar a hipótese de que KerV se associe à membrana interna ou a proteínas de membrana.

A observação das células aproximadamente 1 hora após a indução (Fig. 30 C) mostra o aparecimento de uma fluorescência pontual que também não é observada em todas as células da amostra. Este padrão pode ser consequência da formação de corpos de inclusão (Fig. 30C1). Este resultado também reforça a aparente natureza agregativa de KerV, já que mesmo em PA14, assim como em *E. coli*, parece formar corpos de inclusão quando superexpressa.

Figura 30 - Localização celular de KerV. A. Western blot de extratos da linhagem DM17 mostrando que a detecção de GFP-KerV através de soros policlonais anti-KerV e anti-GFP. A indução foi monitorada em 30 minutos e 1 hora após adição de 2 mM de IPTG. B – Células de PA14 carregando a fusão GFP-KerV vistas por microscopia de fluorescência após 30 minutos da adição de IPTG. B1 – Ampliação de um campo da figura B para destacar localização da fluorescência de GFP-KerV no envelope celular. C -Células de PA14 carregando a fusão GFP-KerV vistas por microscopia de fluorescência após 1 hora da adição de IPTG.C1 – Ampliação de um campo da figura C para destacar localização pontual da fluorescência de GFP-KerV após 1 hora de indução. As imagens B. e C. foram capturadas com objetiva de aumento de 100 X. As figuras B1. e C1 são ampliações feitas no computador para melhor visualização das imagens.

4.5- Determinação da frequência de mutação:

A proximidade e a aparente co-transcrição do gene *kerV* com genes envolvidos na replicação/reparo de DNA sugerem que a função de seu produto esteja de alguma maneira ligada a estes mecanismos, seja diretamente através da metilação do DNA, ou indiretamente através da metilação de RNase HI e/ou DnaQ, regulando de alguma maneira sua (s) atividade (s).

Conforme discutido na introdução, não há nenhum gene homólogo a *dam* anotado no genoma de *P. aeruginosa*, apesar dos genes *mutL* e *mutS* estarem presentes. Também não existem homólogos a *mutH*. Além disso, não se encontram quaisquer relatos na literatura sobre o estado de metilação do DNA de *P. aeruginosa*. Entretanto, mutações em *mutL* e *mutS* estão relacionadas com fenótipos mutadores em *P. aeruginosa* (Oliver *et al.*, 2002).

Considerando esses fatos, uma hipótese atraente seria de que a metiltransferase codificada por *kerV* teria como alvo o DNA, agindo provavelmente em conjunto com outras proteínas, que poderiam conferir afinidade e especificidade a sua atividade. Essa hipótese se enquadra no fenótipo pleiotrópico da linhagem D12, que apresenta vários genes com expressão alterada em relação à linhagem selvagem (Rahme *et al.*, dados não publicados).

Em uma primeira análise foi realizado um experimento para determinar se KerV poderia estar envolvido no sistema de reparo do tipo “mismatch repair”. Para isso foi usado um ensaio para determinar a frequência de mutação na linhagem mutante.

O resultado do ensaio para determinar a frequência de mutação mostra que a linhagem D12 apresenta um aumento em torno de quatro vezes na frequência de mutação quando comparado com a linhagem selvagem (tabela 5), relativamente pequena em relação a outros genes sabidamente envolvidos no reparo de DNA. Por exemplo, em *E. coli* e *Serratiamarcescens*, a inativação de Dam pode levar a um aumento na frequência de mutação de até 30 vezes (Glickman, 1979 e Ostendorf *et al.*, 1999). Em outro exemplo, quando o gene *mutS*, envolvido com o sistema de reparo de DNA do tipo ‘mismatch’, é inativado em *P. aeruginosa*, ocorre um aumento na frequência de mutação, usando o ensaio de resistência a rifampicina, em torno de 480 vezes em PAO1 (Gutiérrez *et al.*, 2004) e em torno de 100 vezes, usando o ensaio de resistência a fosfomicina, em PA14 (Rodríguez-Rojas e Blázquez, 2009). Porém, em outras espécies como *S. pneumoniae* e *N. meningitidis*, um

aumento na frequência de mutação de 4 e 11 vezes, respectivamente são observados em mutantes em *mutS* (Hall & Henderson-Begg, 2006). Apesar de inicialmente não considerarmos a linhagem D12 como uma linhagem mutadora, este pequeno aumento na frequência de mutação observado neste ensaio pode ser causado, em parte, pela diminuição dos níveis de expressão de DnaQ(*mutD*), a subunidade da DNA polimerase III responsável pelo reparo durante a replicação (que será discutido mais abaixo).

Vale lembrar que todos os ensaios realizados com linhagens derivadas de PA14 são realizados em nosso laboratório sempre a partir de um estoque congelado, evitando-se assim a fixação de mutações espontâneas durante o crescimento e manutenção das culturas, que poderiam estar presentes em D12 em maior frequência.

Tabela 5- Frequências de mutação observadas nas linhagens selvagem (PA14) e mutante para o gene *kerV* (D12).

Linhagem	Frequência de mutação		aumento
	PA14	D12	
Ensaio 1	$3,02 \times 10^{-9}$	$11,89 \times 10^{-9}$	3,94 x
Ensaio 2	$1,42 \times 10^{-9}$	$6,5 \times 10^{-9}$	4,58 x

4.6- Investigação do estado de metilação do DNA:

4.6.1- Análise por enzimas de restrição:

Para investigar a presença de sítios correspondentes a metilação por Dam metiltransferase (5'-G-m⁶A-T-C-3') em PA14 e D12, foi feita a extração do DNA plasmidial e em seguida feitas digestões com *Sau3AI*, cuja clivagem é independente de metilação no resíduo de adenina, e *Mbol*, que é bloqueada quando este resíduo se encontra metilado. Como controle da digestão foi usado DNA plasmidial extraído de *E. coli dam*⁺. Os resultados obtidos mostram que as sequências GATC não são metiladas nos resíduos de adenina nas

linhagens PA14 e D12 e, portanto, a metiltransferase KerV não está envolvida com a metilação do resíduo de adenina nesta sequência (figura 31).

Figura 31- Estado de metilação do pUCp18 em diferentes linhagens de *P. aeruginosa* e *E. coli*. O vetor pUCp18 foi extraído de PA14 (raias 1 e 2), D12 (raias 3 e 4) e *E. coli* DH5α (*dam*⁺ raia 5 e 6) digerido com *Sau*3AI (raias 1, 3 e 5) ou *Mbo*I (raias 2, 4 e 6). Raia 0 – marcador de peso molecular ϕ X174;

Outro possível alvo de metilação encontrado em procariotos é o resíduo de citosina. Este resíduo pode ser metilado tanto no grupamento amina exocíclico (N4-metilcitosina) quanto no C5 do anel (5-metilcitosina) (Jeltsch, 2002).

Os resultados iniciais obtidos basearam-se na concepção simples de que a atividade de uma metiltransferase é bloqueada ou não pela presença de metilação, sem levar em consideração qual resíduo estava metilado e em qual posição. Deste modo, esperávamos encontrar grandes diferenças na digestão como o observado nas raia 5 e 6 da figura 31. Porém, o bloqueio da atividade das enzimas de restrição por metilação é muito particular, dependendo da posição específica do grupo metil na sequência. Assim, dados presentes no banco REBASE (www.rebase.neb.com) mostram que enzimas podem ser parcial ou totalmente bloqueadas por estados específicos de metilação. A enzima *Mbo*I, por exemplo, além de ser completamente bloqueada se o substrato é Gm⁶ATC, também é bloqueada

parcialmente quando este é GATm⁵C. A digestão do DNA metilado em GATm⁴C por qualquer dos isosquizômeros *Sau3AI* e *Mbol* é também completamente bloqueada.

Com esse mesmo raciocínio e com este mesmo cuidado, podemos concluir, por exemplo, que avaliando visualmente o gel da figura 31, comparando-se o padrão de digestão das enzimas *Mbol* e *Sau3A* entre as linhagens e baseados no descrito acima, KerV também não está envolvida com a metilação dos carbonos 4 e 5 nos resíduos de citosina da sequência GATC.

O resultado das digestões do DNA genômico com as enzimas de restrição descritas no item 3.22.1 do Material e Métodos não mostraram diferenças no padrão de digestão para todas as enzimas testadas, confirmado por Southern blot (Fig. 32), com exceção da enzima *HincII*, que digeriu apenas parcialmente o DNA da linhagem D12 neste experimento. A reação de digestão para esta enzima foi repetida e os resultados mostraram o mesmo padrão de digestão para as duas linhagens, confirmado por Southern blot.

Figura 32 -Padrão de digestão do DNA genômico de PA14 e D12 digerido com diversas enzimas de restrição. No lado esquerdo são mostrados géis de agarose 1 % impregnados com brometo de etídeo. No lado direito, a confirmação por Southern blot. Sempre a primeira raia de cada lote de digestão corresponde o DNA de PA14 digerido e a segunda raia o DNA de D12. 1- *HpaI*; 2- *HpaII*; 3- *XmaI*; 4- *XbaI*; 5- *HindIII*; 6- *HinfI*; 7- *HincII*; 8- *BglI*; 9- *EagI*; 10- *NcoI*; 11- *NotI*; 12- *Clal*; 13- *AluI*; 14- *DraI*; 15- *PvuI*; 16- *KpnI*; 17- *AatI*; 18- *PstI*; 19- *PvuII*; 20- *Sau3A*; 21- *SpeI*; 22- *AvaI*; 23- *XhoI*; 24- *StuI*; 25- *Sall*; 26- *SmaI*; 27- *Apal*.

A região inicialmente escolhida para análise da metilação da posição de resíduos de citosina (m^5 -C) foi um trecho do DNA de 561 pb que corresponde a origem de replicação do cromossomo de PA14, por ser um potencial sítio de metilação, caso esta esteja coordenada com a replicação do DNA, como demonstrado em *E. coli*(Casadesus *et al.*, 2006) e em *Caulobacter crescentus*(Zweiger *et al.*, 1994.).

Os resultados, obtidos a partir do sequenciamento de 35 clones obtidos no tratamento do DNA da linhagem D12 e 26 clones obtidos da linhagem PA14, mostram que, de um total de 157 resíduos de citosina na região analisada, 137 sofreram conversão em cada linhagem, resultando numa eficiência de 87,26 % de conversão. Apenas 20 resíduos em cada linhagem foram resistentes ao tratamento, mas não foram coincidentes entre as linhagens.

Num segundo experimento, onde o DNA genômico foi digerido previamente com uma enzima de restrição e a temperatura da reação durante o tratamento com bisulfito de sódio foi aumentada para 55 °C foram sequenciados 27 clones provenientes da linhagem PA14 e 32, da linhagem D12. Os resultados mostram que, de um total de 157 resíduos de citosina na região analisada, 151 sofreram conversão para a linhagem PA14 e 152 sofreram conversão na linhagem D12, resultando numa eficiência de conversão de 96,17 % e 95,54 %, respectivamente.

A análise dos resíduos de citosina refratários a conversão e, portanto potenciais sítios de metilação das linhagens PA14 obtidos tratamentos independentes são mostrados na figura 33. Os 20 resíduos refratários ao primeiro tratamento (destacados em amarelo) e os 6 resíduos refratários do segundo tratamento (destacados em verde) são resumidos a apenas um (destacado em azul) quando se analisa os dois tratamentos simultaneamente. Como este potencial sítio de metilação, quando analisado na linhagem D12, no primeiro tratamento é refratário e no segundo tratamento sofre conversão podemos descartá-lo como um resíduo dependente da metilação por KerV. Portanto, conclui-se que não há metilação do tipo m^5 -C dependente de KerV no trecho de DNA analisado Este resultado sugere também que m^5 -C não está presente próximo à origem de replicação de PA14, onde se esperaria que um sistema de metilação coordenado com replicação fosse evidenciado.

Figura 33 - Sequência do fragmento de DNA usado como substrato do tratamento com bissulfito de sódio, contendo a origem de replicação cromossomal de PA14. Os resíduos de citosina destacados em amarelo representam aqueles que foram resistentes conversão no 1º tratamento, ou seja, poderiam estar metilados. Os resíduos de citosina destacados em verde representam aqueles que foram resistentes à conversão no 2º tratamento. Em azul, está representado o único resíduo que foi refratário à conversão nos dois tratamentos em PA14, mas que foi convertido em D12.

4.7- Marcação de células com ^3H -metionina:

Uma estratégia para tentarmos verificar um possível alvo para KerV foi alimentar as células crescidas em meio mínimo com ^3H -metionina, visto que aparentemente *P. aeruginosa* não apresenta um sistema de transporte para SAM, como discutido a seguir.

4.7.1- Perfil de proteínas metiladas:

No genoma de PA14 não são encontrados genes anotados como codificadores de um transportador dedicado de S-adenosil metionina (SAM). Este tipo de transporte dedicado de SAM parece ser raro e apenas encontrado em alguns eucariotos, como por exemplo, em *Saccharomyces cerevisiae* (Murphy e Spence, 1972). Em bactérias, este tipo de transportador foi descrito recentemente apenas no parasita intracelular obrigatório *Rickettsia prowazekii* (Tucker *et al.*, 2003). Este fato deve ser devido a molécula de SAM não ser um substrato livremente disponível no ambiente, principalmente devido a sua instabilidade (Parks e Schlenk, 1958). O que é observado é a grande ocorrência de transportadores de metionina,

que pode ser facilmente convertida a SAM no interior da célula bacteriana, por uma única reação dependente de ATP e adenosina (KEGG pathway map). Em *P. aeruginosa*, foi mostrado que em apenas 8 segundos após o transporte, 40-60% da metionina incorporada é encontrada sob a forma de SAM (Montie & Montie, 1979). Deste modo, para nossos experimentos de marcação fornecemos L-[metil- ^3H]-metionina (^3H -metionina), que se converte em S-[metil- ^3H]-adenosil-L-metionina (SAM- ^3H).

Para analisar o efeito da incorporação do radical metil foi preciso que preveníssemos a incorporação da ^3H -metionina na síntese *de novo* de proteínas. Para isso, tratamos a cultura com um agente inibidor da tradução para eliminar esta interferência. Foram testados dois antibióticos: o cloranfenicol, já amplamente utilizado em experimentos de inibição de tradução em outros microorganismos e estreptomicina. Os resultados mostram que apesar da estreptomicina inibir o crescimento de PA14 (Fig. 34 A), este antibiótico não foi capaz de inibir completamente o processo de tradução (Fig. 34 B). Sabe-se que a estreptomicina é capaz de se ligar irreversivelmente à subunidade 30S do ribossomo e, mais que impedir a tradução, parece ter um efeito maior na incorporação errônea de aminoácidos à cadeia peptídica nascente, induzindo a síntese de proteínas truncadas e defeituosas, o que pode ocasionar a parada do crescimento observada. O mecanismo de ação do cloranfenicol é um pouco diferente e ele parece impedir a atividade de peptidil transferase na subunidade 50S, inibindo assim a etapa de elongação da cadeia polipeptídica nascente. Os resultados mostram que o cloranfenicol possui uma melhor eficiência na inibição do processo de tradução (Fig. 34 D). Pode-se observar que, meia hora depois da adição de cloranfenicol, a tradução foi drasticamente interrompida. A inibição da tradução também foi acompanhada pela inibição do crescimento da cultura (Fig. 34 C).

Esta etapa de otimização das condições de inibição do processo de tradução para prevenir a incorporação de ^3H -metionina na síntese *de novo* de proteínas foi importante, pois sem a inibição da tradução seria impossível a visualização da incorporação do radical metil proveniente da conversão de ^3H -metionina em ^3H -SAM.

Foi possível perceber diferenças no perfil de bandas encontrado nas células que foram alimentadas com ^{35}S -metionina ou ^3H -metionina (Fig. 35). Isto já era esperado, visto que existem algumas proteínas modificadas por metilação, como por exemplo, CheR, uma

proteína envolvida no processo de quimiotaxia. É possível observar na figura 35 que existem algumas bandas correspondentes proteínas metiladas, pois somente estão presentes nos extratos marcados com ^3H -met (indicadas pelas pontas de seta). Porém, não foi possível visualizar diferenças entre o perfil de proteínas marcadas com ^3H -metionina entre a linhagem PA14 e D12. Era esperado com este ensaio caso o alvo de metilação fosse alguma proteína majoritária, a presença de uma forte marcação na linhagem PA14 e ausência na linhagem D12. Apesar do resultado deste ensaio não apresentar diferenças marcantes entre as linhagens PA14 e D12, não pode ser descartada de o alvo de metilação de KerV ser uma proteína menos abundante ou que seja metilada apenas em determinadas condições não contempladas nesse ensaio. Atualmente, em procariotos, tem se sido descrito um número crescente funções celulares que são atribuídas a este tipo de modificação pós-traducional (Poledova e Sherman, 2007).

A.

B.

C.

D.

Figura 34 - Inibição da tradução na linhagem PA14. Aliquotas de 500 μ L foram retiradas em 0,5, 1, 2 e 3 horas após adição do antibiótico e incubadas por 5 minutos com 5 μ Ci de 35 S-metionina, processadas e analisadas por fluorografia. Em **A.**, perfil de crescimento da cultura após a adição de estreptomicina. Em **B.**, auto-radiografia do gel que continha os extratos proteicos de células tratadas com estreptomicina, mostrando que não houve interrupção da síntese proteica. Em **C.**, perfil de crescimento da cultura após a adição de cloranfenicol. Em **D.**, auto-radiografia do gel que continha os extratos proteicos de células tratadas com cloranfenicol. A acentuada diminuição do sinal ao longo do tempo indica que houve interrupção da síntese proteica e o sucesso da otimização.

Figura 35 - Proteínas metiladas pela adição de ^3H -metionina das linhagens PA14 e D12. Raia 1- Proteínas marcadas com ^{35}S -metionina antes da adição de cloranfenicol; raias 2, 3 e 4- Extratos de células de PA14 com a síntese protéica inibida e tratados com um pulso de 5, 10 e 20 minutos de ^{35}S -metionina; raia 5- Extrato de células de PA14 marcadas com ^3H -metionina antes da adição de cloranfenicol; raias 6, 7 e 8- Extratos de células de PA14 com a síntese protéica inibida e tratadas com um pulso de 5, 10 e 20 minutos de ^3H -metionina; raia 9- Extrato de células de D12 marcadas com ^3H -metionina antes da adição de cloranfenicol; raias 10, 11 e 12- Extratos de células de D12 com a síntese protéica inibida e tratadas com um pulso de 5, 10 e 20 minutos de ^3H -metionina; raia 13- Marcador de peso molecular com proteínas marcadas com ^{14}C .

4.7.2- Metilação do DNA genômico:

Para a marcação do DNA genômico, células de PA14 e D12 foram incubadas em meio de cultura sem antibióticos (inibidores de tradução) e alimentadas durante a fase exponencial de crescimento com ^3H -metionina.

Os resultados iniciais da exposição do DNA extraído de células de PA14 e D12 alimentadas com ^3H -metionina revelaram uma intensa marcação na porção superior do gel, correspondente a espécies de alto peso molecular, num padrão que parecia não corresponder ao DNA presente no gel, que pode ser observado em bandas (dados não mostrados). Essa marcação inespecífica pode corresponder a proteínas ligadas ao DNA, que não foram completamente removidas pela purificação. Rotineiramente no laboratório, para extração do DNA genômico, usou-se a metodologia de Chen & Kuo, que utiliza apenas clorofórmio como solvente orgânico para desproteínização da amostra, após precipitação com cloreto de sódio. Esta metodologia parece ser suficiente para fornecer um DNA com grau de pureza apropriado para reações de rotina, como digestão com enzimas de restrição e PCR, mas não suficiente para este tipo de experimento, mais sensível. Isso é corroborado ao medir a relação 260/280 do DNA extraído que foi 1,92 e 1,93 para PA14 e D12, respectivamente. Esta relação corresponde a presença de cerca de 35% de proteína na preparação (Sambrook e Russel, 2001 Apêndice A8.21)

Por isso, para obter um DNA puro, livre de proteínas ligadas, novos protocolos de extração de DNA genômico usando CTAB seguida de extração fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) ou simplesmente adicionando pelo menos três etapas consecutivas de extração com fenol:clorofórmio (1:1) no protocolo de Chen e Kuo foram testados. Um DNA genômico de ótima pureza (relação 260/280 maior que 2,0) e rendimento (em torno de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) foram obtidos para os dois protocolos. Os resultados dessas novas extrações não mostraram marcação radioativa no DNA, ou seja, não foi possível observar sinal nem na linhagem PA14 nem na D12 mesmo após dois meses de exposição do filme. Não existem relatos na literatura sobre metilação do DNA em *Pseudomonas* e nossos resultados indicam que o DNA de *P. aeruginosa* parece não ser metilado nas condições testadas e, portanto, KerV não estaria envolvido com este fenômeno.

4.7.3- Perfil de metilação de RNA:

A presença de sinal radioativo nos rRNAs de PA14 já era esperado, visto que modificações pós-transcricionais em rRNAs ribossomais é observada em todos os Domínios da vida, como já discutido na introdução.

Uma análise feita por alinhamento via BLAST, mostrou que quase todas as metiltransferases caracterizadas em *E. coli* possuem ortólogos em *P. aeruginosa* PA14 (tabela 6), o que sugere um alto grau de conservação no padrão de modificação de rRNA entre as duas espécies. Outro dado interessante é que a maioria das metiltransferases envolvidas com a metilação de rRNAs apresentam características estruturais distintas e que portanto, se KerV apresentasse alguma semelhança com enzimas envolvidas com metilação de rRNAs, provavelmente uma função de rRNA metiltransferase já teria sido atribuída a ortólogos de KerV, se esse fosse o caso. Entretanto, ainda pode restar a hipótese de KerV apresentar um padrão inédito e diferente de todas as metiltransferases de rRNA descritas até o momento.

Embora o resultado da exposição do RNA extraído de células de PA14 e D12 alimentadas com ^3H -metionina tenha revelado uma diferença na intensidade da marcação entre as linhagens PA14 e D12 (Fig. 36), o rRNA não deve ser o alvo de KerV, já que a redução é observada simultaneamente nos três tipos de rRNAs: 23S, 16S e o 5S. Não há nenhuma outra metiltransferase de rRNA descrita na literatura que seja capaz de metilar os três tipos de rRNAs. Todas até então descritas só podem metilar sítios únicos e bem específicos em cada molécula de rRNA (tabela 6). A análise por microarranjos de DNA (resultados não publicados de Rahme *et al*) mostram todas as metiltransferases de rRNA, com exceção de três, estão com expressão diminuída em fase de crescimento exponencial na linhagem D12 (tabela 6, última coluna). Deste modo, a diminuição na marcação dos rRNAs pode ser um reflexo da redução na expressão ou atividade destas metiltransferases. Portanto, apesar de não estar envolvido diretamente com a metilação de rRNA, KerV parece ter impacto na metilação dos rRNAs.

Tabela 6 - Putativos ortólogos em PA14 de proteínas de *E. coli* envolvidas com metilação dos rRNAs 16S e 23S.

Nucleotídeo	Modificação	metiltransferase de <i>E. coli</i>	ortólogo de PA14	e-value	Identidade/similaridade (%)	Expressão D12/PA14 ^c (Fold change)
16S rRNA						
527	m ⁷ G	RsmG	PA14_73360	2.0 x e ⁻⁵⁹	52/74	0,58
966	m ² G	RsmD	PA14_04860	4.0 x e ⁻³⁹	49/62	0,52
967	m ⁵ G	RsmB	PA14_00180	7.0 x e ⁻⁹⁶	48/62	0,74
1207	m ² G	RsmC	PA14_61220	4.0 x e ⁻⁵¹	40/52	1,68
1402	m ⁴ Cm	RsmH ^b	PA14_57450	1.0 x e ⁻⁸⁵	52/68	0,41
1402	m ⁴ C	RsmI ^b	PA14_57470	1.0 x e ⁻⁸²	54/69	1,14
1407	m ⁵ C	RsmF	PA14_00180	1.0 x e ⁻¹⁹	29/43	0,74
1498	m ³ U	RsmE	PA14_05450	3.0 x e ⁻⁵⁰	43/60	1,18
1516	m ² G	RsmJ ^a	-	-	-	-
1518	m ⁶ ₂ A	RsmA	PA14_07730	9.0 x e ⁻⁷⁵	53/68	0,70
1519	m ⁶ ₂ A	RsmA	PA14_07730	9.0 x e ⁻⁷⁵	53/68	0,70
23S rRNA						
745	m ¹ G	RlmA	PA14_49390	1.0 x e ⁻⁴⁹	42/56	0,74
747	m ⁵ U	RlmC	PA14_52190	5.0 x e ⁻²⁵	28/42	0,66
1618	m ⁶ A	RlmF	PA14_14340	8.0 x e ⁻⁸⁴	50/61	0,70
1835	m ² G	RlmG	PA14_61090	4.0 x e ⁻⁷¹	42/56	0,30
1915	m ³ Ψ	RlmH	PA14_12050	4.0 x e ⁻⁵¹	55/76	0,70
1939	m ⁵ U	RlmD	PA14_52190	1.0 x e ⁻⁸⁰	39/56	0,60
1962	m ⁵ C	RlmI	PA14_04640	6.0 x e ⁻⁵⁵	35/53	0,62
2030	m ⁶ A	RlmJ ^a	-	-	-	-
2069	m ⁷ G	RlmK ^a	-	-	-	-
2251	Gm	RlmB	PA14_65190	4.0 x e ⁻⁸⁰	59/76	0,60
2445	m ² G	RlmL	PA14_24675	2.0 x e ⁻¹⁰⁰	56/71	0,62
2498	Cm	RlmM	PA14_44280	3.0 x e ⁻⁹¹	49/63	0,41
2503	m ² A	RlmN	PA14_14830	6.0 x e ⁻¹²⁸	60/74	0,57
2552	Um	RlmE	PA14_62870	3.0 x e ⁻⁶⁷	59/75	0,47

^aEnzimas aguardando identificação (Puerta *et al.*, 2009);

^bKimura e Suzuki, 2010;

^cDados de transcriptoma comparando culturas em fase exponencial de crescimento (DO_{600nm} 1) de PA14 e D12 (L.G. Rahme, comunicação pessoal).

Figura36 -RNA extraído de células de PA14 e D12 alimentadas com ^3H -metionina em meio mínimo. As raias 1 e 4 correspondem a 2 μg de RNA total de PA14 e D12, respectivamente. As raias 2 e 5 correspondem a 4 μg de RNA total de PA14 e D12, respectivamente. As raias 3 e 6 correspondem a 8 μg de RNA total de PA14 e D12, respectivamente.

4.8- Expressão e purificação dos produtos de *dnaQ* e *rnhA* em *E. coli*:

Os genes *dnaQ* e *rnhA* foram clonados no vetor pPROEX HTa. O produto do gene *rnhA* foi expresso de maneira solúvel, purificado e usado para produzir anticorpos policlonais (Fig. 37).

O soro produzido para o produto de *rnhA* reconhece a proteína recombinante em extratos induzidos de *E. coli* com alta afinidade quando incubado em TBS-Leite ou TBS-T mesmo na diluição de 1:5000 (Fig.38 A). Uma banda de aproximadamente 16 kDa também pode ser visualizada nas raias que correspondem ao extrato de *E. coli* não induzido e ao extrato de *P. aeruginosa*, que corresponde a Rnase HI endógena presente nessas células.

O produto do gene *dnaQ* se encontra parcialmente solúvel (Fig. 37). Um extrato com um grande volume de cultura induzido foi preparado e a proteína foi purificada seguindo o mesmo protocolo usado para a purificação de His-RNaseHI. A proteína recombinante foi injetada em coelho e o soro obtido. O soro produzido para o produto de *dnaQ* reconhece a proteína recombinante em extratos induzidos de *E. coli* com alta afinidade quando incubado

em TBS-Leite ou TBS-T mesmo na diluição de 1:5000 (Fig.38 B). O soro também foi testado em uma linhagem de PA14 que super-expressa DnaQ e foi capaz de reconhecer a proteína endógena (dados não mostrados).

Figura 37 - Gel de poliácridamida 12 % com frações solúveis e insolúveis de extratos de *E. coli* super-expressando as proteínas recombinantes His-DnaQ e His-RNaseHI. Raia 1 – Marcador de peso molecular; raias 2 e 3, Extrato contendo His-DnaQ, fração insolúvel e solúvel, respectivamente; raias 4 e 5 - Extrato contendo His-RNase HI, fração insolúvel e solúvel, respectivamente. As setas vermelhas a e b apontam para a posição das proteínas recombinantes no gel, His-DnaQ (massa aparente aproximada de 30 kDa) e His-RNaseHI(massa aparente aproximadamente de 20 kDa), respectivamente.

Figura 38 -Reatividade dos soros policlonais anti-His-RNaseHI e anti-His-DnaQ;A. Raia 1 - Extrato de *E. coli* não induzido; raia 2 - Extrato de *E. coli* 3 h após indução com IPTG; raia 3- Extrato de PA14; raia 4 -His-RNaseHI purificada por cromatografia de afinidade ; **B.**Raia 1 - Extrato de *E. coli* não induzido; raia 2 - His-DnaQ purificada por cromatografia de afinidade.

4.9- Ensaios de interação proteína-proteína entre KerV, RNaseHI e DnaQ:

As construções pDM004-009 foram usadas para os ensaios de duplo-híbrido. Os resultados dos ensaios não mostraram interação entre os produtos dos genes avaliados, já que não foram observadas colônias capazes de crescer em meio desprovido de histidina e adenina. Este ensaio também sugere que KerV não é um dímero ou oligômero de ordem maior e confirma dados da literatura de que tanto RNaseHI quanto DnaQ não são constituídas de mais de uma subunidade do mesmo peptídeo.

Tentativas de se realizar um ensaio de overlay (ou far-Western-blot) para corroborar o resultado do duplo-híbrido foram realizadas, usando o soro anti-His-RNaseHI. Porém, o soro policlonal produzido gerou resultados falso-positivos, pois foi capaz de reconhecer outras proteínas recombinantes com cauda de histidina. Apesar dos resultados de interação entre RNaseHI, DnaQ e KerV serem negativos, isto não exclui a possibilidade destes estarem participando de uma mesma via, apenas a hipótese de que estas proteínas poderiam interagir e formar um complexo foi descartada.

4.10- Análise da expressão de *rnhA* e *dnaQ* em PA14 e D12:

Tentativas realizadas anteriormente ao início deste trabalho de complementar o mutante D12 com um plasmídeo multicópia contendo o gene *kerV* resultaram em fenótipo intermediário entre PA14 e D12, ou seja, na linhagem complementada a produção de piocianina diminuiu, por exemplo, mas o nível ainda continuou mais alto que PA14. Nessa linhagem complementada *in trans*, os níveis de KerV são mais altos que os encontrados em PA14, como verificado por Western blot (não mostrado). Como a presença do plasmídeo, mesmo sem inserto, interferia também no fenótipo tanto de D12 quanto de PA14, outras linhagens foram construídas no laboratório de nossa colaboradora L.G. Rahme (An *et al*, 2009). Para descartar a hipótese de uma mutação secundária em D12, um novo mutante em *kerV* foi construído com a mesma estratégia de D12 e denominado DA17. Este mutante mostrou-se idêntico a D12, em todos os ensaios fenotípicos e de virulência realizados (An *et al.*, 2009). Estas linhagens foram então reconvertidas ao genótipo selvagem, com a troca do gene deletado pela cópia íntegra, por recombinação homóloga. As linhagens resultantes,

DA20 e DA21, retomaram o fenótipo selvagem (An *et al*, 2009). Estes resultados indicaram que não há mutações secundárias em D12 (e DA17) e que o fenótipo pleiotrópico dessas linhagens se deve à ausência de *kerV*. Entretanto, pela organização do locus *kerV-rnhA-dnaQ* não se podia descartar que o efeito da deleção de *kerV* em D12 e DA17 tivesse um efeito polar na expressão dos genes à jusante no operon, sendo parcialmente responsáveis pelos fenótipos observados.

Para que esse ponto fosse esclarecido, primeiramente foram estimados os níveis relativos de expressão de *dnaQ* e *rnhA* nas linhagens PA14 e D12. Os resultados de qRT-PCR mostram que há uma diminuição nos níveis de mRNAs de *dnaQ* e *rnhA* no mutante D12 (Fig.39 A e B). Isto indica que, apesar de manter a fase de leitura, o que em tese manteria o ribossomo engajado na tradução de um provável operon, a deleção da região codificadora do gene *kerV* influencia a expressão dos genes *dnaQ* e *rnhA*. Somente quando há a reposição de *kerV* no seu locus original, restaurando o fenótipo selvagem na linhagem DA20, *kerV* os níveis de *dnaQ* e *rnhA* se assemelham ao da linhagem selvagem (dados não mostrados).

Ao se analisar os níveis das proteínas DnaQ e RnhA nas linhagens PA14 e D12, observa-se que os níveis de DnaQ possuem sua expressão diminuída (Fig.40B), acompanhando os níveis mais baixos de mRNA. Os níveis de RnhA parecem não ser afetados pela deleção do gene *kerV* (Fig. 40 A), apesar de seus níveis de mRNA estarem diminuídos.

Figura 39 - Níveis dos mRNAs de *rnhA*(A) e *dnaQ*(B) nas linhagens PA14 e D12 coletadas em DO_{600nm} 1 e 3, verificados por qRT-PCR. Os resultados mostrados são representativos de pelo menos três réplicas biológicas.

Figura 40 -Níveis das proteínas RnhA(A) e DnaQ (B) nas linhagens PA14 e D12 ao longo do crescimento em meio LB a 37 °C. Enquanto os níveis de DnaQ são afetados pela deleção do gene *kerV*, os níveis de RnhA não estão alterados. A quantidade de proteína aplicada em cada poço pode ser verificada através da detecção de bandas inespecíficas. Os resultados mostrados são representativos de pelo menos três experimentos independentes.

4.11- Atividade dos promotores do lócus *kerV-rnhA-dnaQ*:

Os resultados mostrados acima mostram que a deleção no gene *kerV* afeta a expressão dos genes *rnhA* e *dnaQ*, enquanto os níveis de mRNA dos dois genes estão afetados, somente *DnaQ* possui expressão reduzida. Isto sugere ou RNase HI apresenta uma maior estabilidade em relação da *DnaQ* ou que deve haver mecanismos pós-transcricionais compensatórios que permitem que os níveis de *RnhA* não sejam afetados, sugerindo que a manutenção do seu nível tenha um papel essencial à fisiologia da célula. De fato, várias tentativas de se obter um mutante nulo em *rnhA* falharam e não há nenhum mutante por transposon neste gene disponível nas bibliotecas anotadas (Liberati *et al.*, 2006 e Jacobset *et al.*, 2003), demonstrando sua essencialidade. A redução observada nos níveis de *DnaQ* na linhagem D12 parece não afetar a multiplicação das células, já que D12 cresce tão bem quanto PA14 em diversas condições laboratoriais testadas (dados não mostrados e An *et al.*, 2009), mas pode contribuir para a pequena alteração na frequência de mutação.

A fim de verificar se os níveis desses transcritos são afetados em nível transcricional, foram construídas fusões de transcrição das regiões à montante dos genes *rnhA* e *dnaQ* com o repórter *lacZ*. Estas fusões foram integradas no sítio *ctx* das linhagens PA14 e D12 e os níveis de atividade de β -galactosidase monitorados ao longo da curva de crescimento. Os resultados mostram que a atividade promotora de *rnhA* é a mesma nas linhagens PA14 e D12 (Fig. 41A), indicando que a ausência de *KerV* não exerce efeito sobre a atividade promotora da região à montante de *rnhA*. Este resultado se contrapõe à queda nos níveis dos mRNAs de *rnhA* verificada por qRT-PCR e provavelmente este fato se deve a um efeito polar causado pela deleção de *kerV*, já que *rnhA* apresenta sua região promotora sobreposta a região codificadora de *kerV* (ver Fig. 3, introdução). Para verificar o efeito da deleção de *kerV* sobre a atividade promotora de *rnhA*, foi feita também uma construção com a região promotora de *rnhA* obtida da linhagem D12, ou seja, contendo grande parte da região à montante de *rnhA* deletada. Sua atividade promotora foi medida e os níveis de β -galactosidase indicam que a atividade promotora desta construção, quando comparada com a região sem a deleção, está cerca de 2 a 2,5 vezes diminuída (Fig. 41 B). Este resultado confirma que a deleção de *kerV* possui, de fato, um efeito direto na transcrição no gene *rnhA*, o que explicaria os baixos níveis de mRNA encontrados na linhagem D12.

Os níveis de atividade de β -galactosidase da região à montanteda região codificadora de *dnaQ* na linhagem D12 se apresentam de 1,7 a 2 vezes inferiores aos níveis da linhagem PA14 ao longo da curva de crescimento (Fig.42 A), sugerindo que KerV parece influenciar positivamente, direta ou indiretamente, a expressão de DnaQ. Este resultado indica também que os menores níveis de mRNA e proteína DnaQ verificados na linhagem D12 ocorrem provavelmente como resultado da atividade promotora diminuída.

A fim de tentar esclarecer o efeito de KerV sobre expressão de *dnaQ*, a atividade promotora de *dnaQ* foi monitorada nas linhagens PA14 e D12 superexpressando KerV. Como já era sabido que o vetor pUCp18 parece alterar alguns fenótipos, os controles foram feitos comparando-se os resultados das linhagens PA14 e D12 transformadas com este plasmídeo. Os resultados da figura 43 A e B mostraram que a superexpressão de KerV não é capaz de resgatar os níveis de atividade promotora da linhagem selvagem, pelo contrário, a superexpressão de KerV parece ter um efeito negativo na atividade promotora de *dnaQ*, já que, quando KerV é superexpresso, são observados valores semelhantes aos encontrados na linhagem D12 contendo o vetor pUCp18 sem inserto, sugerindo que níveis controlados de KerV sejam necessários para a correta expressão de *dnaQ*.

A fim de determinar se a expressão do gene *kerV* é regulada pelo seu próprio produto, foi feita uma fusão de transcrição com sua região promotora. Essa construção foi integrada no sítio *ctx* das linhagens PA14 e D12 e os níveis de atividade promotora verificados. Os resultados indicaram que a expressão de *kerV* não é auto-regulada em nível de transcrição, já que não foram observadas diferenças na atividade promotora entre as linhagens PA14 e D12 ao longo do crescimento em meio LB (Fig. 42 B).

A.

B.

Figura 41 - Atividade promotora das fusões de transcrição *rnhA-lacZ* (A) e *rnhAmut-lacZ* (B) integradas no sítio ctx do cromossomo de PA14 e D12, durante o crescimento em meio LB a 37 °C, sob agitação. A. A atividade de β-galactosidase a partir de *rnhA-lacZ* apresenta-se praticamente idêntica em PA14 e D12. B. A atividade a partir de *rnhAmut-lacZ*, onde grande parte da região promotora de *rnhA* está ausente devido a deleção de *kerV*, é cerca de duas vezes mais baixa quando comparado com quando esta região se encontra íntegra.

A.Fusão de transcrição *dnaQ-lacZ* **B.**Fusão de transcrição *kerV-lacZ*

Figura 42 - Atividade promotora das fusões de transcrição *dnaQ-lacZ* (A) e *kerV-lacZ* (B) integradas no sítio *ctx* do cromossomo de PA14 ou D12, durante o crescimento em meio LB a 37 °C, sob agitação. Enquanto a atividade promotora de *dnaQ-lacZ* é cerca de duas vezes mais baixa na linhagem D12 a atividade de β-galactosidase de *kerV-lacZ* apresenta-se praticamente idêntica nas duas linhagens.

Figura 43 - Atividade promotora da fusão de transcrição *dnaQ-lacZ*, na linhagem PA14 ou D12 contendo o vetor pUCp18 (A) ou pUCp18-*kerV* (B), durante o crescimento em meio LB a 37 °C, sob agitação. A. Como esperado, a atividade promotora de *dnaQ-lacZ* na linhagem D12/pUCp18vazio é cerca de duas vezes mais baixa que a linhagem PA14/pUCp18vazio; **B.** A atividade promotora de *dnaQ-lacZ* nas linhagens PA14 e D12 que contêm o plasmídeo pUCp18-*kerV* é similar entre as duas linhagens.

4.12- Determinação dos inícios de transcrição dos genes *kerV*, *rnhA* e *dnaQ* :

A determinação dos inícios de transcrição dos genes do locus foi importante para melhor esclarecer como ocorre sua regulação, fornecendo também uma contribuição para a análise da complementação do fenótipo da linhagem D12 (abaixo).

Duas técnicas bem estabelecidas foram usadas para se determinar o início de transcrição dos genes *kerV*, *rnhA* e *dnaQ*: primer extension e 5'-RACE. Os putativos inícios de transcrição obtidos foram mapeados a partir do início de tradução, assim quando um transcrito é indicado como possuindo um início de transcrição na posição -65, isto significa que o início de transcrição foi mapeado a 65 pb à montante do início de tradução do gene.

4.12.1-*kerV* :

Para o gene *kerV*, foram detectadas quatro bandas no ensaio de primer extension, que correspondem às posições -54/-55 e -61/-62 (figura 44 A e C). Uma região -10 conservada de ligação a RNA polimerase (TAGTAT) está presente numa posição que favorece o início na posição -55.

No ensaio de 5'-RACE, só foi possível obter bandas a partir de cultura de PA14 coletada na DO_{600nm}1.5 (Fig. 44 B). De fato, não foram obtidos clones quando se usou RNAs extraídos de cultura de PA14 coletada na DO_{600nm}1.0 (dados não mostrados), sugerindo que a expressão de *kerV* é mais baixa nas fases iniciais do crescimento exponencial, como detectado na análise de transcriptoma (An, *et al.*, 2009). Os dados da atividade promotora verificados por ensaios de β -galactosidase também reforçam este resultado, já que os valores iniciais se apresentam baixos e aumentam pouco mais de duas vezes quando da DO_{600nm} de 1 até 2.

A análise dos 12 clones sequenciados mostrou a existência de quatro transcritos. Três deles apresentam inícios de transcrição muito próximos um ao outro: um na posição -53(2/12 clones), outro na posição -55 (5/12 clones) e outro -58 (3/12 clones). Também foi detectado um quarto início de transcrição, localizado na posição -11 (2/12 clones) (Fig. 44B eD).

A presença de inícios de transcrição, obtidos por diferentes técnicas, entre as posições -54 e -55 à montante do início de tradução do gene *kerV* indicam que esta região

pode ser considerada como um local de início da transcrição. A presença de uma região de ligação da RNA polimerase -10 conservada reforça ainda mais esta afirmação (Fig. 44 C).

Figura 44 - Inícios de transcrição do gene *kerV* de PA14 determinados através primer extension e 5'-RACE. A. O resultado do primer extension mostra a presença de 4 inícios de transcrição. **B.** Cromatogramas de sequência mostrando os inícios de transcrição obtidos por 5'-RACE. **C.** Sequência do gene *kerV* mostrando os locais dos inícios de transcrição mapeados por primer extension (destacados em verde) e 5'-RACE (destacados em amarelo). A sequência sublinhada se refere ao provável sítio -10 de ligação da RNA polimerase. O putativo sítio de ligação ao ribossomo (RBS) está destacado em cinza.

4.12.2-*rnhA*:

Para o gene *rnhA*, foram observados pelo menos sete inícios de transcrição em cada técnica, sugerindo que não há um promotor forte majoritário para este gene, ou ainda a presença de estruturas secundárias muito estáveis no mRNA, que poderiam causar paradas

inespecíficas da transcriptase reversa nas duas estratégias. A análise por 'primer extension' mostra claramente a presença de mais de um início de transcrição, sendo o transcrito mais abundante o marcado como 9 na figura 45. A resolução do gel só permitiu revelar os tamanhos dos transcritos mais próximos ao primer usado, sendo estes nas posições -154, -160, -184, -194, -263 e -340, sendo a banda marcada com o número 9 ainda mais distante do início de tradução de *rnhA* (Fig. 45). Como a presença de muitas bandas pode indicar paradas inespecíficas da transcriptase reversa, foram realizados ensaios de 5' RACE na tentativa de refinar esses resultados. A análise dos produtos da segunda reação de PCR do experimento de 5' RACE visualizados nos géis de agarose nos permitem observar que existem, de fato, vários transcritos para o gene *rnhA* (Fig. 46). Para o mapeamento dos inícios de transcrição foram sequenciados 68 clones, obtidos a partir de culturas de PA14 coletadas na DO_{600nm} 1.0. Estes clones mostraram sete transcritos com inícios de transcrição localizados nas posições: -8 (13/68 clones), -15 (5/68 clones), -101 (5/68 clones), -208 (16/68 clones), -294 (19/68 clones), -316 (4/68 clones) e -440 (3/68 clones) (Fig. 46). Nenhum destes inícios pode ser indubitavelmente correspondente às bandas encontradas no primer extension.

A presença de diversos transcritos para o gene *rnhA* sugere que este gene deve ser alvo de uma regulação complexa ou que a presença indica que seu mRNA sofre algum tipo de processamento ou degradação a partir da extremidade 5', ou ainda que existem estruturas secundárias que ocasionam artefatos nos ensaios. A regulação da transcrição e tradução de *rnhA* talvez dê pela regulação deste processamento do mRNA. Este resultado ainda confirma que a deleção do gene *kerV* prejudica a expressão de *rnhA*, como já mostrado anteriormente, já que muitos das regiões do DNA correspondentes a esses inícios de transcrição são perdidos com a deleção.

Figura 45 -Inícios de transcrição de *rnhA* mapeados através de primer extension. Pode-se notar a presença de diversas bandas com intensidades variáveis. A banda com maior intensidade é a de número 9, porém seu início não pode ser determinado devido à baixa resolução do gel nesta região. Destacado em amarelo, predições de putativas regiões -10 conservadas de ligação da RNA polimerase obtidas pelo programa Virtual Footprint (<http://prodoric.tu-bs.de/vfp/>).

Figura46 - Inícios de transcrição de *rnhA* mapeados através do sequenciamento dos clones obtidos por 5'-RACE. Foram sequenciados 68 clones que permitiram localizar sete inícios de transcrição. Os inícios que obtiveram um maior número de clones foram os das posições -208 e -294, com 16/68 e 19/68 clones, respectivamente. Destacado em amarelo, predições de putativas regiões -10 conservadas de ligação da RNA polimerase obtidas pelo programa Virtual Footprint (<http://prodoric.tu-bs.de/vfp/>).

4.12.3-*dnaQ* :

Para *dnaQ* não foram encontrados inícios de transcrição por 'primer extension'. Os resultados encontrados se basearam somente pela análise de clones obtidos por 5'-RACE.

A análise dos produtos da segunda reação de PCR visualizados nos géis de agarose nos permite observar que existem diferenças entre as linhagens PA14 e D12 (Fig. 47). Comparando-se os dados obtidos a partir de culturas de PA14 e D12 coletadas em DO_{600nm}-1.0, é observada somente uma banda abaixo de 100 pb quando o RNA foi extraído de PA14, enquanto são observadas duas bandas, uma de aproximadamente 400 pb e outra um pouco maior que de 500 pb, quando o molde de RNA veio de D12.

Foram sequenciados 12 clones obtidos a partir de PA14 e 54 obtidos de D12. Como já comentado, os resultados mostraram diferentes inícios de transcrição para cada linhagem. Para PA14, duas sequências estão localizadas na posição -9 e 10 sequências localizadas na posição -19 a partir do início de tradução (Fig.47). Não foram encontrados consensos de regiões -10 de ligação da RNA polimerase para estes inícios. Para a linhagem D12, dos 54 clones sequenciados, 43 transcritos apresentam seu início na posição -295 (Fig. 47) (que pode corresponder à banda de aproximadamente 300 pb) e 11 transcritos apresentam seu início na posição -486 (banda de aproximadamente 500 pb) do início de tradução.

A presença de diferentes transcritos obtidos para *dnaQ* em PA14 e D12 sugere que a deleção de parte da região codificante do gene *kerV* tem impacto nesta mudança observada. Este resultado não era esperado, já que *dnaQ* apresenta sua região promotora fora da deleção encontrada na linhagem D12, sugerindo que o produto de *kerV* pode agir sobre a transcrição de *dnaQ*. Estes dados reforçam o papel da proteína KerV na transcrição dos genes *rnhA* e *dnaQ*.

Figura47 - Inícios de transcrição do gene *dnaQ* determinados através do sequenciamento dos clones obtidos por 5'- RACE. Foram sequenciados 12 clones derivados da linhagem PA14 e 54 clones derivados da linhagem D12. Foram observadas diferenças entre transcritos encontrados na linhagem PA14 e na linhagem D12. Destacado em amarelo, predições de putativas regiões -10 conservadas de ligação da RNA polimerase obtidas pelo programa Virtual Footprint (<http://prodoric.tu-bs.de/vfp/>).

4.13- Ensaios de complementação:

4.13.1- Ensaios de complementação funcional:

Os ensaios iniciais de complementação através da super-expressão de KerV no vetor pUCp18 não se mostraram adequadas, já que a transformação com o próprio vetor sem inserto já alterava uma série de fenótipos, como a formação de biofilme, motilidade do tipo 'swarming' e a própria virulência. Assim, a maneira mais direta de fazer a complementação seria repor como cópia única o gene *kerV* na linhagem D12, o que foi feito por An *et al.*, 2009. Esta reversão ao genótipo selvagem mostrou que a linhagem D12 apresentou novamente o fenótipo selvagem através de ensaios 'in vitro' e 'in vivo' (An *et al.*, 2009). Isso confirmou a ausência de mutações secundárias, porém não esclareceu se o resgate do fenótipo selvagem era exclusivamente devido à proteína KerV, já que ensaios anteriores

mostraram que a deleção de *kerV* parece perturbar a expressão dos genes adjacentes *rnhA* e *dnaQ* e esses efeitos não podiam ser descartados como polares. Por isso, a fim de dissecar a contribuição de cada um desses genes para as características verificadas no mutante D12, foram feitas construções com diferentes combinações dos genes presentes no lócus para verificar se a restauração dos níveis de DnaQ ou dos níveis de mRNA de *rnhA* (afetados na linhagem D12) poderiam recuperar alguns fenótipos selvagens.

Deste modo, as regiões correspondentes aos genes *kerV*, *rnhA* e *dnaQ* com suas respectivas regiões promotoras e a combinação *kerV*, *rnhA* e *dnaQ* foram integrados em cópia única no sítio *ctx* do cromossomo da linhagem D12 (Fig. 48). Os níveis dos transcritos de *kerV*, *rnhA* e *dnaQ* foram monitorados por qRT-PCR e os níveis de DnaQ verificados por Western blot nas linhagens DM02, DM04, DM06, DM08 e DM10. Como podemos observar na figura 49, os níveis relativos dos mRNAs de cada gene e os níveis de DnaQ foram restaurados dependendo da construção integrada.. Pode-se observar também que a presença de *kerV* no sítio *ctx* não foi suficiente para restaurar os níveis de DnaQ, confirmando o que já foi observado nos ensaios de atividade promotora quando se superexpressa KerV. Após essa análise inicial, estas novas linhagens foram caracterizadas a fim de dissecar a importância de KerV no fenótipo observado na linhagem D12 e a possível contribuição dos genes *rnhA* e *dnaQ*.

Nome da linhagem

Figura 48 - Mapa das construções pDM016, pDM018, pDM019, pDM020, pDM021 e pDM022. Estas construções foram integradas no sítio *ctx* da linhagem D12, originando as linhagens DM08, DM02, DM04, DM06, DM10 e DM12. Estas linhagens foram usadas para os testes de complementação

Figura 49 - Verificação dos níveis de mRNA de *kerV*, *rnhA* e *dnaQ* e da proteína DnaQ nas linhagens PA14, D12 e derivadas de D12. Os gráficos mostram os níveis de mRNA relativos, determinados por qRT-PCR, de *kerV* (A), *rnhA* (B) e *dnaQ* (C). Os níveis da proteína DnaQ (pontas de seta) em culturas coletadas na DO_{600nm} 0.5 e 1.5 foram determinados por Western blot (D). Somente as linhagens que carregam uma cópia extra do gene *dnaQ* apresentam sua expressão semelhante a selvagem. Uma banda inespecífica de alto peso molecular funcionou como padrão da quantidade de proteína em cada canaleta.

A linhagem D12 apresenta virulência atenuada no modelo de infecção em pulmão de camundongo, mas não no modelo mais rotineiramente utilizado para a averiguação da virulência de derivados de PA14 em modelo mamífero, que é o modelo de queimadura (An *et al.*, 2009). No modelo de queimadura, as bactérias são inoculadas na musculatura sob a queimadura, podendo utilizar o tecido morto como fonte de nutrientes e disseminando-se no organismo, causando sepse e abscessos em diferentes órgãos, como fígado e rins. Nesse modelo, PA14 inibe a migração de células do sistema imune para a área infectada, por um mecanismo ainda não totalmente entendido, mas que depende da integridade do sistema de quorum sensing, especialmente de PQS e HHQ (Déziel, *et al.*, 2005). Já no modelo de pneumonia, a bactéria coloniza os espaços alveolares e causa hemorragia. Neste modelo

também é elicitada uma forte resposta imune com uma intensa produção de IL-8 e recrutamento de um massivo infiltrado de células de defesa (Tang, *et al.*, 1995)

Para este ensaio de complementação funcional, foi usado o modelo de infecção em células humanas de epitélio de pulmão. A infecção por PA14 parece inibir a translocação de NF- κ B e, como um dos efeitos dessa inibição, a produção de IL-8 também é diminuída (A. Bandyopadhyaya e L. G. Rahme, comunicação pessoal). De fato, quando se analisa a translocação de NF- κ B e a produção de IL-8 por células A549 infectadas pela linhagem D12, observa-se que não ocorre a inibição dessa translocação resultando em níveis mais elevados da produção de IL-8. Portanto, este dado sugere que de alguma maneira o produto de *kerV* pode estar direta ou indiretamente relacionado à inibição da translocação de NF- κ B (A. Bandyopadhyaya e L. G. Rahme, comunicação pessoal) e a partir destes fatos que estes ensaios de complementação foram realizados.

A produção de IL-8 foi maior a partir das células infectadas com a linhagem D12 em comparação a PA14, como esperado. As culturas infectadas com as linhagens derivadas de D12 contendo apenas o gene *kerV* no sítio *ctx* (DM02), ou em combinação com *rnhA* ou *rnhA/dnaQ* (DM12 e DM08), secretaram níveis de IL-8 semelhantes às culturas incubadas com PA14 (figura 50 A). A presença de apenas *rnhA* (DM04) ou apenas *dnaQ* (DM06) no *ctx* da linhagem D12 não foi suficiente para o resgate do fenótipo de inibição da secreção de IL-8. Entretanto, quando *rnhA* e *dnaQ* estão presentes em conjunto no sítio *ctx* (DM10), a secreção de IL-8 pelas células infectadas também é inibida, mesmo na ausência de *kerV*.

Esse conjunto de dados indica um papel de *kerV* ou seu produto na inibição da resposta imune por células epiteliais de pulmão, pois este gene por si só é capaz de reverter o fenótipo mutante de D12. Já a reversão do fenótipo da linhagem DM10 parece ser mais um indicativo de que os três genes estão envolvidos numa mesma via, visto que a ausência de *kerV* nesta linhagem parece ser compensada pela presença em conjunto de *rnhA* e *dnaQ* num segundo locus no cromossomo de D12.

A translocação das subunidades de NF- κ B para o núcleo das células infectadas é um importante marcador para a ativação da resposta imune inata, visto que isso só ocorre quando há uma cascata de fosforilação iniciada pela detecção do patógeno, culminando com a liberação de NF- κ B de seu inibidor I κ B. O fator de transcrição p65 é uma das subunidades

de NFkB que pode ser fosforilada, sendo um dos marcadores para a regulação e translocação de NFkB para o núcleo (Reber *et al.*, 2008). A infecção por PA14 inibe essa translocação, silenciando a resposta do hospedeiro (Fig.50 B). Já células infectadas por D12 apresentam p65 fosforilado, mostrando que a atenuação da virulência desta linhagem se deve a uma eficiente resposta imune do hospedeiro. Nos ensaios com células A549 em cultura, os resultados mostraram que todas as linhagens derivadas de D12 que contêm uma cópia de *kerV* em *ctx* (DM02, DM08 e DM12) elicitam nas células hospedeiras o mesmo efeito (no caso, uma diminuição da resposta) que a linhagem selvagem PA14 (Fig.50 B). A presença de apenas *rnhA* ou *rnhA/dnaQ* não causa essa inibição, apesar dos níveis de IL-8 secretados pelas células retornarem aos mesmo que com a infecção por PA14. Analisando os dois ensaios em paralelo, é possível concluir que *kerV* é suficiente para a reversão do fenótipo mutante de D12 no modelo de células A549, corroborando que KerV tem função na virulência de PA14.

A retomada da inibição da secreção de IL-8 pelas culturas infectadas com as linhagens DM04 e DM10, mesmo com a inibição da translocação de NF-kB para o núcleo nas células infectadas com essas linhagens sugerem que o mecanismo de secreção de IL-8 neste caso seja independente da ação de (NF-kB ou de p.p65)

Figura 50 - Ensaio de complementação funcional, verificados pela produção de IL-8 e translocação de NF- κ B por células de epitélio de pulmão A549.**A.** Quantificação da produção de IL-8 em linhagens de células humanas de epitélio de pulmão A549, infectadas durante 3 horas com células de linhagens de PA14 numa MOI (multiplicidade de infecção) de 100. **B.** Monitoramento da ativação de NF- κ B em linhagens de células humanas de epitélio de pulmão A549, infectadas durante 30 minutos com células de linhagens de PA14 numa MOI de 100. A fosforilação da subunidade p65 indica a translocação de NF- κ B para o núcleo da célula. Os níveis de β -actina serviram como padrão da quantidade de proteína aplicada em cada canaleta.

4.13.2- Ensaio em *Drosophila*:

Nos ensaios de complementação funcional usando o modelo de 'feeding' em *Drosophila*, as linhagens DM06 (apenas *dnaQ* no sítio *ctx*) e DM08 (*kerV*, *rnhA* e *dnaQ*) foram capazes de resgatar o fenótipo selvagem e a linhagem DM04 (*rnhA*) se assemelha à linhagem D12. As linhagens DM02 (*kerV*) e DM10 (*rnhA* e *dnaQ*) apresentam um resgate parcial da virulência. A conclusão deste resultado é que a complementação dos níveis de DnaQ seria

suficiente para o resgate do fenótipo selvagem. *kerV* parece ter um papel intermediário nessa recuperação e *rnhA* somente parece ter um efeito aditivo em relação *akerV* (Fig.51 A).

Nos ensaios de ‘pricking’, a linhagem DM08, carregando os três genes (*kerV*, *rnhA* e *dnaQ*) no sítio *ctx*, apresentou fenótipo mais semelhante ao selvagem. A presença de apenas *kerV* (DM02) diminui o tempo decorrido até o início da mortalidade, mas ainda apresenta um padrão semelhante a D12. A complementação com *rnhA* (DM04), *dnaQ* (DM06) ou ambos (DM10) levou a curvas de sobrevivência com cinética intermediária entre D12 e PA14, confirmando que *kerV* é necessário, mas não suficiente, para a complementação de D12 (Fig.51 B).

Os dois modelos de infecção têm implicações diretas nos resultados observados. Enquanto o ‘feeding’ é considerado um modelo de infecção crônica, de longo prazo (o tempo para ocorrer à morte é de aproximadamente 15 dias), o ‘pricking’ é considerado um modelo de infecção aguda (tempo para ocorrer a morte é em torno de 36 horas) (Lutter *et al.*, 2008). No modelo de ‘feeding’ a bactéria precisa ser capaz de atravessar a barreira intestinal e isto parece retardar o desenvolvimento da infecção. No ‘pricking’ a bactéria é inoculada diretamente no músculo do tórax onde devido a injúria, a infecção ocorre mais rapidamente. Embora nos dois modelos a bactéria tenha que enfrentar a resposta imune inata da *Drosophila*, a diferença principal ocorre na maneira em que a bactéria é apresentada e o quão forte será a resposta imune do hospedeiro. Deste modo, deve haver a ativação de vias específicas na bactéria para enfrentar a resposta imune do hospedeiro diferentemente em cada caso. Isto poderia explicar as diferenças observadas nos ensaios de complementação funcional usando as linhagens derivadas de D12.

A.

B.

Figura 51 -Ensaio de complementação funcional verificados pela infecção no modelo de *Drosophila*. Estes ensaios foram monitorados através do uso de dois modelos diferentes de infecção em *Drosophila*; o 'feeding' e o 'pricking'. Os genes *kerV*, *rnhA* e *dnaQ* parecem complementar diferentemente a virulência em moscas.

4.13.2- Ensaios de 'twitching':

O 'twitching' é um tipo de motilidade presente em alguns gêneros de bactérias que é independente de flagelo e é caracterizado pelo uso de uma fímbria do tipo IV. Este tipo de motilidade é caracterizado por movimentos de expansão e retração desta fímbria, que fica aderida à superfície. São descritas pelo menos 11 proteínas responsáveis pela montagem e estrutura desta fímbria em *P. aeruginosa* (Mattick, 2002).

Os ensaios mostraram que a D12 apresenta uma formação de halo de twitching defectiva, parecendo haver uma menor capacidade de aderência das células. De fato, a análise da expressão alguns dos genes responsáveis pela montagem e estrutura deste tipo de motilidade no microarranjo (resultados não publicados de Rahme *et al*) mostra que os genes *pilT* e *pilU* (essenciais para retração da fímbria), *pilB* (essencial para expansão da fímbria) (Chiang *et al.*, 2008) e *pilQ* (gene estrutural que auxilia a extrusão da fímbria) apresentam sua expressão pelo menos duas vezes reduzida na linhagem D12. Curiosamente, a formação de biofilme por D12 não é diferente de PA14 (não mostrado).

Este ensaio foi também usado para avaliar a capacidade de complementação do fenótipo da linhagem D12. Foi mostrado que o resgate da aderência das células ocorre somente nas linhagens DM06, DM08 e DM10 (Fig.52). As linhagens DM02, DM04 e DM12 não conseguem resgatar o fenótipo selvagem (Fig.52). Como a presença de uma cópia a mais do gene *dnaQ* nas linhagens DM06, DM08 e DM10 foi suficiente para o resgate do fenótipo selvagem, conclui-se que este fenótipo parece depender dos níveis selvagens desta proteína e não está diretamente relacionado a *kerV*.

Figura 52 - Ensaio de complementação funcional, verificado através do ensaio de motilidade do tipo ‘twitching’. As linhagens foram crescidas por 16 horas em meio LB e em seguida, com auxílio de um palito de madeira embebido nesta cultura, as células foram inoculadas no centro da superfície de plástico da placa que continha o meio LB 1 % (o palito deve atravessar a camada do meio sólido). As placas foram incubadas durante 24 horas em estufa 37 °C e em seguida a formação da colônia na superfície de plástico da placa foi corada com solução de cristal violeta para que fosse visualizada. Este ensaio foi feito em triplicatas biológicas. As fotos são representativas do resultado obtido.

4.13.3- Produção de piocianina:

Piocianina é um pigmento de coloração azulada, pertencente à classe das fenazinas, que é produzido pela maioria das linhagens de *P. aeruginosa*. Por possuir uma proeminente atividade antibiótica e redox apresenta um papel importante tanto para virulência quanto para a própria fisiologia da célula (Price-Whelan *et al.*, 2007 e Hassan e Fridovich, 1980). Conforme já mostrado, a linhagem D12 apresenta uma maior produção deste composto (Fig. 5B da introdução). A análise da expressão dos principais genes responsáveis pela sua biossíntese, parte dos operons *pzhA-G1* e *pzhA-G2*, por microarranjos (resultados não publicados de Rahme *et al*) mostraram que alguns genes, estão de fato com sua expressão aumentada, confirmando o fenótipo observado. Uma análise proteômica também mostrou o aumento de PhzG, um dos produtos do operon (Déziel, comunicação pessoal).

Os resultados dos ensaios de complementação da produção de piocianina pelas linhagens que carregam cópias extras dos genes *kerV*, *rnhA* e *dnaQ* mostraram que apenas quando o locus inteiro é re-inserido no cromossomo de D12, os níveis de piocianina se aproximam aos valores apresentados pela linhagem selvagem (figura 53 E). A presença de *kerV* (Fig. 53 B), *rnhA* (Fig. 53 C) ou *dnaQ* (Fig. 53 D) sozinhos em D12 não foram suficientes para restaurar os níveis selvagens de produção de piocianina. Portanto, para este fenótipo é

necessário haver a correta coordenação da regulação dos três genes para que os níveis de piocianina se igualem ao da linhagem selvagem.

Figura 53 - Produção de piocianina por PA14, D12 e derivadas. A. Níveis de piocianina medidos em culturas das linhagens PA14 e D12. B. Níveis de piocianina medidos em culturas das linhagens DM01 e DM02. C. Níveis de piocianina medidos em culturas das linhagens DM03 e DM04. D. Níveis de piocianina medidos em culturas das linhagens DM05 e DM06. E. Níveis de piocianina medidos em culturas das linhagens DM05 e DM06. As culturas foram crescidas em meio LB+Tet até uma DO_{600nm} 3 e a piocianina foi extraída conforme protocolo descrito em Essar *et al.*, 1990. Os resultados mostrados representam dados obtidos a partir de duas réplicas biológicas.

4.14- Ensaios de ativação da expressão do gene *kerV*:

Tem sido observado que vários genes envolvidos com a patogenicidade em PA14 são apenas expressos pelas bactérias durante o processo de colonização e infecção do hospedeiro (profa. L. G. Rahme, resultados não publicados). Como já comentado neste

relatório, a função de *kerV* e seu produto é importante em certos modelos de infecção (An *et al.*, 2009). Isso pode indicar que sua expressão em níveis mais altos dependa de condições específicas de um determinado hospedeiro ou de um microambiente específico deste.

Quando células de PA14 coletadas de culturas em LB em fase exponencial de crescimento ($DO_{600nm}1.0$) são incubadas com células de epitélio de pulmão, os níveis de mRNA de *kerV* não sofreram alteração em relação ao controle (figura 54 A). Entretanto, quando as células de PA14 foram coletadas no final da fase exponencial de crescimento ($DO_{600nm}2.5$) e incubadas por quatro horas na presença de células A549, os níveis de mRNA de *kerV* foram aumentados em 2,5 x em relação ao controle em meio DMEM (figura 54 B). O estado fisiológico das bactérias é importante para o estabelecimento de uma infecção, sendo que a padronização dos ensaios de virulência em diferentes hospedeiros é um ponto crítico para o sucesso dos ensaios (Cao *et al.*, 2001). Os ensaios de virulência geralmente são feitos com culturas de bactérias em que as vias de percepção de quorum já estão ativadas, o que acontece no final da fase exponencial de crescimento, correspondendo a DO_{600nm} entre 2 e 3. Portanto, a expressão de *kerV* tanto em culturas puras quanto em conjunto com células eucariotas está coordenada com processos importantes para a infecção.

Células provenientes de culturas de PA14 em LB coletadas na $DO_{600nm}1.0$ podem ser incubadas por mais tempo com as células A549, pois são menos agressivas quando comparado ao mesmo número de bactérias coletadas na $DO_{600nm}2.5$, são capazes de lisar completamente as células A549 já com 4 horas de incubação. O crescimento das culturas de PA14 incubadas com A549 comparado a PA14 incubadas somente com meio de cultura é cerca de cinco vezes maior (tabela 7), indicando que a presença das células epiteliais parecem estimular o crescimento das células de PA14, provavelmente pela maior disponibilidade de nutrientes liberados pela lise dessas células.

Tabela 7 – Crescimento de células de PA14 durante a infecção em células de A549.

Crescimento de PA14 (x 10⁸ células/mL)		
	tempo de incubação	
	0h	4 h
PA14 em DMEM (controle)	2,6 (± 0,577)	5,2 (± 1,323)
PA14 com células A549	2,6 (± 0,577)	26,8 (± 7,858)

Este conjunto de dados mostra que a expressão de *kerV* é induzida na presença das células do hospedeiro, contribuindo para a severidade da infecção neste modelo. Culturas de PA14 no final da fase exponencial de crescimento expressam vários genes de percepção de quorum, o que pode indicar que esses sistemas estão de alguma forma envolvidos com a ativação da expressão de *kerV*, como mostram resultados de nosso laboratório (R. Baldini e A. P. B. Nascimento, dados não publicados).

Figura 54 - Ensaios de infecção em células A549 mostrando a ativação da expressão do gene *kerV*. Os níveis de mRNA do gene *kerV* foram quantificados e comparados aos níveis de células de PA14 incubadas somente com meio de cultura de células de A549. A. Células de PA14 coletadas na DO_{600nm} 1.0 foram incubadas durante 3 e 6 horas com células de A549. B. Células de PA14 coletadas na DO_{600nm} 2.5 incubadas durante 4 horas com células de A549. Nesta figura é apresentado o resultado de três réplicas biológicas dos experimentos feitos com as células coletadas na DO_{600nm} de 2.5 .

4.15- Considerações finais:

4.15.1- Caracterização de KerV:

Foram feitas várias tentativas de expressar KerV de maneira solúvel para que sua função fosse determinada. Infelizmente, os esforços concentrados para este fim não foram suficientes para alcançar este objetivo. KerV somente se apresentou pouco solúvel quando expressa a baixas temperaturas ou quando co-expressa com chaperoninas. Também foi observado que durante a etapa de purificação grande parte da proteína solúvel não se ligava a resina, isto era um indicativo de que KerV, mesmo solúvel, poderia estar formando pequenos agregados que esconderiam o tag de afinidade. Além disso, após a purificação houve a co-purificação com chaperoninas, mesmo quando não havia a superexpressão destas. Este fato mais uma vez indicou que KerV apresentava um mau enovelamento, ou seja, não apresentava sua conformação nativa e portanto, as chances de apresentar atividade eram pequenas. Isso também pode ser um indício de que KerV precise se ligar a outras moléculas, sejam elas outras proteínas formando um complexo, ou a possíveis substratos, para atingir sua conformação nativa com atividade.

Os resultados dos modelamentos feitos por bioinformática sugerem que KerV pode assumir uma topologia do tipo 'Rossmann fold' e uma arquitetura do tipo folha β aberta (α/β sandwich), um enovelamento característico da maioria das metiltransferases dependentes de SAM com estrutura conhecida. Porém a falta de evidências experimentais (resultados negativos dos experimentos de ligação a SAM) para corroborar os dados das análises *in silico* não permitiram chegar a uma conclusão definitiva. Deste modo existe a possibilidade de KerV não se tratar de uma metiltransferase. Existem vários relatos na literatura de proteínas que assumem este tipo de enovelamento, mas não possuem atividade de metiltransferase (Kozbial e Mushegian, 2005 e Martin e McMillan, 2002).

Outro fato que deve ser mencionado é que dificilmente, pelas características apresentadas pelo modelo gerado, poderia se especular sobre uma possível função para KerV, visto que mesmo as metiltransferases que serviram de molde para o modelamento também não apresentam função conhecida.

Na tentativa de desvendar sua função, sabendo que KerV poderia estar em um estado não completamente enovelado, foram feitos alguns ensaios de atividade de metiltransferase utilizando MBP-KerV (a melhor condição de expressão e purificação alcançada). Para estes ensaios usou-se um kit comercial (Methyltransferase Colorimetric Assay – Cayman Chemical) para testar possíveis substratos de metilação como DNA, RNA total e algumas proteínas purificadas (RnhA e DnaQ), porém os resultados novamente foram negativos. Por isso, em uma nova tentativa de inferir a função de KerV, foram desenhados experimentos para determinar o estado de metilação do DNA, RNA e proteína comparando-se a linhagem selvagem com a linhagem mutante.

Nossa hipótese inicial se baseou na idéia de que KerV poderia participar do sistema do tipo ‘mismatch repair’ em *P. aeruginosa*, metilando o DNA. O fato do mutante D12 apresentar um fenótipo pleiotrópico, onde vários genes possuem sua expressão alterada e a ausência de genes homólogos a *dam* anotados no genoma de PA14 suportariam a hipótese de que KerV poderia estar exercendo esta função. Mutantes para o gene *dam* em outras bactérias também apresentam um fenótipo pleiotrópico e virulência atenuada com a expressão de vários genes alterada (Casadesus e Low, 2006, Oshima *et al.*, 2002).

A ausência de metilação das sequências GATC, substrato de Dam, verificadas por digestão com enzimas de restrição sensíveis a metilação, mostrou que KerV não metila esta sequência. Os dados obtidos a partir da análise da frequência de mutação também mostraram uma frequência de mutação incompatível com o esperado para mutantes de genes sabidamente envolvidos na via de reparo, como *mutL* e *mutS*.

Ensaio de interação proteína-proteína de KerV com os produtos do locus, RnhA e DnaQ, foram verificados por duplo-híbrido e experimentos de pull-down (dados não mostrados). Embora nenhuma evidência de interação tenha sido detectada é sabido que os experimentos de duplo-híbrido são limitados, pois como os domínios de ativação e ligação ao DNA são clonados na posição N-terminal das proteínas candidatas a serem testadas, interações nesta porção poderiam ser prejudicadas. Além disso, não existem garantias do correto enovelamento da proteína no núcleo da levedura. Foram realizados também alguns experimentos de pull down com MBP-KerV que não mostraram evidências de interação (dados não apresentados) e tentativas de imunoprecipitar KerV, usando os soros anti-DnaQ e

anti-RnhA, na esperança de que se interagissem (KerV com RnhA ou KerV com DnaQ) houvesse um enriquecimento de KerV que possibilitasse sua detecção (dados não apresentados). Só para esclarecer um ponto importante: o soro produzido para reconhecer KerV não foi capaz de detectá-la em extratos totais da linhagem PA14, apesar de haver detecção quando acontece a superexpressão de KerV a partir de um plasmídeo multicópia (não mostrado). Também é válido ressaltar que estes resultados de interação entre os produtos do locus, embora tenham sido negativos, não excluem a possibilidade dos genes estarem participando de uma mesma via.

Ainda sobre os resultados de duplo-híbrido é importante comentar que KerV parece não formar dímeros ou oligômeros de ordem maior. Algumas metiltransferases podem apresentar-se anotadas no PBD como monômeros, dímeros, trímeros ou até tetrâmeros, embora não haja evidências experimentais que assumam este tipo de agrupamento em solução.

Na tentativa de mostrar que KerV pode atuar na metilação do DNA, foram realizados ensaios de digestão do DNA genômico extraído das linhagens PA14 e D12 com enzimas de restrição sensíveis a metilação. Foram usadas 27 enzimas de restrição com diferentes especificidades e sensibilidades a metilação e em nenhuma dessas reações foi observado diferenças no padrão de digestão do DNA entre as linhagens. Este resultado não é conclusivo, pois seria impossível encontrar enzimas de restrição sensíveis a metilação para todas as sequências possíveis de DNA.

Outro método, também usado para tentar verificar o estado de metilação do DNA, baseou-se em diferenças na intensidade dos picos obtidos de cromatogramas do sequenciamento pelo método de Sanger (dados não mostrados) (Bachoti e Buckler-White, 1998 e Broadbent *et al.*, 2007). Porém a dificuldade de fazer o sequenciamento diretamente a partir do genoma de *P. aeruginosa*, embora descrito por Hoffman *et al.*, 2000, não foi possível após diversas tentativas de otimização da reação de sequência.

Em outra abordagem, foi usado o método de bissulfito de sódio para detectar modificações do tipo m⁵-C na região correspondente a origem de replicação de PA14. Esta região foi escolhida, pois é sabidamente alvo de regulação através de metilação do DNA, em *E. coli* e em *C. crescentus*, pelas enzimas Dam e CcrM, respectivamente (Zweiger *et al.*, 1994).

Ambas as metiltransferases são capazes de reconhecer e metilar a posição N6 do resíduo de adenina na sequência GATC (*E. coli*) ou GANTC (*C. crescentus*). Como os resultados anteriores já mostraram que KerV não estava envolvida na metilação deste resíduo de adenina, tentou-se encontrar, com este ensaio, uma metilação na posição C5 de algum resíduo de citosina desta região. Os resultados dos ensaios mostraram que parece não existir este tipo de modificação na região do DNA que corresponde à origem de replicação do cromossomo de PA14. A ausência de marcação com ^3H -SAM no DNA de *P. aeruginosa* confirma esse dado e expande seu significado para toda a extensão do cromossomo. De certa forma, estes dados estão de acordo com a literatura atual, já que até o presente momento não existem relatos que mostrem ou sugiram a presença de metilação no DNA de *P. aeruginosa*.

Na tentativa de verificar a existência de outros alvos de metilação, também foi analisado o estado de metilação de proteínas e rRNAs de PA14 e D12. Os ensaios realizados, apesar de mostrarem a presença tanto de rRNAs quanto de proteínas metiladas, não foram capazes de revelar diferenças entre as linhagens que pudessem ser atribuídas a KerV. Para os rRNAs, surpreendentemente foi observado que na ausência de KerV, parece haver uma menor intensidade na marcação total destes rRNAs, indicando que KerV parece exercer impacto em sua metilação. Curiosamente, as análises dos dados de microarray mostram a diminuição da expressão de quase todas as metiltransferases envolvidas na metilação de rRNAs (tabela 6). Em relação ao estado de metilação de proteínas, não foi possível ter uma inibição total da síntese de proteínas nas condições experimentais utilizadas, não permitindo que diferenças sutis entre as linhagens pudessem ser observadas.

4.15.2- Organização do lócus:

Como já exposto, os genes *kerV*, *rnhA* e *dnaQ* estão localizados continuamente no cromossomo, sendo a região promotora de *rnhA* localizada no interior da região codificadora de *kerV* e o mesmo ocorrendo para *dnaQ*, com sua região promotora parcialmente sobreposta a região codificante de *rnhA* (Fig.55). A anotação destes genes no *Pseudomonas genome database*(www.pseudomonas.com) sugere que eles façam parte de um operon. Porém, esta é apenas uma predição computacional e não há evidência experimental. A análise do transcriptoma da linhagem PA14 mostrou que o perfil de

expressão destes genes ao longo do crescimento não é paralela. Enquanto os níveis de *rnhA* e *dnaQ* parecem cair ao longo do crescimento, o oposto é observado para *kerV* (An *et al.*, 2009). Os dados das fusões de transcrição e os ensaios para a determinação dos inícios de transcrição destes genes, apresentados acima, mostraram que *kerV*, *rnhA* e *dnaQ* apresentam promotores independentes. Outros experimentos realizados no nosso laboratório na tentativa de amplificar regiões compreendendo *rnhA* e *dnaQ* a partir do cDNA falharam (A. P. B. Nascimento e R.L. Baldini, dados não mostrados). Este conjunto de dados nos permite afirmar que estes genes não fazem parte de um operon constitutivamente expresso, porém não é possível excluir a possibilidade de que sob certas condições possam se comportar como tal, sendo transcritos a partir de um único promotor à frente de *kerV*.

Figura 55 - Uma visão esquemática dos locais de inícios de transcrição mapeados por 5'-RACE para os genes *kerV*, *rnhA* e *dnaQ*. O RNA total foi extraído de culturas em $DO_{600\text{ nm}}$ 1, tratados com DNase I e usados como molde para as reações de 5'-RACE. A posição dos 'nested primers' usados na última reação de amplificação estão representados por setas abaixo dos genes. Os putativos inícios de transcrição mapeados estão indicados por setas localizadas acima das linhas que representam os genes. Os números localizados acima das chaves representam o número total de clones sequenciados e os números no interior das regiões sombreadas representam o número de clones obtidos para cada início de transcrição mapeado.

Outra conclusão desses experimentos é que a deleção de *kerV* possui, de fato, um efeito polar sobre a transcrição *rnhA*. Os ensaios que determinaram os inícios de transcrição de *rnhA* mostraram a existência de vários inícios de transcrição dentro da região deletada da linhagem D12 (Fig.55). A comparação dos níveis de atividade de β -galactosidase da construção que carrega cópia íntegra da região promotora de *rnhA* com a que carrega a cópia mutada (Fig.41 A e B) mostra uma diminuição de cerca de duas vezes nos níveis de atividade promotora, indicando a importância destes inícios de transcrição na sua expressão. Um fato curioso é que a quantidade de RnhA na célula parece não ser afetada em D12, conforme foi observado nos Western blots (Fig.40 A). Deste modo, a manutenção dos níveis selvagens

desta proteína deve ser importante para a fisiologia da célula já que a diminuição da expressão de seu mRNA não afeta os níveis celulares da proteína.

Outro efeito observado a partir da deleção de *kerV* foi a diminuição nos níveis do transcrito e do produto de *dnaQ* (Fig.39 A e 40 B). Os ensaios de β -galactosidase mostraram que a atividade da região promotora de *dnaQ* é cerca de duas vezes menor na ausência de KerV, indicando que a diminuição observada nos níveis de mRNA e proteína observados anteriormente ocorrem em nível de promotor. A determinação dos inícios de transcrição de *dnaQ* mostraram que ocorre uma mudança nos inícios mapeados entre as linhagens PA14 e D12 (Fig.47). Isto sugeriu que KerV poderia estar, direta ou indiretamente, envolvido na regulação da transcrição desse gene. Se isto fosse verdade, o papel de KerV poderia ser extrapolado para os outros genes com expressão alterada nos ensaios de transcriptoma e isso explicaria o efeito pleiotrópico que esta deleção causa na fisiologia da célula. Porém, as tentativas de complementação feitas a partir de plasmídeo multicópia, mostraram que KerV, nesse caso em concentração maior que a fisiológica, não resgatou os níveis selvagens da atividade promotora de *dnaQ* na linhagem D12 (Fig. 43 A e B), sugerindo que outros mecanismos estariam envolvidos na regulação da expressão de *dnaQ*.

Vale salientar que *rnhA* e *dnaQ* são genes supostamente essenciais, uma vez que não existem mutantes para estes genes nas bibliotecas de mutantes por transposon de PA14 e PAO1 e não foi possível deletar esses genes por recombinação homóloga (Baldini, R., dados não mostrados). Ensaios '*in vivo*', onde a expressão destes genes foi monitorada durante a infecção em *Drosophila*, por qRT-PCR, mostraram que a expressão destes genes também está mais de duas vezes diminuída (Apidianakis e Rahme – comunicação pessoa), sugerindo que D12 apresenta uma deficiência na expressão destes genes também durante a infecção.

Estas últimas análises chamam a atenção para a complexidade do estudo da função de *kerV* a partir da linhagem D12. Uma saída para contornar este problema seria a construção de uma linhagem com mutações pontuais na região codificadora de *kerV* a fim de não prejudicar a expressão dos genes *rnhA* e *dnaQ*. Foram feitas tentativas de se construir uma linhagem com um códon de parada no meio da região codificadora de *kerV*. Mais de 300 clones foram analisados, porém no evento da segunda recombinação homóloga necessário para a construção do mutante, as células retornam ao genótipo selvagem. Uma

dificuldade semelhante foi encontrada na construção do mutante D12, tendo que se analisar mais de uma centena de clones para se encontrar apenas um mutante (Baldini e Rahme, comunicação pessoal). Essa dificuldade na obtenção de mutantes em *kerV*, cujo produto não é essencial à sobrevivência da célula, pode ter origem na complexa regulação da expressão de *rnhA* e *dnaQ*, já que estes são essenciais. Outro dado que fortalece esta afirmação é quando se analisa o mutante 41138, que tem o transposon *mar7* no início da região codificadora de *kerV* (Liberati *et al.*, 2006). Este mutante não apresenta virulência atenuada em modelos de infecção em *Drosophila* (Apidianakis, comunicação pessoal) e em *C. elegans* (Evans *et al.*, 2008). O sítio de inserção encontra-se a somente 96 nucleotídeos à jusante do início de tradução de *kerV*.

4.15.3- Experimentos de ‘complementação’ e infecção:

O fato de *kerV* ser importante para modelos de infecção em pulmão e não em queimadura, (An *et al.*, 2009) sugere que este gene pode ser requisitado em condições específicas que são encontradas somente quando células infectam o pulmão, por exemplo. Por isso, a ativação da expressão de *kerV* quando células PA14 são cultivadas em conjunto com células epiteliais de pulmão, aliados à não-inibição da translocação de NF-κB para o núcleo dessas células, colocam KerV em um cenário interessante. A hipótese de que seja necessária uma prévia ‘ativação’ da sua função de metiltransferase, ou mesmo que existam condições específicas para que haja uma expressão ótima podem justificar o porquê de não se conseguir detectar seu substrato de metilação nos experimentos realizados. Soma-se a isso o fato de que em todas as tentativas de se detectar KerV por Western blot, a partir de culturas ‘*in vitro*’, falharam, indicando que a proteína deve ser mantida em níveis muito baixos nas células e que talvez sua expressão realmente seja requisitada em condições específicas que não foram encontradas nos experimentos até então realizados. Outra hipótese a ser levantada em relação à função de KerV, como os resultados mostraram uma clara necessidade de KerV para inibir a translocação de NF-κB para o núcleo e sua expressão é induzida na presença da célula do hospedeiro é possível que KerV possa ser secretado e atuar agindo diretamente na célula do hospedeiro.

Também foi observado que não é possível excluir o efeito que a deleção de *kerV* possui na expressão dos genes *rnhA* e *dnaQ*, pois já foi mostrado que quando a menor

expressão destes genes é 'complementada', alguns fenótipos podem ser resgatados, dependendo da combinação de genes ou do fenômeno analisado. Por exemplo, *otwitting* e a infecção de *Drosophila* por feeding claramente mostram a dependência da manutenção dos níveis selvagens de DnaQ para o resgate do fenótipo selvagem. Como já foi comentado, DnaQ está diretamente envolvido em reparo de DNA sendo a subunidade ϵ da DNA polimerase III. Como explicar que *dnaQ* estaria envolvido?

Há alguns relatos na literatura de que DnaQ poderia participar do reparo do DNA independentemente de estar associado ao core da DNA pol III. Um estudo propõe que a diminuição dos níveis de DnaQ poderia ocasionar a presença de moléculas de DNA polimerase funcionais quanto à replicação, mas sem atividade exonucleásica e isto poderia ser uma forma de aumentar o aparecimento de mutações. De fato, a linhagem D12 apresenta um ligeiro aumento na frequência de mutação, o que pode ser consequência dos níveis mais baixos de DnaQ na ausência de KerV (Dorazi, 2003).

Ficou clara também a interrelação entre dos três genes do locus *kerV-rnhA-dnaQ*, já que sua combinação leva ao resgate do fenótipo selvagem independentemente do modelo testado. Este fato também nos leva a concluir que o fenótipo apresentado pela linhagem D12 é provavelmente a soma da ausência de KerV com a desregulação da expressão de *rnhA* e *dnaQ* (genes sabidamente essenciais) e que KerV pode agir de forma a coordenar a expressão destes genes, ou mesmo de alguma maneira ser necessário para a ativação da função de RnhA ou DnaQ, dando talvez especificidade a(s) sua(s) função(ões).

Vale acrescentar uma característica interessante sobre o locus: quando os três genes estão presentes, seu arranjo pode variar entre os gêneros de bactérias. Em algumas bactérias, como em *E. coli* K12 MG1655, uma linhagem não patogênica, por exemplo, *rnhA* e *dnaQ* são transcritos em direções opostas, enquanto *kerV* se apresenta na mesma direção de *dnaQ* (Fig. 56). Um outro dado interessante é que independentemente do arranjo que *rnhA* e *dnaQ* possam ter, a mutação em *kerV* reduz a virulência em *Yersinia pseudotuberculosis* e *Vibrio cholerae* O1 (An et al., 2009). Isto pode corroborar nossa hipótese de que o produto de *kerV* tenha participação na regulação da expressão não apenas de *rnhA* e *dnaQ*, mas também de outros genes importantes para a patogenicidade ou adaptação das bactérias a diferentes ambientes.

Figura 56 –Quando os três genes do locus *kerV-rnhA-dnaQ* estão presentes simultaneamente podem ser observadas duas diferentes configurações. O produto do gene *yafS* de *E. coli* MG1655 se refere a um ortólogo do produto do gene *kerV*, de *P. aeruginosa* PA14.

5- Conclusões:

- As análises '*in silico*' sugerem que KerV pode assumir um enovelamento característico de metiltransferases dependentes de SAM;
- A proteína recombinante His-KerV foi obtida por superexpressão e purificação a partir de *E. coli*, sendo expressa de maneira solúvel somente em baixas temperaturas quando co-expresso com chaperoninas ou quando fusionado a GST ou MBP;
- Os ensaios de atividade de metiltransferase e de ligação a SAM feitos com MBP-KerV, foram inconclusivos, já que existe a possibilidade de MBP-KerV não estar em sua forma ativa;
- KerV não está diretamente envolvida com o reparo de DNA do tipo 'mismatch repair';
- A região que corresponde ao início de replicação do cromossomo de *P. aeruginosa* não apresenta metilação do tipo 5m-citosina ou da adenosina na sequência GATC;
- O DNA de PA14 aparentemente não apresenta qualquer tipo de metilação;
- As proteínas recombinantes His-RNase HI e His-DnaQ foram obtidas por superexpressão e purificação a partir de *E. coli* e foram obtidos soros policlonais capazes de reconhecer a proteína RNaseHI e DnaQ em extratos de *P. aeruginosa*;
- Ensaios de duplo-híbrido entre KerV, RnhA e DnaQ sugerem que não há interação entre estas proteínas;
- A deleção de *kerV* causa, de fato, um efeito polar na expressão *rnhA*, que se reflete apenas em nível de seu mRNA;
- KerV é importante para a correta expressão de DnaQ, já que em todos níveis de expressão verificados, a linhagem D12 apresenta valores diminuídos de expressão quando comparado à linhagem selvagem;
- Um início de transcrição a -55 do primeiro códon de *kerV* foi encontrado, com uma sequência -10 conservada;
- Foram detectados diversos inícios de transcrição para *rnhA* e *dnaQ*;
- Para *dnaQ*, o padrão de bandas obtido nas amplificações dos ensaios de 5'RACE mostraram que os inícios de transcrição deste gene são diferentes nas linhagens PA14 e D12, apesar de não estarem nas regiões divergentes entre estas linhagens;

- Os ensaios de complementação mostraram que o fenótipo pleiotrópico da linhagem D12 se deve a relações aparentemente complexas entre os produtos dos genes *kerV*, *rnhA* e *dnaQ*:
 - KerV é essencial para a inibição da translocação de NF-κB para o núcleo das células epiteliais de pulmão
 - A inibição da secreção de IL-8 por células epiteliais pela linhagem PA14 acontece por uma via dependente de NF-κB e por outra via alternativa, não identificada neste trabalho
 - Níveis selvagens de DnaQ são necessários para a motilidade tipo “twitching” e resgate da virulência em *Drosophila* no modelo de infecção do tipo “feeding”;
 - A correta expressão dos três genes do locus *kerV-rnhA-dnaQ* são importantes para todos os fenótipos testados.
- A expressão do gene *kerV* parece ser induzida durante a infecção de células de epitélio de pulmão, confirmando sua importância nesse modelo de estudo.

6- Referências bibliográficas:

- Aktas, M. e Narberhaus, F.(2009) In Vitro Characterization of the Enzyme Properties of the Phospholipid *N*-Methyltransferase PmtA from *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 191: 2033-2041
- Alegria, M.C., Docena, C., Khater, L., Ramos, C.H., da Silva, A.C., Farah, C.S. (2004) New protein-protein interactions identified for the regulatory and structural components and substrates of the type III Secretion system of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* Pathovar *citri*. *J Bacteriol.* 186:6186-97.
- An, D., Apidianakis, Y., Boechat A. L., Baldini, R. L., Goumnerov, B. C. e Rahme, L. G. (2009) The pathogenic properties of a novel and conserved gene product, KerV, in Proteobacteria. *PLoS one* 4(9):e7167.
- Apidianakis, Y., Mindrinos, M. N., Xiao, W., Lau, G. W., Baldini, R. L., Davis, R. W. e Rahme, L.G.(2005) Profiling early infection responses: *Pseudomonas aeruginosa* eludes host defenses by suppressing antimicrobial peptide gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:2573-2578.
- Ausubel, F. M., Brent et al., Eds Current Protocols in Molecular Biology. New York: Jonh Wiley and Sonsed. 1996.
- Bachoti, S.R. e Buckler-White, A. (1998) Direct visualization of site-specific and strand-specific DNA methylation patterns in automated DNA sequencing data. *Nucleic Acids Research.* 26:2505-2507.
- Badie, G., Heithoff, D.M., Sinsheimer, R. L., Mahan, J. (2007) Altered levels of *Salmonella* DNA adenine methylase are associated with defects in gene expression, motility, flagellar synthesis and bile resistance in the pathogenic strain 14028 but not in the laboratory strain LT2 . *J. Bacteriol* **189**:1556-1564.
- Bair, C. L. e Black, L. (2007) A Type IV modification dependent restriction nuclease that targets glucosylated hydroxyl methyl cytosine modified DNAs. *J Mol Biol.* **366**: 768–778.
- Baldini, R.L., Avedissian, M. e Gomes SL.(1998) The CIRCE element and its putative repressor control cell cycle expression of the *Caulobacter crescentus* groESL operon. *J Bacteriol.* 180:1632-41.
- Bart, A., van Passel, M. W. J., van Amsterdam, K., van der Ende, A. (2005) Direct detection of methylation in genomic DNA. *Nucl Acids Res.* 33:1816-1820.

- Basturea, G.N., Rudd, K.E. e Deutscher, M.P.** (2006) Identification and characterization of RsmE, the founding member of a new RNA base methyltransferase family. *RNA* 12:426–434.
- Becher, A. e Schweizer, H. P.**(2000). Integration-proficient *Pseudomonas aeruginosa* vectors for isolation of single-copy chromosomal *lacZ* and *lux* gene fusions. *Biotechniques* 29:948–952.
- Blocker, A., Komoriya, K. e Aizawa, S** (2003) Type III secretion systems and bacterial flagella: Insights into their function from structural similarities *PNAS*100:3027-3030
- Bookout A. L. e Mangelsdorf D. J.** (2003) Quantitative real-time PCR protocol for analysis of nuclear receptor signaling pathways. *Nuclear Receptor Signaling* 1, e012.
- Brahmachari, V. e Ramakrishnan, T.** (1984) Modified bases in transfer RNA *J. Biosci* 6:757–770.
- Broadbent, S.E., Balbontin, R., Casadesus, J., Marinus, M.G. e van der Woude, M.** (2007) YhdJ, a nonessential CcrM-like DNA methyltransferase of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *J Bacteriol*189:4325-4327.
- Broek, D. van den, Bloemberg, G.V. e Lugtenberg, B.** (2005) The role of phenotypic variation in rhizosphere *Pseudomonas* bacteria. *Environ Microbiol.* 7:1686-1697.
- Cantoni GL** (1975) Biological methylation: selected aspects. *Annu Rev Biochem* 44: 435–451
- Cao, H., Baldini, R. L. e Rahme, L. G.** (2001) Common mechanisms for pathogens of plants and animals. *Annu Rev Phytopathol*39:259-284.
- Casadesús, J. e Low, D.** (2006) Epigenetic gene regulation in the bacterial world. *Microbiol Mol Biol Rev.* 70:830-856.
- Chang, F.N.** (1978) Temperature-dependent variation in the extent of methylation of ribosomal proteins L7 and L12 in *Escherichia coli* *J Bacteriol.*135:1165–1166.
- Chastre, J. e Trouillet, J.L.** (2000) Problem pathogens: *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter*. *Semin Respir Infect.* 15:287-298.
- Chen', E. and Kuo, T.** (1993) A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic. *Nucleic Acids Research* 21:2260.
- Chen, R., Brosius, J., Wittmann-Liebold, B. e Schäfer, W.** (1977) Occurrence of methylated amino acids as N-termini of proteins from *Escherichia coli* ribosomes *Journal of Molecular Biology* 111:173-181

- Chiang, P., Sampaleanu, L. M., Ayers, M., Pahuta, M., Howell, P.L. e Burrows, L.L.** (2008) Functional role of conserved residues in the characteristic secretion NTPase motifs of the *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilus motor proteins PilB, PilT and PilU. *Microbiology* 154:114-126
- Choi, K. e Schweizer, H. P.** (2006) Mini-Tn7 insertion in bacteria with single *attTn7* sites: example *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature Protocols* 1:153 - 161 (2006).
- Choi, K.-H., Kumar, A. e Schweizer, H. P.** (2006) A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: Application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *J. Microbiological Methods*. **64**:391-397.
- Chugani, S. e Greenberg, E.P.** (2007) The influence of human respiratory epithelia on *Pseudomonas aeruginosa* gene expression. *Microb Pathog* 42:29-35
- Debarbieux, L. e Beckwith, J.** (2000) On the Functional Interchangeability, Oxidant versus Reductant, of Members of the Thioredoxin Superfamily *Journal of Bacteriology* 182:723-727
- Deziel E., Lepine F., Milot S., He, J., Mindrinos, M.N., Tompkins, R.G. e Rahme, L.G.** (2004) Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:1339-1344.
- Déziel, E., Gopalan, S., Tampakaki, A.P., Lépine, F., Padfield, K.E., Saucier, M., Xiao. G., Rahme, L.G.** (2005) The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting *las*RI, *rh*RI or the production of N-acyl-L-homoserine lactones. *Mol Microbiol*. 55:998-1014.
- Dognin, M.J., Wittmann-Liebold, B.** (1980) Purification and primary structure determination of the N-terminal blocked protein, L11, from *Escherichia coli* ribosomes. *Eur J Biochem* 112: 131-151
- Dorazi, R.** (2003) Can tRNAs act as antisense RNA? The case of *mutA* and *dnaQ* *Journal of Theoretical Biology*. 225:383-388.
- Dorgan, K.M., Wooderchak, W.L., Wynn, D.P., Karschner, E.L., Alfaro, J.F. Cui, Y., Zhou, Z.S. e Hevel, J.M.** (2006) An enzyme-coupled continuous spectrophotometric assay for S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Analytical Biochemistry* 350:249-255.

Driessen, A.J.M., Fekkes, P. e Van der Wolk, J.P.W. (1998) The Sec system. *Current Opinion in Microbiology* 1:216-222

Drolet M. (2006) Growth inhibition mediated by excess negative supercoiling: the interplay between transcription elongation, R-loop formation and DNA topology. *Mol Microbiol.*59:723–730

Elowitz, M.B., Levine, A. J., Siggia, E. D. e Swain, P. S. (2002) Stochastic Gene Expression in a Single Cell. *Science*, 297:1183-1186

Essar, D. W., Eberly, L., Hadero, A., e Crawford, I. P. (1990) Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *J. Bacteriol*, **172:884-900.**

Evans, E.A., Kawli. T, Tan. M.W. (2008)*Pseudomonas aeruginosa* suppresses host immunity by activating the DAF-2 insulin-like signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Pathog.* 4:e1000175.

Fauman, E., Blumenthal, R., e Cheng, X. 1999. *Structure and evolution of AdoMet-dependent methyltransferases*, pp. 1–54. World Scientific, River Edge, NJ.

Ferguson, G. P., Tötemeyer, S., MacLean, M. J. e Booth, I. R. (1998) Methylglyoxal production in bacteria: suicide or survival? *Archives of Microbiology* 170:209-218

Fontecave M, Atta M, Mulliez E (2004) S-adenosylmethionine: nothing goes to waste. *Trends Biochem Sci* **29: 243–249**

Frangoni J.V., Neel B.G. (1993) Solubilization and purification of enzymatically active glutathione-S-transferase (GEX) fusion proteins. *Anal. Biochem*210**: 179–187.**

Gale, E. F., Cundliffe, E., Reynolds, P.E., Richmond, M.H., Muto, A. e Waring, M.J. (1981) "The molecular basis of antibiotic action." Jonh Wiley e Sons, London.

Galhardo, R.S., Rocha, R.P., Marques, M.V. e Menck, C.F. (2005) An SOS-regulated operon involved in damage-inducible mutagenesis in *Caulobacter crescentus*. *Nucleic Acids Res.* **33:2603-2614.**

Garibyan, L., Huang, T., Kim, M., Wolff, E., Nguyen, A., Nguyen, T., Diep, A., Hu, K., Iverson, A., Yang, H. e Miller, J.H. (2003) Use of the *rpoB* gene to determine the specificity of base substitution mutations on the *E. coli* chromosome. *DNA repair*, **2:593-608.**

- Genschel, J., Bazemore, L.R., Modrich, P.** (2002) Human exonuclease I is required for 5' and 3' mismatch repair. *J Biol Chem* **277**: 3302–13311
- George, R. R., Harris, R., Nunn, C. M., Cramer, R. e Djordjevic, S.** (2002) Chaperonin assisted overexpression, purification, and characterisation of human PP2A methyltransferase *Protein Expression and Purification***26**:266-274
- Glickman, B.W.** (1979) Spontaneous mutagenesis in Escherichia coli strains lacking 6-methyladenine residues in their DNA: an altered mutational spectrum in dam⁻ mutants. *Mutant Res* 61: 153–162.
- González, J. E. E. e Keshavan, N. D.** (2006) Messing with bacterial quorum sensing. *Microbiol Mol Biol Rev.***70**:859-875.
- Govan, J.R.W., Hughes, J.E., Vandamme, P.**(1996) *Burkholderia cepacia*: Medical, taxonomic and ecological issues. *Journal of Medical Microbiology.***45**:395-407.
- Gräslund.S., Nordlund. P., Weigelt. J., Hallberg. B.M., Bray. J., Gileadi. O., Knapp.S., Oppermann. U., Arrowsmith. C., Hui. R., Ming.J., et al.** (2008) Protein production and purification.*Nat Methods.* 5:135-46.
- Green, R. e Noller, H.F.** (1999) Reconstitution of functional 50S ribosomes from in vitro transcripts of Bacillus stearothermophilus 23S rRNA.*Biochemistry* 38:1772-1779.
- Gueiros-Filho F.J. e Losick R.** (2002) A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin like protein FtsZ. *Gene Dev*16:2544–2556.
- Gutiérrez, O. Juan, C., Pérez, J.L. e Oliver, A.** (2004) Lack of association between hypermutation and antibiotic resistance development in Pseudomonas aeruginosa isolates from intensive care unit patients. *Antimicrob Agents Chemother.*48:3573-3575.
- Guzzo, J., Pages, J.M., Duong, F., Lazdunski, A. e Murgier, M.** (1991) *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease: Evidence for secretion genes and study of secretion mechanism *Journal of Bacteriology* 173:5290-5297
- Hall, L. M.C. e Henderson-Begg, S. K.** (2006) Hypermutable bacteria isolated from humans – a critical analysis. *Microbiology.* 152:2505-2514.
- Hamahata, A., Takata, Y., Gomi, T. E. e Fujioka, M.** (1996) Probing the S-adenosylmethionine-binding site of rat guanidinoacetate methyltransferase. *Biochem. J.* 317:141-145.

Hassan, H.M. e Fridovich, I. (1980) Mechanism of the antibiotic action pyocyanine.*Journal of Bacteriology.* 141: 156-163.

He, J., Baldini, R. L., Déziel, E., Saucier, M., Zhang, Q., Liberati, N. T., Lee, D., Urbach, J., Goodman, H. M. e Rahme, L. G. (2004) Two pathogenicity islands harboring novel plant and animal virulence genes are carried by strain PA14 of the broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**:2530-2535.

Heurgue-Hamard, V., Champ, S., Engstrom, A., Ehrenberg, M. e Buckingham, R.H. (2002) The hemK gene in *Escherichia coli* encodes the N(5)- glutamine methyltransferase that modifies peptide release factors. *EMBO J* 21: 769–778

Hoang, T. T., Kutchma, A. J., Becher, A. eSchweizer, H. P. (2000) Integration-proficient plasmids for *Pseudomonas aeruginosa*: Site-specific integration and use for engineering of reporter and expression strains. *Plasmid.* 43:59-72.

Hoffman, L.M., Jendrisak, J.J., Meis, R.J., Goryshin, I.Y. e Reznikoff, W.S. (2000) Transposome insertional mutagenesis and direct sequencing of microbial genomes. *Genetica.* 108:19-24.

Jacobs, M.A., Alwood, A., Thaipisuttikul, I., Spencer, D., Haugen, E., Ernst, S., Will, O., Kaul, R., Raymond, C., Levy, R. Chun-Rong, L., Guenther, D., Bovee, D., Olson, M.V. e Manoil, C. (2003) Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100:14339–14344.

Jeltsch A. (2002) Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases. *Chembiochem.* 3:274-93.

Kaczanowska, M. e Rydén-Aulin, M. (2007) Ribosome Biogenesis and the Translation Process in *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, September, 71:477-494.

Kagan, R.M., Clarke, S. (1994) Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases suggests a common structure for these enzymes. *Arch Biochem Biophys.* 310:417-27.

Karlowsky, J.A., Draghi, D.C., Jones, M.E. Thornsberry, C., Friedland, I.R. e Sahm, D.F. (2003) Surveillance for antimicrobial susceptibility among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from hospitalized patients in the United States, 1998 to 2001. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **47**:1681–1688

Khaitovich, P., Tenson, T. Mankin, A.S. e Green, R (1999a) Peptidyl transferase activity catalyzed by protein-free 23S ribosomal RNA remains elusive. *RNA* 5:605-608.

- Khaitovich, P., Tenson, T., Kloss, P. e Mankin, A.S. (1999b) Reconstitution of functionally active *Thermus aquaticus* large ribosomal subunits with in vitro-transcribed rRNA.***Biochemistry* 38:1780-1788.
- Kim, K.K., Yokota, H. e Kim S.H. (1999) Four-helical-bundle structure of the cytoplasmic domain of a serine chemotaxis receptor.** *Nature*.**400**:787-792.
- Kimura, S., Suzuki, T. (2010) Fine-tuning of the ribosomal decoding center by conserved methyl-modifications in the *Escherichia coli* 16S rRNA.** *Nucleic Acids Res* 38: 1341–1352.
- Kipnis, E., T. Sawa, et al. (2006) "Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis."** *Medecine Et Maladies Infectieuses* 36:78-91.
- Kogoma, T. (1997) Stable DNA Replication: Interplay between DNA Replication, Homologous Recombination, and Transcription.***Microbiology andMolecular Biology Reviews*.**61**:212–238.
- Köhler, T., Curty, L.K., Barja, F., Van Delden, C., and Pechère, J.C. (2000) Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili.** *J Bacteriol*182: 5990–5996.
- Korostelev, A., Trakhanov, S., Laurberg, M., Noller, H.F.(2006) Crystal structure of a 70S ribosome-tRNA complex reveals functional interactions and rearrangements.** *Cell* 126:1–13
- Kozbial, P.Z. e Mushegian (2005) Natural history of S-adenosylmethionine-binding proteins** *BMC Structural Biology* 5:19
- Krzyzosiak, W., Denman, R., Nurse, K., Hellmann, W., Boublik, M., Gehrke, C.W., Agris, P.F. e Ofengand, J.(1987) In vitro synthesis of 16S ribosomal RNAcontaining single base changes and assembly into a functional 30S ribosome.** *Biochemistry*. 26:2353-2364.
- Kurachi, M, (1958) Studies on the biosynthesis of 16yocyanine. 1.On the cultural conditions for pyocyanine formation.** *Bull Inst Chem Res Kyoto Univ* 36:163-173
- Kyoung-Hee, C. e Schweizer, H.P. (2006) Mini-Tn7 insertion in bacteria with single *attTn7* sites: exemple *Pseudomonas aeruginosa*.** *Nature Protocols*.1:153161.
- Lampson B.C., Inouye, M. e Inouye, S. (2005) Retrons, msDNA, and the bacterial genome.** *Cytogenetic and Genome Research*.**110**:491-499.
- LaVallie, E.R., DiBlasio, E.A., Kovacic, S., Grant, K.L., Schendel, P.F. e McCoy, J.M. (1993). A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. colicytoplasm*.***Bio/Technol*. 11: 187-193.

- Lee, D.G., Urbach, J.M., Wu, G., et al.** (2006) Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial *Genome Biol* 7:R90.
- Lewicki, B. T. U., T. Margus, J. Remme, and K. N. Nierhaus.**(1993) Coupling of rRNA transcription and ribosomal assembly *in vivo*. *J. Mol. Biol.* 231:581-593
- Lhoest, J. e Colson, C.**(1977) Genetics of ribosomal protein methylation in *Escherichia coli* II. A mutant lacking a new type of methylated amino acid, N5-methylglutamine, in protein L3 *Molecular and General Genetics* 154:175-80
- Liberati, N.T., Urbach, J.M., Miyata, S., Lee, D.G., Drenkard, E., Wu, G., Villanueva, J., Wei, T. e Ausubel, F. M.** (2006) An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:2833-2838
- Livak, K. J. e Schmittgen, T. D.** (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ *Methods.* 25:402-408.
- Løbner-Olesen, A., Boye, E.e Marinus, M.G.** (1992) Expression of the *Escherichia coli* dam gene. *Mol Microbiol* 6: 1841–1851.
- Lutter,E. I., Faria, M. M. P., Rabin, H. R. e Storey, D. G.**(2008) *Pseudomonas aeruginosa* Cystic Fibrosis Isolates from Individual Patients Demonstrate a Range of Levels of Lethality in Two *Drosophila melanogaster* Infection Models. *Infection and Immunity* 76:1877-1888.
- Martin, J.L. e McMillan, F.M.** (2002) SAM (dependent) I AM: the S-adenosylmethionone-dependent methyltransferase fold. *Current opinion in Structural Biology.* 12:783-793.
- Mattick, J. S.**(2002) Type IV pili and twitching motility *Annu. Rev. Microbiol* 56:289-314.
- Mavrodi, D. V., Bonsall, R. F., Delaney, S. M., Soule, M. J., Phillips, G. e Thomashow, L. S.**(2001) Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* 183:6454-6465
- Mengel-Jørgensen, J., Jensen S.S., Rasmussen A., Poehlsgaard, J., Iversen, J.J. e Kirpekar, F.** (2006) Modifications in *Thermus thermophilus* 23 S Ribosomal RNA Are Centered in Regions of RNA-RNA Contact. *J. Mol. Chem.* 281:22108-22117.
- Meyer, J.M., Neely,A., Stintzi, A., Georges,C. e Holder, A.** (1996) Pyoverdine is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa* *Infect Immun.* 64:518–523.
- Miller, J. H.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Montie, T.C., Montie, D.B. (1979) Methionine transport in *Pseudomonas aeruginosa*. *Can J Microbiol.* **25**:1103-1107.

Muller M. (2002) Pyocyanin induces oxidative stress in human endothelial cells and modulates the glutathione redox cycle". *Free Radic Biol Med* **33** (11): 1527–1533.

Muller, M. (2005) Twin-arginine-specific protein export in *Escherichia coli*. *Research in Microbiology* **156**:131-136

Murphy, J. T. e Spence, K. D.(1972)Transport of S-Adenosylmethionine in *Saccharomyces cerevisiae* *J Bacteriol.* **109**: 499-504

Niewmierzycka, A. e Clarke, S. (1999) S-adenosylmethionine-dependent methylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry.* **274**:814-824.

Obritsch, M.D., Fish, D.N., MacLaren, R., Jung, R. (2004) National surveillance of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from intensive care unit patients from 1993 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother.* **48**:4606-4610.

Ogawa, T. e Okazaki, T. (1984) Function of RNaseH in DNA replication revealed by RNaseH defective mutants of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **193**:231-237.

Ohtani, N., Haruki, M., Morikawa, M. e Kanaya, S. (1999)Molecular diversities of RNases H. *J. Biosci Bioeng.* **88**:12-29.

Oliver, A., Baquero, F. e Blazquez, J. (2002) The mismatch repair system (*mutS*, *mutL* and *uvrD* genes) in *Pseudomonas aeruginosa*: molecular characterization of naturally occurring mutants. *Mol Microbiol.* **43**:1641-1650.

Oliver, A., Baquero, F. e Blazquez, J. (2002) The mismatch repair system (*mutS*, *mutL* and *uvrD* genes) in *Pseudomonas aeruginosa*: molecular characterization of naturally occurring mutants. *Mol Microbiol.* **43**:1641-1650.

Ortiz, A.R. Strauss, C.E.M e Olmea, O. (2002) MAMMOTH (matching molecular models obtained from theory): an automated method for model comparison. *Protein Sci* **11**:2606–2621.

Oshima, T., Wada, C., Kawagoe, Y., Ara, T., Maeda, M., Masuda, Y., et al.(2002) Genome-wide analysis of deoxyadenosine methyltransferase-mediated control of gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **45**: 673–695.

Ostendorf, T., Cherepanov, P., de Vries, J. e Wackernagel, W. (1999) Characterization of a dam mutant of *Serratia marcescens* and nucleotide sequence of the dam region. *J Bacteriol* 181:3880-3885.

Pahlich, S., Zakaryan, R.P. e Gehring, H. (2006) Protein arginine methylation: Cellular functions and methods of analysis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1764:1890–1903.

Parks, L. W. e Schlenk, F. (1958) The stability and hydrolysis of S-adenosyl-methionine; isolation of S-ribosylmethionine. *J. Biol. Chem.* 230: 295-305.

Peterkofsky, A., Litwack, M. e Marmor, J. (1971) Modified Bases and Transfer RNA Function. *Cancer Res* 31:675-678

Poledova, B e Sherman, F. (2007) Methylation of proteins involved in translation. *Molecular Microbiology*. 65:590-606.

Price-Whelan, A., Dietrich, L.P. e Newman, D.K. (2007) Pyocyanin alters redox homeostasis and carbon flux through central metabolic pathways in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Journal of Bacteriology* 189:6372-6381

Kelley, L.A. e Sternberg, M.J.E. (2009) Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server. *Nature Protocols* 4, 363 - 371

Puerta, E., O'Connor, M., Bujnicki, J. M. e Douthwaite, S. (2009) YgdE is the 2'-O-ribose methyltransferase RlmM specific for nucleotide C2498 in bacterial 23S rRNA. *Molecular Microbiology*. 72:1147-1158.

Rahme L.G., Tan M.W., Le L., Wong, S.M., Tompkins, R.G., Calderwood, S.B. e Ausubel, F.M. (1997) Use of model plant hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:13245-13250.

Rahme, L.G., Stevens, E.J., Wolford, S.F., Shao, J., Tompkins, R.G., Ausubel, F.M. (1995) Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science*. 268:1899-902.

Rao, B. R. e Buckler-White, A. (1998) Direct visualization of site-specific and strand-specific DNA methylation patterns in automated DNA sequencing data. *Nucleic Acids Research*. 26:2505-2507.

Rao, B. R. e Buckler-White, A. (1998) Direct visualization of site-specific and strand-specific DNA methylation patterns in automated DNA sequencing data. *Nucleic Acids Research*. 26:2505-2507.

- Ravanata, J.L., Duretz, B., Guillerb, A., Doukia, T., e Cadeta, J.** (1998) Isotope dilution high-performance liquid chromatography– electrospray tandem mass spectrometry assay for the measurement of 8-oxo-7,8-dihydro-2,9-deoxyguanosine in biological samples. *Journal of Chromatography B*, 715:349–356.
- Reber, L., Vermeulen, L., Haegeman, G., Frossard, N.** (2009) Ser276 Phosphorylation of NF- κ B p65 by MSK1 Controls SCF Expression in Inflammation. *PLoS ONE* 4(2): e4393.
- Rodrigue, A., Quentin, Y., Lazdunski, A., Méjean, V. e Foglino M.** (2000) Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many? *Trends Microbiol* 8:498-504.
- Rodríguez-Rojas, A. e Blázquez, J.** (2009) The *Pseudomonas aeruginosa* pfpl Gene Plays an Antimutator Role and Provides General Stress Protection. *J. Bacteriol.* 191:844-850.
- Romby, P., Carbon, P., Westhof, E., Ehresmann, C., Ebel, J.P., Ehresmann, B., and Giege, R.** (1987). Importance of conserved residues for the conformation of the T-loop in tRNAs. *J. Biomol. Struct.Dyn.*5:669–687
- Romling, U., Gomelsky, M. e Galperin, M. Y.** (2005) C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. *Mol Microbiol.* **57**:629-39.
- Roy, A., Kucukural, A., Zhang, Y.**(2010)I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, vol 5, 725-738.
- Sambrook, J., Russell, D.W.** (2001) *Molecular Cloning: A laboratory manual*,. 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Saunders, N.J., Moxon, E.R. e Gravenor, M.B.** (2003) Mutation rates: estimating phase variation rates when fitness differences are present and their impact on population structure. *Microbiol* **149**:485-495.
- Schauder, S. e Bassler, B.L.** (2006) The languages of bacteria. *Genes & Development*.15:1468-1480.
- Scheuermann R., Tam. S., Burgers, P.M., Lu.C. e Echols. H.** (1983) Identification of the *epsilon*-subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme as the *dnaQ* gene product: a fidelity subunit for DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA.* 80:7085-9.
- Scheuermann, R. H. e Echols, H.** (1984) A Separate Editing Exonuclease for DNA Replication: The ϵ -Subunit of *Escherichia coli* DNA Polymerase III Holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.*81: 7747-7751.

Schubert H.L., Blumenthal, R.M., Cheng. X. (2003) Many paths to methyltransfer: a chronicle of convergence. *Trends Biochem Sci.* 28:329-35.

Schweizer, H.P. (1991) Improved broad host range *lac*-based plasmid vectors for the isolation and characterization of proteins fusions in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene.* 103:87-92.

Siegmund, I. e Wagner, F. (1991). New methods for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth in mineral agar. *BioTechniques* 5:265–268.

Simon, R., Priefer, U.B. e Puhler, A. (1982) A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Biotechnology.* 1:784–791.

Som, S. e Friedman S. (1990) Direct photolabeling of the EcoRII methyltransferase with S-adenosyl-L-methionine. *The Journal of Biological Chemistry.* 265:4278-4283.

Sperandeo, P., Dehò, G. e Polissi, A. (2009) The lipopolysaccharide transport system of Gram-negative bacteria *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1791:594-602

Springer, W. R. e Koshland, D. E. (1977) Identification of a protein methyltransferase as *cheR* gene product in the bacterial sensing system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74:533-537.

Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas. A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G. K., Wu, Z., Paulsen, I. T., Reizer, J., Saier, M. H., Hancock, R. E., Lory, S. e Olson, M.V. (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature.* 406:959-64.

Studier, F. W. e Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology.* 189:113-130.

Szkopinska, A. (2000) Ubiquinone. Biosynthesis of quinone ring and its isoprenoid side chain. Intracellular localization. *Acta Biochim Pol.* 47:469-480.

Takano, K., Nakabeppu, Y., Maki, H., Horiuchi, T. e Sekiguchi M. (1986) Structure and function of *dnaQ* and *mutD* mutators of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet.* 205:9-13.

Takata, Y. e Fujioka, M. (1992) Identification of a tyrosine residue in rat guanidinoacetate methyltransferase that is photolabeled with S-adenosyl-L-methionine. *Biochemistry.* 31:4369-4374.

Tan, M.W. (2002) Cross-species infections and their analysis. *Annu Rev Microbiol*56: 539-565.

Tang, H., Kays, M. e Prince, A. (1995) Role of *Pseudomonas aeruginosa* pili in acute pulmonary infection. *Infect Immun.* 63:1278-85.

Timms, A.R., Steingrimsdottir, R, Lehmann, A.R. e Bridges, B.A. (1992) Mutant sequences in the *rpsL* gene of *Escherichia coli*B/r: Mechanistic implications for spontaneous and ultraviolet light mutagenesis. *Molecular and General Genetics.*232:86-96.

Tremblay, J., Richardson, A.-P., Lépine, F. e Déziel, E. (2007) Self-produced extracellular stimuli modulate the *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility behavior. *Environmental Microbiology.*9:2622-2630.

Tseng, T., Tyler, B. M. e Setubal J. C. (2009) Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology *BMC Microbiology* 9(Suppl 1):S2

Tucker, A. M., Winkler, H. H., Driskell, L. O. e Wood, D. O. (2003) S-Adenosylmethionine transport in *Rickettsia prowazekii*. *J. Bacteriol.* **185**:3031-3035.

Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T.A., Judson, R.S., Knight, J.R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., Qureshi-Emili, A., Li, Y., Godwin, B., Conover, D., Kalbfleisch, T., Vijayadamodar, G., Yang, M., Johnston, M., Fields, S., Rothberg, J.M. (2000) A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature.*403:623-627.

van den Broek, D., Chin-A-Woeng, T.F., Bloemberg, G.V., Lugtenberg, B.J.(2005) Molecular nature of spontaneous modifications in *gacS* which cause colony phase variation in *Pseudomonas* sp. strain PCL1171. *J Bacteriol.*187:593-600.

Van-Noort, J.M., Kraal, B., Sinjorgo, K.M.C., Persoon, N.L.M., Johannis, E.S.D.,Bosch, L. (1986) Methylation in vivo of elongation-factor EF-Tu at Lysine-56 decreases the rate of transfer RNA-dependent GTP hydrolysis. *Eur J Biochem* 160: 557–561

Vonrhein, C., Schmidt, U., Zeigler, C.A., Schweger, S., Hanukoglin, I. e Shultz G.C. (1998) Chaperone assisted refolding of authentic bovine adrenotoxin reductase in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 443:167-169

Wass, M.N. and Sternberg, M.J. (2009) Prediction of ligand binding sites using homologous structures and conservation at CASP8 *Proteins* 77:147-151

Wass, M.N., Kelley, L.A. e Sternberg, M.J. (2010) *Nucleic Acids Research* 38, W469-73

Wilson, G.G. e Murray, N.E. (1991) Restriction and Modification Systems. *Annual Review of Genetics* 25: 585-627

Xiao, G., He, J. e Rahme, L. G. (2006) Mutation analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* *mvfR* and *pqsABCDE* gene promoters demonstrates complex quorum-sensing circuitry. *Microbiology* 152:1679-1686.

Yang Zhang. Template-based modeling and free modeling by I-TASSER in CASP7. *Proteins*, vol 69 (Suppl 8), 108-117 (2007).

Yasukawa, T., Kanei-Ishii, C., Maekawa, T., Fujimoto, J., Yamamoto, T. e Ishii, S. (1995) Increase of solubility of foreign proteins in *Escherichia coli* by coproduction of the bacterial thioredoxin. *The Journal of Biological Chemistry*. 270:25328-25331.

Zweiger, G., Marczynski, G. e Shapiro, L. (1994) A *Caulobacter* DNA methyltransferase that functions only in the predivisional cell. *J Mol Biol* 235:472–485.

7- Apendice:

Tabela 8 - Resultados da busca de ortólogos a KerV por PSI-BLAST KerV como sequencia sonda na pesquisa de banco de dados não-redundantes (nr) do NCBI

Description	Max score	Total score	Query coverage	E value
hypothetical protein PA1814 [Pseudomonas aeruginosa PAO1] >ref ZP_01365164.1	297	297	100%	1E-78
hypothetical protein PSPA7_3482 [Pseudomonas aeruginosa PA7] >gb ABR82723.1	296	296	100%	2E-78
hypothetical protein PACG_00783 [Pseudomonas aeruginosa C3719] >gb EAZ52350.1	295	295	100%	3E-78
SAM-dependent methyltransferase [Vibrio coralliilyticus ATCC BAA-450] >gb EEX34608.1	294	294	96%	1E-77
SAM-dependent methyltransferase [Vibrio sinaloensis DSM 21326] >gb EGA70047.1 SAM-	293	293	93%	2E-77
SAM-dependent methyltransferase [Vibrio parahaemolyticus 16] >gb EED25445.1 SAM-	292	292	96%	2E-77
SAM-dependent methyltransferase [Vibrio brasiliensis LMG 20546] >gb EGA63595.1 SAM-	291	291	96%	5E-77
SAM-dependent methyltransferase [Vibrio orientalis CIP 102891 = ATCC 33934]	291	291	96%	6E-77
SAM-dependent methyltransferase [Vibrio furnissii CIP 102972] >gb EEX42494.1 SAM-	290	290	96%	9E-77
Generic methyl-transferase [Nitrosomonas europaea ATCC 19718] >emb CAD84050.1	290	290	91%	1E-76
generic methyltransferase; protein [Ralstonia solanacearum Po82]	289	289	98%	4E-76
Methyltransferase-like protein [Cupriavidus metallidurans CH34] >gb ABF09086.1	287	287	94%	1E-75
SAM-dependent methyltransferase [Vibrio cholerae RC9] >gb EEO08914.1 SAM-dependent	285	285	96%	3E-75
methyltransferase [Vibrio anguillarum 775] >gb AEH32530.1 Methyltransferase [Vibrio	285	285	96%	3E-75
SAM-dependent methyltransferase [Vibrio metschnikovii CIP 69.14] >gb EEX36589.1 SAM-	285	285	96%	4E-75
conserved hypothetical protein [Vibrio cholerae MZO-2] >gb EDM55100.1 conserved	285	285	96%	5E-75
hypothetical protein VC2235 [Vibrio cholerae O1 biovar El Tor str. N16961]	285	285	96%	6E-75
SAM-dependent methyltransferase [Vibrio cholerae bv. albensis VL426] >gb EEO02836.1	284	284	96%	6E-75
conserved hypothetical protein [Vibrio harveyi 1DA3] >gb EEZ88779.1 conserved	284	284	95%	9E-75
generic methyltransferase; protein [Ralstonia solanacearum MolK2] >emb CAQ36155.1	284	284	96%	9E-75
hypothetical protein mma_1209 [Janthinobacterium sp. Marseille] >gb ABR91208.1	284	284	94%	1E-74
SAM-dependent methyltransferase [Vibrio cholerae TM 11079-80] >gb EEO06112.1 SAM-	284	284	96%	1E-74

hypothetical protein Tmz1t_2290 [Thauera sp. MZ1T] >gb ACK55029.1 conserved	283	283	93%	1E-74
conserved hypothetical protein [Vibrio cholerae 1587] >ref ZP_04403340.1 SAM-dependent	283	283	96%	2E-74
conserved hypothetical protein [Vibrio cholerae 623-39] >ref ZP_02957676.1 conserved	283	283	96%	2E-74
hypothetical protein HEAR2320 [Herminiimonas arsenicoxydans] >emb CAL62451.1	282	282	94%	3E-74
[Pseudoalteromonas haloplanktis ANT/505] >gb EGI71327.1 SAM-dependent	282	282	96%	3E-74
hypothetical protein VIBHAR_03212 [Vibrio harveyi ATCC BAA-1116]	282	282	95%	3E-74
SAM-dependent methyltransferase [Vibrio sp. RC586] >gb EEY98741.1 SAM-dependent	282	282	96%	4E-74
putative SAM-dependent methyltransferase [Vibrio alginolyticus 12G01] >gb EAS77848.1	282	282	94%	4E-74
s-adenosyl-l-methionine-dependent methyltransferase [Ralstonia solanacearum CFBP2957]	282	282	96%	5E-74
Methyltransferase [Ralstonia solanacearum UW551]	281	281	96%	6E-74
SAM-dependent methyltransferase [Vibrio caribbenthicus ATCC BAA-2122] >gb EFP96113.1	281	281	96%	7E-74
generic methyl-transferase [Aromatoleum aromaticum EbN1] >emb CAI09819.1 Generic	281	281	92%	8E-74
SAM-dependent methyltransferase [Vibrio sp. RC341] >gb EEX65936.1 SAM-dependent	281	281	96%	8E-74
S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase [Vibrio fischeri ES114]	281	281	96%	8E-74
hypothetical protein ATW7_08896 [Alteromonadales bacterium TW-7]	280	280	96%	9E-74
conserved hypothetical protein [Vibrio mimicus VM573] >ref ZP_05722157.1 conserved	280	280	96%	1E-73
conserved hypothetical protein [Vibrio alginolyticus 40B]	280	280	94%	1E-73
SAM-dependent methyltransferase [Vibrio vulnificus YJ016] >dbj BAC95295.1 SAM-dependent methyltransferase [Vibrio vulnificus YJ016]	280	280	94%	1E-73
methyltransferase [Vibrio fischeri MJ11]	280	280	96%	1E-73
SAM-dependent methyltransferase [Vibrio sp. Ex25]	280	280	94%	2E-73
SAM-dependent methyltransferase [Vibrio mimicus MB-451]	280	280	96%	2E-73
conserved hypothetical protein [Vibrio cholerae AM-19226]	280	280	96%	2E-73
SAM-dependent methyltransferase [Vibrio sp. MED222]	280	280	96%	2E-73
SAM-dependent methyltransferase [Vibrio splendidus LGP32]	279	279	96%	2E-73
SAM-dependent methyltransferase [Vibrio splendidus 12B01]	279	279	96%	3E-73
SAM-dependent methyltransferase [Vibrio vulnificus MO6-24/O]	279	279	94%	3E-73
S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase [Pseudoalteromonas haloplanktis TAC125]	278	278	96%	3E-73
hypothetical protein VEx25_1492 [Vibrio sp. Ex25]	278	278	94%	5E-73
SAM-dependent methyltransferase [Vibrionales bacterium SWAT-3]	278	278	94%	5E-73

conserved hypothetical protein [Oxalobacter formigenes OXCC13]	278	278	94%	7E-73
generic methyl-transferase [Dechloromonas aromatica RCB]	277	277	93%	1E-72
S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase [Pseudoalteromonas sp. SM9913]	277	277	96%	1E-72
putative methyltransferase [Janthinobacterium lividum]	276	276	96%	2E-72
putative SAM-dependent methyltransferase [Vibrio parahaemolyticus RIMD 2210633]	276	276	94%	2E-72
type 11 methyltransferase [Pantoea sp. At-9b]	276	276	96%	2E-72
hypothetical protein VSAL_I2400 [Aliivibrio salmonicida LFI1238]	276	276	94%	2E-72
putative methyltransferase [Janthinobacterium lividum]	276	276	96%	2E-72
S-adenosylhomocysteine hydrolase [Herbaspirillum seropedicae SmR1]	276	276	93%	2E-72
generic methyl-transferase [Nitrosospora multiformis ATCC 25196]	276	276	91%	2E-72
methyltransferase type 11 [Cupriavidus necator N-1]	276	276	95%	3E-72
hypothetical protein RALTA_A1996 [Cupriavidus taiwanensis LMG 19424]	275	275	95%	3E-72
hypothetical protein BAV2935 [Bordetella avium 197N]	275	275	94%	3E-72
hypothetical protein PFLU2644 [Pseudomonas fluorescens SBW25]	275	275	98%	3E-72
type 11 methyltransferase [Candidatus Accumulibacter phosphatis clade IIA str. UW-1]	275	275	86%	3E-72
type 11 methyltransferase [Serratia proteamaculans 568]	275	275	95%	4E-72
SAM-dependent methyltransferase [Oxalobacteraceae bacterium IMCC9480]	275	275	94%	4E-72
type 11 methyltransferase [Achromobacter piechaudii ATCC 43553]	275	275	94%	5E-72
hypothetical protein Pfl01_2185 [Pseudomonas fluorescens Pf0-1]	275	275	98%	5E-72
hypothetical protein 1103602000600_AND4_15180 [Vibrio sp. AND4]	274	274	95%	6E-72
hypothetical protein yfred0001_34910 [Yersinia frederiksenii ATCC 33641]	274	274	96%	9E-72
conserved hypothetical protein [Oxalobacter formigenes HOxBLS]	274	274	92%	1E-71
hypothetical protein PTD2_10504 [Pseudoalteromonas tunicata D2]	273	273	92%	1E-71
Methyltransferase type 11 [Nitrosomonas sp. AL212]	273	273	91%	1E-71
hypothetical protein ykris0001_8320 [Yersinia kristensenii ATCC 33638]	273	273	96%	1E-71
hypothetical protein BokIE_07281 [Burkholderia oklahomensis EO147]	273	273	94%	2E-71
Methyltransferase type 11 [Nitrosomonas sp. Is79A3]	273	273	89%	2E-71
SAM-dependent methyltransferase [Photobacterium profundum SS9]	273	273	96%	2E-71
Methyltransferase type 11 [Pantoea sp. aB] >gb EFM21023.1 Methyltransferase type 11 [Pantoea sp. aB]	273	273	96%	2E-71
hypothetical protein BPP3835 [Bordetella parapertussis 12822]	273	273	94%	2E-71

hypothetical protein PSEBR_a3285 [Pseudomonas brassicacearum subsp. brassicacearum NFM421]	273	273	98%	2E-71
methyltransferase [Achromobacter xylosoxidans A8]	273	273	94%	2E-71
hypothetical protein ymoll0001_39780 [Yersinia mollaretii ATCC 43969]	273	273	96%	2E-71
SAM-dependent methyltransferase [Grimontia hollisae CIP 101886]	272	272	94%	2E-71
hypothetical protein YE105_C3158 [Yersinia enterocolitica subsp. palearctica 105.5R(r)]	272	272	96%	2E-71
hypothetical protein yaldo0001_25220 [Yersinia aldovae ATCC 35236]	272	272	96%	3E-71
hypothetical SAM-dependent methyltransferase [Photobacterium profundum 3TCK]	272	272	96%	3E-71
methyltransferase domain-containing protein [Enterobacteriaceae bacterium 9_2_54FAA]	272	272	96%	3E-71
hypothetical protein azo2056 [Azoarcus sp. BH72]	272	272	93%	4E-71
hypothetical protein YE0920 [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	272	272	96%	4E-71
S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase [Photobacterium leiognathi subsp. mandapamensis svers.1.1.]	272	272	96%	4E-71
sam-dependent methyltransferase [Yersinia enterocolitica subsp. palearctica Y11]	272	272	96%	4E-71
hypothetical protein HMPREF0005_02307 [Achromobacter xylosoxidans C54]	271	271	94%	6E-71
type 11 methyltransferase [Serratia sp. AS12]	271	271	95%	6E-71
hypothetical protein BPSL1343 [Burkholderia pseudomallei K96243]	271	271	94%	6E-71
methyltransferase type 11 [Serratia odorifera 4Rx13]	271	271	95%	6E-71
hypothetical protein PFWH6_2453 [Pseudomonas fluorescens WH6]	271	271	98%	6E-71
hypothetical protein BTH_I2789 [Burkholderia thailandensis E264]	271	271	94%	6E-71
hypothetical protein BP3212 [Bordetella pertussis Tohama I]	271	271	94%	7E-71
hypothetical protein PSYMP_22829 [Pseudomonas syringae pv. morsprunorum str. M302280PT]	271	271	98%	7E-71
hypothetical protein Bpse38_06926 [Burkholderia thailandensis MSMB43]	271	271	94%	7E-71
hypothetical protein Psyr_1762 [Pseudomonas syringae pv. syringae B728a]	271	271	98%	8E-71
methyltransferase type 11 [Pseudomonas fulva 12-X]	270	270	97%	9E-71
conserved hypothetical protein [Pseudomonas syringae pv. tomato T1]	270	270	98%	9E-71
hypothetical protein PsyrpF_39452 [Pseudomonas syringae pv. syringae FF5]	270	270	96%	1E-70
hypothetical protein yrohd0001_21950 [Yersinia rohdei ATCC 43380]	270	270	96%	1E-70
type 11 methyltransferase [Burkholderia multivorans ATCC 17616]	270	270	94%	1E-70
hypothetical protein PT7_3575 [Pusillimonas sp. T7-7]	270	270	92%	1E-70

hypothetical protein Psyrps6_16548 [<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> 642]	270	270	98%	1E-70
type 11 methyltransferase [<i>Plautia stali</i> symbiont]	270	270	95%	1E-70
hypothetical protein PSPTO_3713 [<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> str. DC3000]	270	270	98%	1E-70
hypothetical protein PLA106_24648 [<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> str. M302278PT]	270	270	98%	1E-70
hypothetical protein y3096 [<i>Yersinia pestis</i> KIM 10]	270	270	96%	2E-70
conserved hypothetical protein [<i>Burkholderia multivorans</i> CGD1]	270	270	94%	2E-70
hypothetical protein PSYAC_01415 [<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> str. M302091]	270	270	98%	2E-70
hypothetical protein POR16_28141 [<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>oryzae</i> str. 1_6]	270	270	98%	2E-70
hypothetical protein Pvag_0241 [<i>Pantoea vagans</i> C9-1]	269	269	96%	2E-70
SAM-dependent methyltransferase [<i>Citrobacter youngae</i> ATCC 29220]	269	269	95%	2E-70
hypothetical protein PsyrptA_11114 [<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> ATCC 11528]	269	269	98%	2E-70
hypothetical protein PSYCIT7_15869 [<i>Pseudomonas syringae</i> Cit 7]	269	269	98%	2E-70
Methyltransferase type 11 [<i>Enterobacter cloacae</i> SCF1]	269	269	95%	2E-70
methyltransferase type 11 [<i>Sideroxydans lithotrophicus</i> ES-1]	269	269	88%	2E-70
SAM-dependent methyltransferase [<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> NCPPB 3335]	269	269	98%	3E-70
hypothetical protein CKO_02970 [<i>Citrobacter koseri</i> ATCC BAA-895]	269	269	95%	3E-70
hypothetical protein Bpro_2280 [<i>Polaromonas</i> sp. JS666]	269	269	93%	3E-70
Methyltransferase type 11 [<i>Burkholderia ubonensis</i> Bu]	269	269	94%	3E-70
generic methyl-transferase [<i>Nitrosomonas eutropha</i> C91]	268	268	88%	3E-70
type 11 methyltransferase [<i>Burkholderia phymatum</i> STM815]	268	268	94%	3E-70
type 11 methyltransferase [<i>Burkholderia vietnamiensis</i> G4]	268	268	94%	3E-70
hypothetical protein PMA4326_12694 [<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i> str. ES4326]	268	268	96%	4E-70
methyltransferase [<i>Klebsiella pneumoniae</i> 342]	268	268	96%	4E-70
putative methyltransferase [<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315]	268	268	94%	4E-70
conserved hypothetical protein [<i>Citrobacter</i> sp. 30_2]	268	268	95%	4E-70
YafS [<i>Pantoea ananatis</i> LMG 20103] >gb ADD75995.1 YafS [<i>Pantoea ananatis</i> LMG 20103]]	268	268	96%	4E-70
hypothetical protein PSPPH_1711 [<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 1448A]	268	268	98%	4E-70
putative methyltransferase [<i>Klebsiella pneumoniae</i> NTUH-K2044]	268	268	96%	4E-70
conserved hypothetical protein [<i>Burkholderia pseudomallei</i> 305]	268	268	94%	5E-70
hypothetical SAM-dependent methyltransferase [<i>Vibrio angustum</i> S14]	268	268	94%	5E-70
hypothetical protein ROD_02181 [<i>Citrobacter rodentium</i> ICC168]	268	268	95%	5E-70

hypothetical protein PSYPI_11704 [Pseudomonas syringae pv. pisi str. 1704B]	268	268	96%	5E-70
Methyltransferase type 11 [Burkholderia sp. Ch1-1]	268	268	94%	5E-70
methyltransferase type 11 [Burkholderia phytofirmans PsJN]	268	268	94%	6E-70
hypothetical protein SPA2507 [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi A str.	268	268	95%	7E-70
putative methyltransferase [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Newport str. SL317]	268	268	95%	7E-70
hypothetical protein PsgB076_08157 [Pseudomonas syringae pv. glycinea str. B076]	268	268	98%	7E-70
methyltransferase type 11 [Burkholderia cenocepacia MC0-3]	268	268	94%	7E-70
hypothetical protein Bxe_A1252 [Burkholderia xenovorans LB400]	267	267	94%	8E-70
Methyltransferase type 11 [Burkholderia sp. H160]	267	267	94%	9E-70
methyltransferase [Klebsiella sp. 1_1_55]	267	267	96%	9E-70
putative methyltransferase [Escherichia albertii TW07627]	267	267	96%	9E-70
putative methyltransferase [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Dublin str. CT_02021853]	267	267	95%	9E-70
methyltransferase type 11 [Burkholderia cenocepacia AU 1054]	267	267	94%	1E-69
methyltransferase domain-containing protein 1 [Achromobacter xylosoxidans AXX-A]	267	267	94%	1E-69
SAM-dependent methyltransferase [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. LT2]	267	267	95%	1E-69
type 11 methyltransferase [Burkholderia ambifaria AMMD]	267	267	94%	1E-69
type 11 methyltransferase [Methylovorus sp. MP688]	267	267	92%	1E-69
Methyltransferase type 11 [Burkholderia ambifaria IOP40-10]	267	267	94%	1E-69
hypothetical SAM-dependent methyltransferase [Photobacterium sp. SKA34]	267	267	94%	1E-69
Methyltransferase type 11 [Burkholderia graminis C4D1M]	267	267	94%	1E-69
hypothetical protein SentesTe_21657 [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Tennessee str. CDC07-0191]	267	267	95%	1E-69
hypothetical protein BDAG_01951 [Burkholderia dolosa AUO158]	267	267	94%	1E-69
hypothetical protein Bcep18194_A4428 [Burkholderia sp. 383]	267	267	94%	2E-69
putative methyltransferase [Escherichia coli HS] >ref ZP_03044377.1 putative	267	267	96%	2E-69
methyltransferase type 11 [Klebsiella variicola At-22]	267	267	96%	2E-69
hypothetical protein c0250 [Escherichia coli CFT073] >ref YP_539267.1 hypothetical protein	266	266	96%	2E-69
hypothetical protein SPAB_03352 [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi B str. SPB7]	266	266	95%	2E-69
hypothetical protein yinte0001_6340 [Yersinia intermedia ATCC 29909]	266	266	96%	2E-69

hypothetical protein Avin_29610 [Azotobacter vinelandii DJ]	266	266	98%	2E-69
Methyltransferase type 11 [Burkholderia ambifaria MEX-5]	266	266	93%	2E-69
methyltransferase [Burkholderia rhizoxinica HKI 454]	266	266	92%	2E-69
hypothetical protein Z0237 [Escherichia coli O157:H7 EDL933] >ref NP_308236.1	266	266	96%	2E-69
hypothetical protein bgla_1g13320 [Burkholderia gladioli BSR3]]	266	266	94%	2E-69
hypothetical protein G2583_0217 [Escherichia coli O55:H7 str. CB9615] >ref ZP_08352143.1	266	266	96%	2E-69
type 11 methyltransferase [Methylovorus sp. SIP3-4]	266	266	92%	2E-69
hypothetical protein bglu_1g11310 [Burkholderia glumae BGR1]	266	266	94%	2E-69
hypothetical protein STY0283 [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi str. CT18] >ref NP_806319.1	266	266	95%	2E-69
methyltransferase type 11 [Burkholderia sp. CCGE1002]	266	266	94%	2E-69
putative methyltransferase [Escherichia coli SMS-3-5]	266	266	96%	2E-69
hypothetical protein ECP_0219 [Escherichia coli 536]	266	266	96%	2E-69
putative S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase [Escherichia coli O103:H2 str. 12009]	266	266	96%	3E-69
putative methyltransferase [Escherichia coli E24377A]	265	265	96%	3E-69
putative methyltransferase [Escherichia coli O157:H7 str. EC4113] >ref ZP_02782213.1	265	265	96%	3E-69
putative S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase [Escherichia coli UMN026]	265	265	96%	3E-69
putative methyltransferase [Shigella dysenteriae 1012]	265	265	96%	3E-69
hypothetical protein SSON_0227 [Shigella sonnei Ss046]	265	265	96%	4E-69
methyltransferase domain protein [Shigella flexneri K-272]	265	265	96%	4E-69
putative S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase [Escherichia coli IAI1]	265	265	96%	4E-69
Methyltransferase type 11 [Limnobacter sp. MED105]	265	265	94%	4E-69
hypothetical protein SDY_0232 [Shigella dysenteriae Sd197]	265	265	96%	4E-69
methyltransferase domain protein [Escherichia coli MS 21-1]	265	265	96%	4E-69
methyltransferase type 11 [Erwinia billingiae Eb661]	265	265	96%	4E-69
putative S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase [Escherichia coli O26:H11 str. 11368]]	265	265	96%	4E-69
hypothetical SAM-dependent methyltransferase [Photobacterium damsela subsp. damsela CIP 102761]	265	265	94%	4E-69
hypothetical protein SFV_0197 [Shigella flexneri 5 str. 8401]]	265	265	96%	4E-69
hypothetical protein SF0199 [Shigella flexneri 2a str. 301]	265	265	96%	4E-69

conserved hypothetical protein [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. D23580]	265	265	95%	5E-69
methyltransferase domain protein [Escherichia coli LT-68]	265	265	96%	5E-69
SAM-dependent methyltransferase [Enterobacter hormaechei ATCC 49162]	265	265	95%	5E-69
methyltransferase domain protein [Shigella boydii 5216-82]	265	265	96%	6E-69
hypothetical protein CPS_2000 [Colwellia psychrerythraea 34H]	265	265	95%	6E-69
conserved hypothetical protein [Escherichia coli ETEC H10407]	265	265	96%	6E-69
methyltransferase domain protein [Shigella dysenteriae 1617]	264	264	96%	6E-69
type 11 methyltransferase [Escherichia coli ATCC 8739]	264	264	96%	6E-69
S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase [Escherichia fergusonii ATCC 35469]	264	264	96%	7E-69
methyltransferase domain protein [Escherichia coli H736]	264	264	96%	7E-69
hypothetical protein SARI_02740 [Salmonella enterica subsp. arizonae serovar 62:z4,z23:-- str. RSK2980]	264	264	95%	7E-69
type 11 methyltransferase [Burkholderia sp. CCGE1001]	264	264	94%	7E-69
methyltransferase domain protein [Escherichia coli MS 153-1]	264	264	96%	1E-68
predicted S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase [Escherichia coli str. K-12 substr. W3110]	264	264	96%	1E-68
SAM-dependent methyltransferase [Enterobacter cancerogenus ATCC 35316]	263	263	95%	1E-68
putative methyltransferase [Escherichia coli 53638]	263	263	96%	1E-68
putative methyltransferase [Escherichia coli F11]	263	263	96%	1E-68
SAM-dependent methyltransferase [Pseudomonas stutzeri A1501]	263	263	99%	1E-68
putative methyltransferase [Enterobacter aerogenes KCTC 2190]	263	263	95%	2E-68
methyltransferase domain protein [Escherichia coli MS 78-1]	263	263	96%	2E-68
hypothetical protein ECL_01012 [Enterobacter cloacae subsp. cloacae ATCC 13047]	263	263	95%	2E-68
hypothetical protein SG0590 [Sodalis glossinidius str. 'morsitans']	263	263	96%	2E-68
putative S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase [Serratia symbiotica str. Tucson]	262	262	95%	2E-68
methylase involved in ubiquinone/menaquinone biosynthesis [Rheinheimera sp. A13L]	262	262	96%	3E-68
type 11 methyltransferase [Methylobacter mobilis JLW8]	262	262	94%	3E-68
conserved hypothetical protein [Luticola nitroferum 2002]	262	262	92%	3E-68
methyltransferase type 11 [Enterobacter sp. 638]	262	262	95%	4E-68
methyltransferase type 11 [Rahnella sp. Y9602]	262	262	96%	4E-68

SAM-dependent methyltransferase [<i>Pseudomonas stutzeri</i> DSM 4166]	262	262	99%	5E-68
putative methyltransferase [<i>Escherichia coli</i> E110019]	262	262	96%	5E-68
hypothetical protein Pmen_2065 [<i>Pseudomonas mendocina</i> ymp]	262	262	98%	5E-68
methyltransferase type 11 [<i>Variovorax paradoxus</i> EPS]	261	261	91%	6E-68
methyltransferase type 11 [<i>Methylobacillus flagellatus</i> KT]	261	261	92%	8E-68
hypothetical protein CV_1255 [<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472]	261	261	92%	8E-68
methyltransferase type 11 [<i>Variovorax paradoxus</i> S110]	260	260	90%	1E-67
Methyltransferase type 11 [<i>Erwinia</i> sp. Ejp617]	260	260	92%	2E-67
methyltransferase type 11 [<i>Erwinia pyrifoliae</i> Ep1/96]	259	259	92%	2E-67
type 11 methyltransferase [<i>Methylothermus</i> sp. 301]	259	259	93%	2E-67
hypothetical protein PFL_3298 [<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5]	259	259	98%	2E-67
conserved hypothetical protein [<i>Pseudomonas putida</i> S16]	258	258	96%	4E-67
type 11 methyltransferase [<i>Acidovorax</i> sp. JS42]	258	258	85%	4E-67
Putative S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase [<i>Methyloversatilis universalis</i> FAM5]	258	258	84%	5E-67
hypothetical protein PSEEN3560 [<i>Pseudomonas entomophila</i> L48]	258	258	97%	7E-67
SAM-dependent methyltransferase [<i>Providencia rettgeri</i> DSM 1131]	258	258	96%	7E-67
hypothetical protein ETA_26360 [<i>Erwinia tasmaniensis</i> Et1/99]	257	257	92%	8E-67
hypothetical protein EAMY_0842 [<i>Erwinia amylovora</i> CFBP1430]	257	257	92%	1E-66
Generic methyl-transferase [<i>Laribacter hongkongensis</i> HLHK9]	257	257	88%	1E-66
SAM-dependent methyltransferase [<i>Providencia rustigianii</i> DSM 4541]	257	257	94%	1E-66
methyltransferase type 11 [<i>Polynucleobacter necessarius</i> subsp. <i>asymbioticus</i> QLW-P1DMWA-]	256	256	95%	2E-66
Methyltransferase type 11 [<i>Polynucleobacter necessarius</i> subsp. <i>necessarius</i> STIR1]	256	256	98%	2E-66
hypothetical protein PputW619_3468 [<i>Pseudomonas putida</i> W619]	256	256	96%	3E-66
hypothetical protein PROVALCAL_00248 [<i>Providencia alcalifaciens</i> DSM 30120]	255	255	96%	3E-66
Methyltransferase type 11 [<i>Tolomonas auensis</i> DSM 9187]	255	255	92%	4E-66
methyltransferase domain protein [<i>Escherichia coli</i> E128010]	254	254	92%	7E-66
methyltransferase [<i>Aeromonas veronii</i> B565]	254	254	92%	7E-66
hypothetical protein yruck0001_22750 [<i>Yersinia ruckeri</i> ATCC 29473]	254	254	92%	8E-66
methyltransferase [<i>Ralstonia eutropha</i> H16]	254	254	87%	8E-66
methyltransferase type 11 [<i>Psychromonas ingrahamii</i> 37]	254	254	96%	8E-66

hypothetical protein MDMS009_1447 [Methylophaga thiooxidans DMS010]	254	254	92%	9E-66
type 11 methyltransferase [Acidovorax ebreus TPSY]	254	254	84%	1E-65
methyl-transferase [Thiobacillus denitrificans ATCC 25259]	254	254	88%	1E-65
methyltransferase domain protein [Escherichia coli RN587/1]	254	254	92%	1E-65
hypothetical protein MDS_2218 [Pseudomonas mendocina NK-01]	254	254	97%	1E-65
type 11 methyltransferase [Polaromonas naphthalenivorans CJ2]	253	253	84%	1E-65
methyltransferase type 11 [Ralstonia sp. 5_7_47FAA]	253	253	81%	1E-65
type 11 methyltransferase [Dickeya dadantii Ech703]	253	253	96%	1E-65
methyltransferase domain protein [Shigella flexneri 2a str. 2457T]	253	253	92%	2E-65
methyltransferase domain protein [Escherichia coli 1180]	253	253	92%	2E-65
hypothetical protein SO_2562 [Shewanella oneidensis MR-1]	253	253	94%	2E-65
conserved hypothetical protein [Burkholderia pseudomallei Pakistan 9]	252	252	86%	3E-65
type 11 methyltransferase [Shewanella sp. MR-4]	252	252	94%	3E-65
methyltransferase domain protein [Escherichia coli 1827-70]	252	252	92%	3E-65
type 11 methyltransferase [Shewanella sp. ANA-3]	252	252	94%	3E-65
S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase [Escherichia fergusonii ECD227]	252	252	92%	3E-65
Methyltransferase type 11 [Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum PC1]	252	252	95%	4E-65
type 11 methyltransferase [Acidovorax avenae subsp. avenae ATCC 19860]	252	252	91%	4E-65
hypothetical protein RBXJA2T_12247 [Rubrivivax benzoatilyticus JA2]	252	252	88%	4E-65
methylase involved in ubiquinone/menaquinone biosynthesis [Methylophaga aminisulfidivorans MP]	252	252	93%	5E-65
hypothetical protein PcarcW_21653 [Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum WPP14]	251	251	95%	7E-65
hypothetical protein PcarbP_08404 [Pectobacterium carotovorum subsp. brasiliensis PBR1692]	251	251	95%	8E-65
type 11 methyltransferase [Shewanella baltica OS155]	251	251	93%	9E-65
type 11 methyltransferase [Shewanella sp. MR-7]	250	250	94%	1E-64
hypothetical protein PAU_00859 [Photorhabdus asymbiotica subsp. asymbiotica ATCC 43949]	250	250	96%	1E-64
hypothetical protein PROSTU_04707 [Providencia stuartii ATCC 25827]	250	250	96%	1E-64
hypothetical protein SPC_0272 [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi C strain RKS4594]	250	250	88%	2E-64
type 11 methyltransferase [Ralstonia pickettii 12J]	250	250	80%	2E-64

SAM-dependent methyltransferase [Shewanella sp. HN-41]	250	250	94%	2E-64
Methyltransferase type 11 [Thioalkalivibrio sp. HL-EbGR7]	250	250	96%	2E-64
methyltransferase [Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila ATCC 7966]]	250	250	92%	2E-64
hypothetical protein ECA3341 [Pectobacterium atrosepticum SCRI1043]	249	249	95%	2E-64
Orf71 [Photorhabdus luminescens]	249	249	96%	2E-64
Methyltransferase type 11 [Shewanella baltica OS183]	249	249	93%	3E-64
type 11 methyltransferase [Ralstonia pickettii 12D]	249	249	80%	3E-64
Conserved hypothetical protein, putative S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase [Thiomonas sp. 3As]	249	249	92%	3E-64
methyltransferase type 11 [Pectobacterium wasabiae WPP163]	248	248	95%	4E-64
putative methyltransferase [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Dublin str. SD3246]	248	248	88%	4E-64
methyltransferase [Aeromonas caviae Ae398]	248	248	92%	5E-64
hypothetical protein PP_4143 [Pseudomonas putida KT2440]	248	248	96%	5E-64
hypothetical protein Mpe_A2528 [Methylibium petroleiphilum PM1]	248	248	92%	6E-64
hypothetical protein yberc0001_30750 [Yersinia bercovieri ATCC 43970]	248	248	88%	7E-64
hypothetical protein YPZ3_0986 [Yersinia pestis Z176003]	248	248	89%	7E-64
putative methyltransferase [Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae MGH 78578]	248	248	89%	7E-64
Hypothetical protein, conserved [Pseudomonas putida BIRD-1]	248	248	96%	8E-64
methyltransferase type 11 [Edwardsiella tarda EIB202]	247	247	96%	8E-64
hypothetical protein Pput_1722 [Pseudomonas putida F1]	247	247	96%	8E-64
hypothetical protein CSE899_13899 [Cronobacter sakazakii E899]	247	247	95%	9E-64
methyltransferase [Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida A449]	247	247	92%	1E-63
generic methyl-transferase [Nitrosococcus halophilus Nc4]]	247	247	98%	1E-63
putative S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase [Dickeya dadantii 3937]	247	247	96%	1E-63
type 11 methyltransferase [Delftia sp. Cs1-4] >gb AEF88975.1 Methyltransferase type 11 [Delftia sp. Cs1-4]	247	247	91%	1E-63
hypothetical protein plu0941 [Photorhabdus luminescens subsp. laumondii TTO1]	247	247	96%	1E-63
hypothetical protein ESA_03126 [Cronobacter sakazakii ATCC BAA-894]	247	247	95%	1E-63
methyltransferase domain protein [Shigella flexneri 2930-71]	247	247	89%	2E-63
hypothetical protein PputGB1_3715 [Pseudomonas putida GB-1]	246	246	96%	2E-63
Methyltransferase type 11 [Thiomonas intermedia K12]	246	246	92%	2E-63

SAM-dependent methyltransferase [<i>Serratia odorifera</i> DSM 4582]	246	246	95%	2E-63
hypothetical protein RSc1514 [<i>Ralstonia solanacearum</i> GMI1000]	245	245	81%	3E-63
hypothetical protein Rfer_1463 [<i>Rhodospirillum rubrum</i> T118]	245	245	80%	3E-63
methyltransferase type 11 [<i>Comamonas testosteroni</i> CNB-2]	245	245	91%	4E-63
hypothetical protein CTU_08370 [<i>Cronobacter turicensis</i> z3032]	245	245	95%	4E-63
type 11 methyltransferase [<i>Dickeya dadantii</i> Ech586]	245	245	95%	5E-63
SAM-dependent methyltransferase [<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>rhinoscleromatis</i> ATCC 13884]	245	245	89%	6E-63
S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase [<i>Ralstonia solanacearum</i> PSI07]	245	245	81%	7E-63
Methyltransferase type 11 [<i>Comamonas testosteroni</i> S44]	244	244	91%	7E-63
methyltransferase type 11 [<i>Alicyclophila denitrificans</i> BC]	244	244	86%	1E-62
SAM-dependent methyltransferase [<i>Candidatus Regiella insecticola</i> LSR1]	243	243	90%	1E-62
hypothetical protein G1E_27667 [<i>Pseudomonas</i> sp. TJI-51]	243	243	95%	1E-62
type 11 methyltransferase [<i>Shewanella</i> sp. W3-18-1]	243	243	94%	1E-62
hypothetical protein Rta_23220 [<i>Ramlibacter tataouinensis</i> TTB310]	243	243	92%	2E-62
Methyltransferase type 11 [<i>Comamonas testosteroni</i> KF-1]	243	243	91%	2E-62
type 11 methyltransferase [<i>Shewanella putrefaciens</i> CN-32]	243	243	94%	2E-62
putative S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase [<i>Ralstonia solanacearum</i> CMR15]	242	242	80%	3E-62
methyltransferase [<i>Psychromonas</i> sp. CNPT3]	242	242	96%	3E-62
type 11 methyltransferase [<i>Lautropia mirabilis</i> ATCC 51599]	242	242	94%	4E-62
Methyltransferase type 11 [<i>Shewanella putrefaciens</i> 200]	242	242	94%	4E-62
putative S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase [<i>Xenorhabdus nematophila</i> ATCC 19061]	241	241	96%	7E-62
methyltransferase type 11 [<i>Shewanella denitrificans</i> OS217]	241	241	91%	7E-62
hypothetical protein SVI_2387 [<i>Shewanella violacea</i> DSS12]	241	241	93%	9E-62
type 11 methyltransferase [<i>Dickeya zeae</i> Ech1591]	240	240	95%	2E-61
S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase [<i>Xenorhabdus bovienii</i> SS-2004]	239	239	96%	2E-61
generic methyl-transferase [<i>Nitrosococcus oceani</i> ATCC 19707]	239	239	94%	3E-61
SAM-dependent methyltransferase [<i>Edwardsiella tarda</i> ATCC 23685]	237	237	98%	1E-60
SAM-dependent methyltransferase [<i>Hahella chejuensis</i> KCTC 2396]	237	237	91%	2E-60

hypothetical protein Sama_1883 [Shewanella amazonensis SB2B]]	236	236	91%	2E-60
hypothetical protein PROPEN_02807 [Proteus penneri ATCC 35198]	235	235	95%	4E-60
hypothetical protein Swoo_2610 [Shewanella woodyi ATCC 51908]	235	235	92%	5E-60
hypothetical protein KT99_11388 [Shewanella benthica KT99]	235	235	94%	7E-60
hypothetical protein NT01EI_3195 [Edwardsiella ictaluri 93-146]	234	234	92%	8E-60
methyltransferase type 11 [Nitrosococcus watsonii C-113]]	234	234	90%	8E-60
generic methyl-transferase [Cellvibrio japonicus Ueda107]	234	234	86%	1E-59
methyltransferase [Moritella sp. PE36] >gb EDM68091.1 methyltransferase [Moritella sp. PE36]	233	233	87%	1E-59
hypothetical protein Lcho_1971 [Leptothrix cholodnii SP-6]	233	233	92%	2E-59
type 11 methyltransferase [Shewanella halifaxensis HAW-EB4]	232	232	92%	3E-59
hypothetical protein Patl_1896 [Pseudoalteromonas atlantica T6c]	232	232	94%	5E-59
type 11 methyltransferase [Shewanella pealeana ATCC 700345]	232	232	90%	6E-59
hypothetical protein Ssed_1990 [Shewanella sediminis HAW-EB3]	231	231	91%	6E-59
hypothetical protein HGR_05821 [Hylemonella gracilis ATCC 19624]	230	230	91%	1E-58
hypothetical protein Glaag_1882 [Glaciecola agarilytica 4H-3-7+YE-5]	230	230	93%	2E-58
Methyltransferase type 11 [Gallionella capsiferriformans ES-2]	230	230	95%	2E-58
methyltransferase type 11 [Shewanella frigidimarina NCIMB 400]	230	230	91%	2E-58
uncharacterized protein yafS [Yersinia enterocolitica W22703]	228	228	81%	5E-58
SAM-dependent methyltransferase [Alteromonas macleodii str. 'Deep ecotype']	228	228	98%	7E-58
methyltransferase type 11 [Burkholderia sp. CCGE1003]	227	227	69%	1E-57
type 11 methyltransferase [Proteus mirabilis ATCC 29906]	227	227	95%	1E-57
Methylase involved in ubiquinone/menaquinone biosynthesis [Enterobacter cloacae subsp. cloacae NCTC 9394]	227	227	80%	1E-57
type 11 methyltransferase [Allochromatium vinosum DSM 180]	226	226	92%	2E-57
generic methyl-transferase [Beggiatoa sp. PS] >gb EDN67670.1 generic methyl-transferase [Beggiatoa sp. PS]	226	226	78%	2E-57
SAM-dependent methyltransferase [Marinomonas mediterranea MMB-1]	225	225	91%	3E-57
predicted S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase [Candidatus Hamiltonella defensa 5AT (Acyrtosiphon pisum)]	225	225	92%	4E-57
methyltransferase domain protein [Parasutterella excrementihominis YIT 11859]]	224	224	91%	9E-57
methyltransferase type 11 [Burkholderiales bacterium 1_1_47]	223	223	91%	2E-56

Methyltransferase type 11 [Acidovorax delafieldii 2AN]	223	223	90%	2E-56
SAM-dependent methyltransferase [Alteromonas sp. SN2]	223	223	95%	3E-56
methyltransferase type 11 [Marinobacter aquaeolei VT8]	222	222	94%	3E-56
methyltransferase type 11 [Ferrimonas balearica DSM 9799]	222	222	96%	4E-56
type 11 methyltransferase [Verminephrobacter eiseniae EF01-2]	222	222	81%	4E-56
SAM-dependent methyltransferase [Alteromonas macleodii ATCC 27126]	222	222	96%	4E-56
SAM-dependent methyltransferase [Marinobacter algicola DG893]	221	221	95%	6E-56
SAM-dependent methyltransferase [gamma proteobacterium IMCC2047]	221	221	98%	7E-56
Methyltransferase domain family protein [marine gamma proteobacterium HTCC2148]	221	221	94%	1E-55
hypothetical protein HDN1F_16660 [gamma proteobacterium HdN1]	220	220	96%	1E-55
hypothetical protein Shew_2113 [Shewanella loihica PV-4]	219	219	92%	4E-55
SAM-dependent methyltransferase [Marinomonas posidonica IVIA-Po-181]	219	219	90%	4E-55
SAM-dependent methyltransferase [Oceanobacter sp. RED65]	218	218	90%	6E-55
SAM-dependent methyltransferase [Marinomonas sp. MWYL1]	217	217	90%	9E-55
S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase [Shewanella piezotolerans WP3]	217	217	86%	1E-54
generic methyl-transferase [Marinobacter adhaerens HP15]	216	216	98%	2E-54
type 11 methyltransferase [Delftia acidovorans SPH-1]	215	215	79%	3E-54
type 11 methyltransferase [Acidovorax citrulli AAC00-1]	215	215	81%	5E-54
conserved hypothetical protein [Arsenophonus nasoniae]	215	215	91%	6E-54
methyl-transferase [Neisseria sicca ATCC 29256]	214	214	89%	1E-53
generic methyl-transferase [Methylophilales bacterium HTCC2181]	213	213	85%	1E-53
methyl-transferase [Nitrococcus mobilis Nb-231]	213	213	92%	1E-53
generic methyl-transferase [Reinekea sp. MED297]	212	212	94%	4E-53
generic methyl-transferase [Saccharophagus degradans 2-40]	212	212	91%	4E-53
SAM-dependent methyltransferase [Teredinibacter turnerae T7901]	211	211	96%	6E-53
SAM-dependent methyltransferase [Marinobacter sp. ELB17]	210	210	94%	1E-52
methyl-transferase [Neisseria subflava NJ9703]	210	210	87%	1E-52
methyl-transferase [Neisseria flavescens SK114]	208	208	87%	7E-52
methylase involved in ubiquinone/menaquinone biosynthesis [Idiomarina sp. A28L]	208	208	96%	7E-52
conserved hypothetical protein [Neisseria cinerea ATCC 14685]	208	208	89%	9E-52
hypothetical protein ABO_1223 [Alcanivorax borkumensis SK2]	207	207	92%	1E-51

generic methyl-transferase [marine gamma proteobacterium HTCC2143]	206	206	92%	2E-51
hypothetical protein NEFLAOT_00643 [Neisseria flavescens NRL30031/H210]	205	205	87%	7E-51
methyltransferase type 11 [Neisseria sp. oral taxon 014 str. F0314]	204	204	88%	1E-50
hypothetical protein Tcr_0927 [Thiomicrospira crunogena XCL-2]	204	204	92%	1E-50
hypothetical protein ADG881_1798 [Alcanivorax sp. DG881]	203	203	95%	2E-50
methyl-transferase [Neisseria mucosa C102]	202	202	87%	3E-50
SAM-dependent methyltransferase [gamma proteobacterium IMCC1989]	201	201	92%	8E-50
hypothetical protein NMC1233 [Neisseria meningitidis FAM18]	201	201	83%	9E-50
methyl-transferase [Neisseria mucosa ATCC 25996]	201	201	89%	1E-49
SAM-dependent methyltransferase [gamma proteobacterium NOR5-3]	201	201	92%	1E-49
generic methyl-transferase [Oceanospirillum sp. MED92]]	201	201	96%	1E-49
putative methyltransferase [Neisseria meningitidis 8013]	200	200	83%	1E-49
hypothetical protein NMXN1568_0859 [Neisseria meningitidis N1568]	200	200	82%	1E-49
hypothetical protein NEIPOLOT_01527 [Neisseria polysaccharea ATCC 43768]	200	200	83%	2E-49
hypothetical protein NMBM0579_0933 [Neisseria meningitidis M0579]	199	199	83%	3E-49
hypothetical protein PMI0226 [Proteus mirabilis HI4320]	199	199	84%	4E-49
hypothetical protein NMBM01240013_0975 [Neisseria meningitidis M01-240013]]	199	199	83%	4E-49
hypothetical protein NMO_1137 [Neisseria meningitidis alpha14]	198	198	83%	5E-49
conserved hypothetical protein [Neisseria meningitidis M01-240149]	198	198	83%	9E-49
hypothetical protein NGO0609 [Neisseria gonorrhoeae FA 1090]	198	198	83%	9E-49
hypothetical protein NMB1296 [Neisseria meningitidis MC58]	197	197	83%	1E-48
hypothetical protein NMBOX9930304_0857 [Neisseria meningitidis OX99.30304]	196	196	83%	2E-48
unnamed protein product [Neisseria lactamica Y92-1009]	196	196	82%	3E-48
hypothetical protein Csp_A10660 [Curvibacter putative symbiont of Hydra magnipapillata]	195	195	63%	4E-48
SmtA protein [Aggregatibacter actinomycetemcomitans D7S-1]	195	195	91%	4E-48
SmtA protein [Aggregatibacter actinomycetemcomitans D11S-1]	195	195	91%	8E-48
conserved hypothetical protein [Neisseria meningitidis M01-240355]	195	195	83%	8E-48
conserved hypothetical protein	194	194	89%	9E-48
methyltransferase [Coxiella burnetii RSA 493]	193	193	94%	1E-47
methyltransferase [Coxiella burnetii Dugway 5J108-111]	193	193	94%	2E-47
SmtA protein [Aggregatibacter aphrophilus NJ8700]	193	193	91%	2E-47

methyltransferase [Coxiella burnetii CbuG_Q212]	193	193	94%	3E-47
putative methyltransferase [Coxiella burnetii RSA 331]	193	193	94%	3E-47
conserved hypothetical protein [Neisseria lactamica ATCC 23970]	192	192	82%	4E-47
hypothetical protein NLA_11310 [Neisseria lactamica ST-640]	192	192	83%	4E-47
putative methyltransferase [Coxiella burnetii 'MSU Goat Q177']	192	192	88%	4E-47
metallothionein SmtA [Aggregatibacter segnis ATCC 33393]	192	192	91%	5E-47
SAM-dependent methyltransferase [Idiomarina loihiensis L2TR]	190	190	96%	2E-46
hypothetical protein PM0686 [Pasteurella multocida subsp. multocida str. Pm70]]	190	190	94%	2E-46
hypothetical protein HMPREF9464_02139 [Sutterella wadsworthensis 3_1_45B]	188	188	96%	6E-46
hypothetical protein GB2207_02767 [marine gamma proteobacterium HTCC2207]	188	188	91%	7E-46
hypothetical protein Salmonentericaenterica_32668 [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi str. E01-6750]	188	188	66%	8E-46
metallothionein SmtA [Pasteurella dagmatis ATCC 43325]	188	188	88%	9E-46
generic methyl-transferase [beta proteobacterium KB13]	187	187	84%	1E-45
SAM-dependent methyltransferase [Idiomarina baltica OS145]	185	185	96%	4E-45
metallothionein SmtA [Haemophilus parainfluenzae ATCC 33392]	185	185	91%	4E-45
generic methyl-transferase [Endoriftia persephone 'Hot96_1+Hot96_2']	184	184	62%	1E-44
hypothetical protein NMCC_1209 [Neisseria meningitidis 053442]	183	183	76%	2E-44
Methyltransferase type 11 [Candidatus Liberibacter solanacearum CLso-ZC1]	182	182	91%	4E-44
predicted S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase [Haemophilus parainfluenzae T3T1]	182	182	91%	4E-44
methyltransferase type 11 [Halothiobacillus neapolitanus c2]	182	182	94%	5E-44
putative methyltransferase [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi str. AG3]	179	179	54%	3E-43
hypothetical protein EIKCOROL_00808 [Eikenella corrodens ATCC 23834]	178	178	87%	6E-43
methyltransferase type 11 [Burkholderia sp. TJI49]	177	177	60%	1E-42
Methyltransferase domain protein [Ochrobactrum intermedium LMG 3301]	177	177	94%	2E-42
methyltransferase type 11, putative [gamma proteobacterium HTCC5015]	176	176	92%	2E-42
type 11 methyltransferase [Actinobacillus succinogenes 130Z]]	176	176	87%	3E-42
SAM-dependent methyltransferase [Glaciecola sp. HTCC2999]	175	175	96%	5E-42
conserved hypothetical protein [Neisseria meningitidis G2136]	175	175	70%	6E-42
type 11 methyltransferase [Halorhodospira halophila SL1]	174	174	91%	1E-41

Methyltransferase type 11 [Methylobacter tundripaludum SV96]	174	174	93%	1E-41
hypothetical protein SIAM614_26768 [Stappia aggregata IAM 12614]	173	173	90%	2E-41
SAM-dependent methyltransferase [marine gamma proteobacterium HTCC2080]	173	173	91%	2E-41
Methyltransferase domain family [Labrenzia alexandrii DFL-11]	173	173	90%	2E-41
type 11 methyltransferase [Ochrobactrum anthropi ATCC 49188]	173	173	92%	2E-41
Methyltransferase domain protein [Brucella sp. 83/13] >ref ZP_06095719.1 methyltransferase type 11	173	173	92%	3E-41
hypothetical protein Thicy_0688 [Thioalkalimicrobium cyclicum ALM1]	172	172	81%	4E-41
Methyltransferase domain protein [Brucella sp. BO1]	172	172	92%	5E-41
Methyltransferase domain protein [Brucella ceti str. Cudo]	171	171	92%	1E-40
methyltransferase [Brucella sp. F5/99]	171	171	92%	1E-40
hypothetical protein AAUPMG_04099 [Pasteurella multocida subsp. multocida str. Anand1_goat]	171	171	66%	1E-40
SAM-dependent methyltransferase in cluster with Hydroxyacylglutathione hydrolase [gamma proteobacterium IMCC3088]	170	170	94%	1E-40
hypothetical protein BR1986 [Brucella suis 1330]	170	170	92%	2E-40
ATP synthase subunits region ORF 4 [Brucella suis ATCC 23445]	170	170	92%	2E-40
methyltransferase [Brucella melitensis bv. 1 str. 16M]	169	169	92%	3E-40
Methyltransferase domain protein [Brucella ceti M644/93/1]	169	169	92%	4E-40
hypothetical protein Atu3613 [Agrobacterium tumefaciens str. C58]	165	165	92%	4E-39
hypothetical protein RSP_2295 [Rhodobacter sphaeroides 2.4.1]	165	165	90%	5E-39
Methyltransferase type 11 [Candidatus Liberibacter asiaticus str. psy62]	165	165	88%	5E-39
hypothetical protein AGRO_0580 [Agrobacterium sp. ATCC 31749]	165	165	92%	6E-39
methyltransferase [Agrobacterium sp. H13-3]	164	164	92%	1E-38
hypothetical protein NMBB_1426 [Neisseria meningitidis alpha710]	164	164	55%	1E-38
hypothetical protein Rsph17025_2205 [Rhodobacter sphaeroides ATCC 17025]	161	161	92%	1E-37
hypothetical protein Agau_L100201 [Agrobacterium tumefaciens F2]	160	160	92%	1E-37
ATP synthase subunits region ORF 4 [Ruegeria sp. R11]	160	160	88%	1E-37
hypothetical protein ROS217_14286 [Roseovarius sp. 217]	159	159	87%	3E-37
hypothetical protein RGBS107_19798 [Phaeobacter gallaeciensis BS107]	159	159	88%	4E-37
hypothetical protein RG210_12225 [Phaeobacter gallaeciensis 2.10]	158	158	88%	5E-37

hypothetical protein BthaA_10106 [Burkholderia thailandensis E264]	158	158	57%	6E-37
putative methyltransferase [Acidiphilium multivorum AIU301]	158	158	85%	7E-37
generic methyl-transferase [Salinisphaera shabanensis E1L3A]]	158	158	90%	7E-37
type 11 methyltransferase [Acidiphilium cryptum JF-5]	158	158	85%	8E-37
hypothetical protein RTM1035_13798 [Roseovarius sp. TM1035]	156	156	87%	2E-36
methyltransferase type 11 [Rhizobium leguminosarum bv. trifolii WSM1325]	156	156	92%	2E-36
hypothetical protein Avi_4035 [Agrobacterium vitis S4]	156	156	91%	3E-36
type 11 methyltransferase [Mesorhizobium opportunistum WSM2075]	156	156	94%	4E-36
methyltransferase type 11 [Rhizobium leguminosarum bv. trifolii WSM2304]	155	155	92%	4E-36
generic methyl-transferase [Legionella pneumophila subsp. pneumophila str. Philadelphia 1]	155	155	79%	4E-36
hypothetical protein HPDFL43_16921 [Hoeftlea phototrophica DFL-43]	155	155	92%	5E-36
hypothetical protein RL4339 [Rhizobium leguminosarum bv. viciae 3841]	155	155	92%	5E-36
putative methyltransferase protein [Rhizobium etli CNPAF512]	155	155	92%	6E-36
methyltransferase [Rhizobium etli CIAT 652] >ref ZP_03513963.1 putative methyltransferase	155	155	92%	7E-36