UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

(Bioquímica)

Eliezer Stefanello

Fatores envolvidos com a mobilização de PAPI-1

São Paulo

09/04/2010

Eliezer Stefanello

Fatores envolvidos com a mobilização de PAPI-1

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Ciências
(Bioquímica)*

Orientadora: Prof^a Dr^a Regina Lúcia Baldini

São Paulo

2010

Eliezer Stefanello

Fatores envolvidos com a mobilização de PAPI-1

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Ciências
(Bioquímica)*

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

*Aos meus pais por me ensinarem
que não existe recompensa sem
luta, e por me apoiarem sempre.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Rudimar e Maria que me deram a vida, educação, puxões de orelha quando necessário e por respeitarem minhas decisões mesmo quando julgaram não ser a melhor escolha.

A minha irmã Luiza, por me aturar durante seus 16 anos de vida. Te adoro maninha!

À Dra Regina Baldini, pela grande paciência, dedicação e disponibilidade e simpatia durante a convivência enquanto este trabalho era desenvolvido.

Aos amigos do grupo da professora Regina: Ana Paula, Ana Laura, Diogo, Gian, Gilberto e Patrícia por ajudarem sempre quando necessário e pelos momentos de descontração dentro e fora do laboratório.

Aos amigos Feto, Sinistro, Valdir, Felipe, Seninha, Pererê, Guilherme e Rodrigo pelos ótimos momentos nas diversas repúblicas que morei.

À Dra Suely Lopes Gomes pela disponibilidade do espaço físico e de materiais necessários para que esse trabalho fosse possível.

Ao professor Dr Chuck Shaker Farah, por ceder a biblioteca de duplo-híbrido, aos alunos Maxuel, Cristiane e Claudia pelo auxílio com os ensaios.

Ao pessoal do grupo da professora Suely: André, Anne, César, Cristian, Gabriela, Karina, Raphaela, Rogério, Michele pelas discussões e dicas de trabalho, conversas agradáveis e almoços no bandeirão nosso de cada dia.

As professoras, Dra Rita de Cássia Garcia Simão, pela orientação durante minha graduação como seu aluno de iniciação científica e por ter aberto as portas para eu chegar até aqui; a professora Dra Marina Kimiko Kadowaki e a professora Dra Clarisse Aoki Osaku por me dar as bases em Bioquímica e me emprestarem o material por onde estudei para a prova de ingresso no IQ-USP. Ao professor Dr Vladimir Pavan Margarido que me deu as bases de genética molecular e pelas longas horas de conversa sobre ciência entre outras coisas durante minha graduação.

Sandra, Marivon, Luci, pelo trabalho de base além da paciência.

Aos funcionários da secretaria de pós- graduação, Cibele, Emiliano e Milton pela atenção, ajuda e eficiência sempre que necessário.

Aos meus grandes amigos do Paraná que sempre me aturaram e me fizeram feliz durante minha vida e que sempre faziam minha curta passagem por casa nos feriados bastante movimentada.

A Dominice Lanzarini, com quem compartilhei alegrias, tristezas, frustrações e descobertas durante 3 excelentes anos da minha vida. Te respeitarei sempre.

Ao CNPq e a FAPESP pelo apoio financeiro.

RESUMO

Stefanello, E. **Fatores envolvidos com a mobilização de PAPI-1**. Ano: 2010. 99 páginas. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Genomas bacterianos são extremamente dinâmicos e boa parte dessa dinâmica ocorre devido a transferência horizontal e aquisição de DNA exógeno, um processo natural e fundamental para a evolução, adaptação e diversificação dos microrganismos. Ilhas genômicas são grandes regiões do cromossomo bacteriano adquiridas por transferência horizontal e estão presentes em apenas algumas linhagens, podendo conferir alguma vantagem adaptativa. Em *Pseudomonas aeruginosa*, até o momento foram caracterizadas pelo menos dezesseis ilhas genômicas e cada uma delas confere características diferentes a seus hospedeiros. Em *P. aeruginosa* UCBPP-PA14 (ou simplesmente PA14), encontram-se duas ilhas de patogenicidade denominadas PAPI-1 e PAPI-2, sendo a primeira a maior e a mais estudada, contendo 115 ORFs (“Open ReadinG Frame”, ou quadros abertos de leitura). Dentre estes, o gene *int* codifica uma integrase essencial para a excisão e integração de PAPI-1, e o gene *soj* é necessário para a manutenção da ilha na célula e é expresso apenas quando esta se encontra na forma episomal. PAPI-1 codifica um provável sistema de secreção tipo IV (T4SS), similar ao do elemento móvel ICE*Hin1056*, responsável pela transferência deste para outras bactérias. O objetivo deste trabalho foi identificar fatores genéticos e ambientais que contribuem para a transferência de PAPI-1 entre linhagens de *P. aeruginosa*. Foi observado que os mutantes por transposon nos genes PAPI-1 PA14_59860, PA14_59880, PA14_59920 e PA14_59940 têm a frequência de transferência de PAPI-1 diminuída, mas os genes interrompidos nesses mutantes não são essenciais para a excisão da ilha. Também foi mostrado que os reguladores percepção de quorum RhlR e MvfR têm influência na expressão do gene *int*, mas não de *soj*. O terceiro regulador de percepção de quorum, LasR, assim como

a proteína H-NS MvaT, não tem influência na expressão de *int* e de *soj*. Ensaios de RT-PCR quantitativos mostraram que o choque térmico aumentou os níveis do mRNA de *soj*, mas não de *int*, corroborando dados previamente sugeridos pela literatura, que mostram uma maior frequência de transferência de PAPI-1 nessas condições. Também foi analisado se o segundo mensageiro celular em bactérias, c-di-GMP, poderia contribuir para a excisão/manutenção de PAPI-1. Alterações nas concentrações deste segundo mensageiro pela superexpressão de proteínas responsáveis por sua síntese ou degradação não foram capazes de afetar a excisão/manutenção de PAPI-1. Houve diminuição na frequência de transferência de PAPI-1 a partir de linhagens doadoras superexpressando uma diguanilato ciclase ou uma fosfodiesterase de c-di-GMP, mas provavelmente este efeito não se deve aos níveis alterados desse segundo mensageiro. Em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* 306 (XAC), uma região de 86 kb possui uma grande semelhança com PAPI-1 na organização dos genes. Além disso, possui uma série de ORFs relacionados aos genes “core” que definem uma família de ilhas genômicas sintênicas das quais PAPI-1 faz parte. Entretanto, os genes acessórios encontrados entre os blocos de genes conservados varia muito entre PAPI-1 e a região de XAC. Foi determinado que esta região de XAC não pode se excisar do cromossomo nas condições analisadas. Por fim, com o intuito de verificar as possíveis interações entre os produtos dos genes conservados em PAPI-1 e XAC, ensaios de duplo-híbrido foram realizados, porém não foi possível determiná-las, visto que apenas resultados falsos positivos foram obtidos. Este trabalho mostrou pela primeira vez que a percepção de quorum está envolvida com a expressão de *soj* e determinou uma extensa similaridade entre essa ilha e uma região do genoma de XAC.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* 306, Ilhas Genômicas, Percepção de Quorum, c-di-GMP, Transferência Horizontal.

ABSTRACT

Stefanello, E. **Factors involved with PAPI-1 mobilization**. Year: 2010. 99 pages. Master Thesis. Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Bacterial genomes are extremely dynamic mostly because of horizontal gene transfer, a natural and fundamental process for evolution, adaptation and diversification of microorganisms. Genomic islands are large DNA segments acquired by horizontal gene transfer which are present only in a few strains and may confer some adaptative advantage. At least sixteen genomic islands have been characterized in *Pseudomonas aeruginosa* to date and each confers different characteristics to its host strain. *P. aeruginosa* UCBPP-PA14 (PA14) harbors two pathogenicity islands named PAPI-1 and PAPI-2. PAPI-1 is the largest one, carrying 115 open reading frames (ORFs). Among these, *int* codes for an integrase essential for PAPI-1 excision and integration, and *soj* is required for maintaining PAPI-1 in the cells, being expressed only when this island is in an episomal, circular form. PAPI-1 also harbors genes coding for a type four secretion system (T4SS) similar to the mobile element ICEHin1056, which is responsible for transferring this element to other bacteria. In this work, we show that transposon insertion in PAPI-1 genes PA14_59860, PA14_59880, PA14_59920 and PA14_59940 lowered the frequency of conjugation of PAPI-1 from PA14 to other bacteria, but those genes were not essential for PAPI-1 excision. Quorum sensing regulators RhlR and MvfR had a role in *int* expression, but did not alter *soj* transcription. The third quorum sensing regulator LasR, as well as the H-NS protein MvaT, did not alter both *int* and *soj* expression. Quantitative RT-PCR assays showed that cells incubated at heat shock conditions present higher levels of *soj* mRNA, confirming published data that showed an increase in PAPI-1 transfer in these conditions. It was also analyzed whether the second messenger c-di-GMP would contribute to PAPI-1 excision/maintenance. Changes in the levels of this second messenger in cells overexpressing proteins responsible for its synthesis

or degradation did not affect PAPI-1 excision and maintenance. A decrease in PAPI-1 transfer frequency was detected when those cells were used as donors in conjugation, but this effect cannot be attributed to the altered c-di-GMP levels. In *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* 306 (XAC), an 86 kb genome region shares similarity with PAPI-1 regarding gene homology and organization. It also carries ORFs related to the core genes that define a syntenic family of genomic islands that includes PAPI-1. Nevertheless, the accessory genes dispersed among the clusters of conserved genes are not related, when comparing PAPI-1 and this region in XAC. An episomal form of this putative XAC island could not be detected in the conditions tested in this work. Finally, in order to verify interactions involving the conserved proteins in PAPI-1 and XAC, two hybrid assays were carried out, but only false positives results were obtained.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* 306, Genomic Island, Quorum Sensing, c-di-GMP, Horizontal Gene Transfer.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Características gerais de ilhas genômicas	14
1.2 Mecanismos de transferência de ilhas genômicas	15
1.3 Arquitetura e funcionamento dos Sistemas de Secreção Tipo IV	17
1.4 Ilhas genômicas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
1.4.1 Ilhas na linhagem PA14.	28
1.5 O segundo mensageiro c-di-GMP	34
1.6 Percepção de quorum em <i>P. aeruginosa</i>	35
1.7 O regulador global MvaT.....	37
2. OBJETIVOS	39
3. MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 Linhagens e condições de cultura	40
3.2 Técnicas básicas de biologia molecular	43
3.3 Verificação de genes necessários para a excisão de PAPI-1 do cromossomo	45
3.4 Influência da fase de crescimento na excisão de PAPI-1	46
3.5 Análise do papel dos genes de PAPI-1 na mobilização para outra linhagem de <i>P. aeruginosa</i>	47
3.6 Influência da percepção de quorum na excisão/manutenção de PAPI-1.	48
3.7 Influência de diferentes concentrações do segundo mensageiro c-di-GMP na excisão/manutenção de PAPI-1.	49
3.8 Influência de estresse térmico na excisão/manutenção de PAPI-1.	49
3.9 Ensaios de PCR quantitativo (qPCR)	50
3.10 Construção das linhagens superexpressando PvrR e PA14_72420.....	50
3.11 Detecção da ilha de XAC na forma episomal	51
3.12 Ensaio de interação proteína-proteína – duplo híbrido	52
3.12.1 Escolha das iscas	52
3.12.2 Clonagem das iscas.....	52
3.12.3 Transformação rápida em levedura.....	53
3.12.4 Teste de auto-ativação para as iscas.	53
3.12.5 Transformação com a biblioteca de duplo-híbrido.	54
3.12.6 Isolamento do DNA Plasmidial da levedura.....	55

3.12.7	Transformação do DNA plasmidial em <i>E. coli</i>	55
3.12.8	Extração de plasmídeo dos transformantes em <i>E. coli</i> KC8.	56
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1	Papel dos genes PA14_59710, PA14_59860, PA14_59880, PA14_59920 e PA14_59940 e da fase de crescimento na excisão de PAPI-1.....	58
4.2	Ensaio de transferência de PAPI-1 para linhagem receptora PAO1.....	62
4.3	Influência da percepção de quorum na excisão/manutenção de PAPI-1.	65
4.4	Influência do mutante de <i>mvaT</i> na frequência de excisão/manutenção de PAPI-1.....	69
4.5	Influência de diferentes concentrações do segundo mensageiro c-di-GMP na excisão/manutenção de PAPI-1.	71
4.6	Ensaio de transferência de PAPI-1 em linhagens superexpressando uma diguanilato ciclase ou fosfodiesterase.....	74
4.7	Influência de Estresse Térmico na Excisão/Manutenção de PAPI-1.....	75
4.8	Comparação entre PAPI-1 e a provável ilha genômica de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> 306.....	77
4.8.1	Ensaio de Excisão da ilha de XAC.	82
4.9	Ensaios de duplo-híbrido.....	83
4.9.1	Transformação rápida de levedura com o plasmídeo pOBD contendo a isca.	84
4.9.2	Ensaio de auto-ativação das iscas.	84
4.9.3	Triagem das iscas utilizando o ensaio de duplo-híbrido.....	85
4.9.4	Análise dos clones positivos.....	87
5.	CONCLUSÕES.....	91
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

1. INTRODUÇÃO

Existe uma visão contraditória entre nossa percepção de como os microrganismos são extremamente dinâmicos e altamente responsivos ao meio ao qual estão inseridos, e a percepção do genoma destes organismos como uma estrutura estática que deve evoluir através de longos períodos por intermédio da seleção natural. Com o crescente número de genomas bacterianos sequenciados, especialmente os genomas de várias cepas de uma mesma espécie, tem ficado cada vez mais evidente através de estudos de genômica comparativa que a seleção natural pode levar a uma mudança significativa na população bacteriana num curto período de tempo (Guttman 2009).

Muito disso se deve a transferência horizontal de genes, um processo natural de importância fundamental para a evolução, adaptação e diversificação dos microrganismos (Lima, et al. 2005; Murphy & Boyd 2008). Grande parte da flexibilidade, adaptabilidade e evolução dos genomas ocorre através de aquisição ou perda de fragmentos de DNA. Essas regiões de plasticidade genômica, ou ilhas genômicas, deixam cada vez mais evidente que a dinâmica evolutiva bacteriana ocorre principalmente por meio deste tipo de genoma acessório, estimando-se que entre 1,6% a 32,6% de cada genoma bacteriano tenha sido adquirido por transferência horizontal (Koonin, et al. 2001; Mohd-Zain, et al. 2004; Juhas, et al. 2007; Mathee, et al. 2008; Battle, et al. 2009; Sentchilo, et al. 2009). Entretanto, estudos mais recentes, utilizando uma rede de análises de genes compartilhados entre 181 genomas bacterianos sequenciados, estes valores aumentam consideravelmente para $81 \pm 15\%$ se o impacto cumulativo da transferência horizontal durante todo o processo de evolução das linhagens é considerada, o que reforça a importância deste mecanismo na evolução dos microrganismos (Dagan, et al. 2008).

Apesar do mecanismo de transferência genética entre organismos ser conhecido desde meados da década de 40, com a descoberta do aparato de conjugação do plasmídeo F de *E. coli* (Tatum & Lederberg 1947), apenas a partir da década de 90, com a explosão da genômica, este fenômeno ganhou visibilidade crescente e se destacou como uma das forças mais importantes da evolução (Boto 2009).

Entretanto, a transferência horizontal de genes não é um processo exclusivo de bactérias, podendo acontecer em Archaea e até mesmo em Eucariotos. Além disso, transferências entre estes diferentes domínios também foi documentada, podendo ser entre bactérias e Archaea e também entre bactérias e eucariotos (Boto 2009). Mas é apenas na evolução de bactérias e Archaea que a transferência horizontal de genes é um processo que pode ser acompanhado conforme ela está acontecendo e é amplamente documentada.

1.1 Características gerais de ilhas genômicas

Ilhas genômicas são essencialmente fragmentos discretos de DNA que estão presentes em apenas algumas linhagens de bactérias relacionadas, e que geralmente possuem ou possuíram algum tipo de mobilidade. Muitas ilhas genômicas conhecidas até o momento compartilham a grande maioria das características a seguir (Figura 1):

- (1) Segmentos relativamente grandes de DNA, variando entre 10 e 200 kb;
- (2) Possuem conteúdo G+C que difere do restante do genoma;
- (3) Encontram-se inseridas próximas a um gene que codifica um tRNA, neste caso sendo provável que essas ilhas sejam elementos móveis;
- (4) São flanqueadas por repetições diretas perfeitas ou quase perfeitas de tamanhos variáveis. Elas são originadas através da integração sítio-específico e também podem atuar como sequências de reconhecimento para sua excisão enzimática;

- (5) Possuem genes funcionais ou crípticos que codificam integrases ou fatores relacionados a sistemas de conjugação de plasmídeos ou fagos;
- (6) Comumente apresentam elementos de inserção ou transposons, que possivelmente estão relacionados com a mobilização ou deleção de material genético;
- (7) Carregam genes que conferem alguma vantagem seletiva para a bactéria hospedeira. De acordo com seu conteúdo, elas podem ser conhecidas como ilhas de patogenicidade, simbiose, metabólica ou ilha de resistência (Juhas, et al. 2008).

Figura 1 – Características gerais de ilhas genômicas. Ilhas genômicas são segmentos relativamente grandes de DNA que as características de seus nucleotídeos geralmente diferem do restante do cromossomo. Normalmente se encontram próximos a um gene de tRNA e são flanqueadas por repetições diretas (DR). Também possuem genes que codificam para fatores envolvidos em mobilidade, como integrases, transposons e elementos de inserção (IS). Dependendo de seu conteúdo gênico elas podem ser chamadas de ilhas de patogenicidade, simbiose, metabólicas ou ilhas de resistência. Adaptado de Juhas *et al*, 2008 (Juhas, et al. 2008).

1.2 Mecanismos de transferência de ilhas genômicas

Os genes podem ser transferidos através mecanismos como conjugação, transdução e a transformação natural (Hacker & Carniel 2001). Dentre estes mecanismos, o mais importante é a conjugação, que é feito por intermédio de um Sistema de Secreção Tipo IV (T4SS, do inglês “*type 4 secretion system*”), que consiste de um aparato de transferência de proteínas e/ou material genético, semelhante a um pilus.

Sistemas de Secreção Tipo IV são capazes de translocar tanto proteínas quanto DNA e outros efetores através do envelope celular e pode ser dividido em três subfamílias: (i) sistemas de conjugação, definidos como translocadores de DNA para células receptoras através de um processo dependente de contato; (ii) sistema de entrega de proteínas efetoras, cuja função é translocar proteínas ou outros efetores nas células alvo; e (iii) sistema de liberação de DNA para o meio extracelular ou captura de DNA do meio externo (Cascales & Christie 2004; Backert & Meyer 2006; Juhas, et al. 2008; Alvarez-Martinez & Christie 2009; Tseng, et al. 2009). Estas três subfamílias podem contribuir para a patogenicidade da bactéria.

O sistema de conjugação é a maior e mais bem distribuída subfamília de T4SS, podendo ser encontrado na maioria das espécies de bactérias e também em alguns membros de Archaea. Atualmente, existem três classificações diferentes para os T4SS: a primeira classificação é baseada em grupos de incompatibilidade (Inc), de acordo com o plasmídeo conjugativo ao qual o sistema está relacionado. A incompatibilidade é uma propriedade referente à tendência de um plasmídeo inibir a replicação de um elemento possuindo um sistema de replicação idêntico ou proximamente relacionado. Estes grupos de incompatibilidade foram nomeados de tipo F, para IncF (plasmídeo F); tipo P, para IncP (plasmídeo RP4) e tipo I, para IncI (plasmídeo R64) (Lawley, et al. 2003). Entretanto, essa classificação não engloba todos os elementos móveis descritos atualmente.

A segunda classificação reconhece dois grandes grupos bem caracterizados; o tipo IVA e o tipo IVB e ainda um terceiro, denominado “outros”. O tipo IVA engloba os tipos F e

P mencionados acima e o IVB apenas o tipo I, do qual se conhece relativamente pouco a respeito. Isto é justificado devido aos componentes deste sistema serem altamente divergentes daqueles do grupo IVA. O tipo “outros” não havia sido muito bem caracterizado como os do tipo IVA (Christie, et al. 2005).

Uma terceira e mais recente classificação se baseia nos tipos IVA e IVB, com um terceiro grupo, que engloba sistemas presentes em várias ilhas genômicas, enquadrados anteriormente no grupo “outros”. Este grupo foi, portanto denominado GI (do inglês “*Genomic Island*”) e é baseado na homologia ao T4SS responsável pela transferência do elemento móvel ICEHin1056 de *Haemophilus influenzae* (Juhas, et al. 2007; Juhas, et al. 2008). Cabe ressaltar que o sistema presente em ICEHin1056 foi caracterizado apenas geneticamente, não existindo ainda nenhuma evidência bioquímica ou estrutural de que os produtos de seus genes componham de fato um aparato de secreção e transferência de DNA e/ou proteínas.

1.3 Arquitetura e funcionamento dos Sistemas de Secreção Tipo IV

Apesar de variarem em relação ao número de subunidades e composição protéica entre os sistemas de conjugação de bactérias Gram-negativas, grande parte deles são compostos de elementos relacionados ao T4SS de *A. tumefaciens*. O sistema pode ser dividido em três partes, sendo formado por (i) subunidades energéticas, (ii) componentes do canal e (iii) componentes do pilus, como mostrado na figura 2 (Cascales & Christie 2003).

O primeiro sistema de transferência genética a ser identificado foi o pilus sexual F, codificado pelo plasmídeo F de *E. coli* K-12, posteriormente classificado como um sistema de secreção tipo IV (Lawley, et al. 2003). Entretanto, o T4SS mais bem estudado e utilizado como modelo para o estudo desse tipo de sistema de transferência é o sistema VirB/D4 codificado pelo plasmídeo Ti de *Agrobacterium tumefaciens*, agente causador da doença de

plantas conhecida como crista de galo. O T4SS de *A. tumefaciens* é codificado pelos operons *virB* e *virD*. O operon *virB* possui 11 genes e seus produtos formam uma estrutura necessária para a transferência genética, que atravessa as membranas bacterianas, sendo conhecidos como proteínas de conjugação ou Mpf (do inglês “*mating pair formation*”). O operon *virD* possui 5 genes, sendo que *virD1* e *virD2* codificam proteínas que fazem o processamento do DNA para a transferência (T-DNA), *virD3* e *virD5* codificam proteínas não essenciais para o processo de transferência e *virD4* codifica a proteína de conjugação VirD4 (Cascales & Christie 2003; Christie 2004; Alvarez-Martinez & Christie 2009).

VirD4 não está envolvida no processamento do T-DNA ou na biogênese do pilus conjugativo, mas age junto com as proteínas de conjugação para transportar o substrato através do envelope celular. Esta proteína é o elo de ligação entre o relaxossomo, que consiste no DNA desenovelado associado a proteínas de transferência, e o pilus de transferência. As proteínas semelhantes a VirD4 são uma família de ATPases associados a praticamente todos os sistemas de conjugação conhecidos, além de vários sistema de transporte de proteínas efetoras (Cascales & Christie 2004). Entre as proteínas semelhantes a VirD4, incluem-se TrwB, presente no plasmídeo R388; TraG, presente no plasmídeo RP4 e TraD, presente no plasmídeo F. De uma forma geral, essas proteínas possuem três domínios: um domínio transmembrana N-terminal (TM), um domínio de ligação a nucleotídeos (NBD) e um domínio todo α (AAD) formado apenas por alfas-hélices com estrutura parecida com a de um cogumelo e que aparentemente é o domínio responsável por se ligar ao DNA. Análises de cristalografia por raios-X mostram que seis protômeros de VirD4 se associam, formando uma estrutura esférica na porção citoplasmática que lembra a forma da subunidade F₁-ATPase (Gomis-Ruth, et al. 2001).

Figura 2 – Localização das proteínas do sistema de secreção tipo IV de *A. tumefaciens*. Os componentes do canal (VirB2 à VirB11) e a proteína de conjugação (VirD4) estão representadas segundo sua função proposta: energética (VirD4, VirB4 e VirB11), componentes do canal (VirB6 a VirB10) e componentes do pilus (VirB2 e VirB5). VirB1 passa por um processamento no periplasma e então é exportada através da membrana para o meio externo. VirB2 sofre uma série de reações de ciclização e polimeriza formando o pilus conjugativo. VirB7, VirB9 e VirB10 formam um canal multimérico através da membrana externa. VirD4, VirB5, VirB8, VirB10 e VirB11 estão representados conforme suas estruturas moleculares completas ou apenas as porções solúveis já descritas. ME, membrana externa; MI, membrana interna; T4CP, do inglês “Type 4 Coupling Protein”. Adaptado de Alvarez-Martinez & Christie, 2009.

O processo de transferência de DNA começa com o processamento do DNA a ser transferido. Para elementos como ilhas genômicas, que estão integradas ao cromossomo da bactéria, é necessário que haja a excisão do cromossomo, formando o intermediário circular necessário para o processamento do DNA. Esta excisão é feita por meio de um complexo de tirosinas recombinases (codificadas por *int*), que se ligam ao DNA nos sítios *att*, fazendo a recombinação. Com o DNA circularizado, um conjunto de proteínas de transferência e de proteínas acessórias liga-se a uma origem de transferência (*oriT*) e convertem o DNA super enovelado em uma forma aberta e relaxada. Este complexo DNA-proteína é conhecido como relaxossomo e a subunidade protéica responsável pela clivagem do DNA é conhecida como

relaxase, codificada pelo gene *virD2* em *A. tumefaciens*, *traI* no plasmídeo F de *E. coli* K-12 ou TrwC do plasmídeo conjugativo R388 (Gomis-Ruth, et al. 2001; Cascales & Christie 2003; Christie 2004; Juhas, et al. 2008; Alvarez-Martinez & Christie 2009). Entre os componentes acessórios que formam o relaxossomo do plasmídeo F, está a proteína TraY, com domínio fita-hélice-fita ou RHR (do inglês “*ribbon-helix-ribbon*”) que induz um dobramento em um ângulo de 50 a 55° no DNA, necessário para a ligação da relaxase. Em *A. tumefaciens* a proteína acessória VirC1 recruta VirD2, juntamente com o T-DNA para a membrana citoplasmática nos pólos celulares e para o canal do T4SS. VirC1 é membro da superfamília das ATPases ParA/MinD, que contém um domínio Walker A (domínio de ligação a nucleotídeos trifosfatados), responsáveis pela segregação de plasmídeos de baixa cópia para os pólos celulares durante a divisão, e funciona como organizador central do relaxossomo além de interagir com as proteínas VirC2, VirD1, VirD2 e também com VirD4. O T-DNA, ao ser entregue à proteína VirD4, segue através do canal do T4SS até o seu destino (Figura 3) (Atmakuri, et al. 2007).

Figura 3 – Mecanismo de transferência de plasmídeos e elementos integrativos e conjugativos através de T4SS. Para a conjugação o ICE é (i) excisado do cromossomo por meio de integrases e então (ii) ocorre o processamento do intermediário circularizado do ICE ou do plasmídeo na origem de transferência (*oriT*) pelo relaxossomo. Na sequência, (iii) o T-DNA ligado a relaxase é conduzido para a proteína de conjugação (VirD4) e finalmente (iv) é translocado através do canal do T4SS. ME, membrana externa; MI, membrana interna, *att*, sítio de inserção do ICE; *Tra*, gene de transferência. Adaptado de Alvarez-Martinez & Christie, 2009.

1.4 Ilhas genômicas de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é uma γ -proteobactéria, amplamente distribuída na natureza e que pode ser encontrada tanto em ambientes terrestres quanto aquáticos. São organismos com uma grande versatilidade metabólica e adaptativa sendo capazes de colonizar diversos ambientes (Lyczak, et al. 2000). Devido a estas características, é capaz de infectar um grande espectro de organismos, incluindo fungos, o nematodo *Caenorhabditis elegans*, insetos, plantas e mamíferos (Mahajan-Miklos, et al. 1999; Lee, et al. 2006). Em seres humanos, infecções por *P. aeruginosa* estão geralmente associadas a queimaduras severas, fibrose

cística, ceratite ulcerativa, infecções do trato urinário, AIDS e câncer (Lyczak, et al. 2000; Battle, et al. 2009).

Esta grande variedade de ambientes e hospedeiros que *P. aeruginosa* é capaz de colonizar sugere uma grande plasticidade de seu genoma. Isto ficou ainda mais evidenciado quando Mathee e colaboradores (2008) compararam os genomas completos de cinco linhagens diferentes de *P. aeruginosa* (PAO1, PA14, PA2192, C3719 e PACS2) e definiram um genoma “core” comum com identidade entre seus genes de pelo menos 70%. Entretanto, os genomas carregam aproximadamente 10% de sequências únicas, que definiram 46 regiões de plasticidade genômica, denominadas RGP1 a RGP62 (do inglês “region of genomic plasticity”). Em muitas destas regiões de plasticidade, estão localizadas ilhas genômicas previamente descritas como, por exemplo, PAPI-1 localizada na RGP41 (Mathee, et al. 2008). Na Tabela 1, as principais ilhas genômicas de *P. aeruginosa* que foram caracterizadas estão comparadas. Pode se notar que existem alguns “hot spots” de inserção de ilhas genômicas em *P. aeruginosa*, como os dois genes de tRNA^{Lys} (PA0976.1 e PA4541.1).

Tabela 1 – Características das ilhas genômicas de *P. aeruginosa* descritas até o presente momento.

	Linhagem isolada	Loci de integração (referente à PAO1)	Tamanho (em pb)	Conteúdo G+C	Número de ORFs	Referência
pKLC102	Clone C	PA0976.1 (tRNA ^{Lys})	103.532	60,9%	105	Kiewitz, Larbig et al. 2000, Klockgether, Reva et al. 2004
pCLK106	Clone C	PA0976.1 (tRNA ^{Lys})	~100.000			Kiewitz, Larbig et al. 2000, Klockgether, Reva et al. 2004
PA0977-87	PAO1	PA0976.1 (tRNA ^{Lys})	8.901	53%	11	(Wolfgang, et al. 2003)
PAGI-1	Isolados de paciente com infecção urinária	PA2217	48.893	Primeiros ¾ 63,7% e último ¼ 54,7%	51	Liang, Pham et al. 2001
PAGI-2	Clone C	PA2819.3 (tRNA ^{Glu})	104.955	64,7%	111	Larbig, Christmann et al. 2002
PAGI-3	SG17M	PA2819.2 (tRNA ^{Gly})	103.304	59,2%	105	Larbig, Christmann et al. 2002
PAGI-4	Clone C	PA0976.1 (tRNA ^{Lys})	23.395	56%	24	Klockgether, Reva et al. 2004
PAGI-5	PSE9	PA0976.1 (tRNA ^{Lys})	96.276	59,6%	121	Battle, Meyer et al. 2008
PAGI-6	PSE9	PA5160.1 (tRNA ^{Trh})	44.302	60,6%	46	Battle, Meyer et al. 2008
PAGI-7	PSE9	PA3961	22.479	55,8%	20	Battle, Meyer et al. 2008
PAGI-8	PSE9	PA5149.1 (tRNA ^{Phe})	16.195	54,1%	12	Battle, Meyer et al. 2008
PAGI-9	PSE9	PA3835	6.581	61,6%	1	Battle, Meyer et al. 2008
PAGI-10	PSE9	PA2457	2.194	52,7%	1	Battle, Meyer et al. 2008
PAGI-11	PSE9	PA1934	2.003	50,5%	0	Battle, Meyer et al. 2008
PAPI-1	UCBPP-PA14	PA4541.1 (tRNA ^{Lys})	107.899	59,7%	115	He, Baldini et al. 2004
PAPI-2	UCBPP-PA14	PA0976.1 (tRNA ^{Lys})	10.722	56,4%	15	He, Baldini et al. 2004

pKLC102 e pCLK106. As primeiras ilhas genômicas identificadas em *P. aeruginosa* foram descobertas através de mapeamento genético de uma série de isolados de um paciente portador de fibrose cística que continha prevalentemente os clones C e K, sendo elas denominadas pKLC102 e pCLK106, respectivamente. Estes dois elementos podem ser encontrados tanto na forma episomal, bem como na forma integrada ao cromossomo. pCLK106 pode se integrar ao cromossomo em ambos os tRNA^{Lys} (loci PA0976.1 e PA4541.1 correspondentes ao genoma de PAO1), já pKLC102 apenas foi encontrada no tRNA^{Lys} PA4541.1 que fica próximo aos loci *pilA* e *phnAB* (Kiewitz, et al. 2000). Ambos os plasmídeos possuem um tamanho aproximado de 100 kb e também aparentam poucas diferenças entre si, predito através padrão de restrição de pKLC102 e pCLK106, o que leva a crer que possuem a mesma origem (Kiewitz, et al. 2000; Klockgether, et al. 2004). Somente pKLC102 foi sequenciada, apresentando 103.532 pb e 105 ORFs, sendo que 60 destas são hipotéticas ou de função desconhecida. Ao menos 18 genes foram identificados como envolvidos com conjugação, recombinação e reparo, por homologia com genes conhecidos, além disso, genes que codificam para um pilus encontra-se presente (*pilI* a *pilM*) (Klockgether, et al. 2004).

PA0977-87. Identificada em PAO1, esta ilha genômica possui em sua maior parte genes hipotéticos. Dentre os genes com função conhecida, ela carrega um gene de piocina e sua proteína de imunidade. Além destes, também possui genes com funções preditas como sendo envolvidas em recombinação e/ou reparo de DNA (Wolfgang, et al. 2003).

PAGI-1. Tendo como base o primeiro genoma de *P. aeruginosa* sequenciado, o da linhagem PAO1 (Stover, et al. 2000), uma série de hibridizações com vários isolados de um paciente com infecção urinária resultou na identificação de PAGI-1 (do inglês “*Pseudomonas aeruginosa Genomic Island 1*”) (Liang, et al. 2001). Diferentemente da maioria das ilhas genômicas, PAGI-1 não se encontra próxima a um gene de tRNA, mas aparentemente foi

incorporada por recombinação e substituição de uma sequência preexistente de 6.729 pb nas linhagens que não carregam PAGI-1, incluindo PAO1. Na extremidade final desta ilha, encontram-se os genes *pqiA* e *pqiB*, que são induzidos pelo herbicida paraquat, sob o controle dos reguladores SoxR e SoxS, que são proteínas de um sistema de dois componentes codificadas pelo genoma “core”. A função na detoxificação por meio de PqiA e PqiB ainda não é totalmente clara, entretanto além destes genes e um grande número de genes para desidrogenases com funções putativas presentes em PAGI-1 sugerem que esta ilha funciona na detoxificação celular de espécies reativas de oxigênio (Liang, et al. 2001; Schmidt & Hensel 2004).

PAGI-2 e PAGI-3. Análises subsequentes de *P. aeruginosa* clone C, um isolado das vias aéreas de um paciente com fibrose cística, e do clone SG17M, um isolado de ambiente aquático, revelaram a existência de duas ilhas genômicas. Estas duas ilhas são divididas em dois grandes blocos. O primeiro, próximo ao sítio *attL*, carregam os genes específicos de cada linhagem e o segundo bloco contém genes predominantemente hipotéticos sendo que 47 deles são comuns entre as duas ilhas. Ambas as ilhas apresentam genes característicos de ilhas genômicas como integrases, genes de recombinação e reparo, como topoisomerasas e proteínas Ssb. Em PAGI-2, alguns genes de sua parte específica aparentemente codificam proteínas de transporte de metais pesados, proteínas essenciais de biogênese de citocromo c e de proteínas relacionadas a liberação de dissulfetos e tióis. Além disso, proteínas de transporte de cátions, sistemas de dois componentes e um sistema de transporte que lhe dá capacidade de resistência a mercúrio, além de outros transportadores, estão presentes. Todas estas funções ainda não estão claras, mas os autores acreditam que a biogênese do citocromo c poderia facilitar a captura de ferro e a inativação de peróxidos, conferindo uma vantagem seletiva dentro do ambiente pulmonar de pacientes com fibrose cística. Já os genes de resistência a mercúrio devem ser importantes não para a patogenicidade, mas sim para sua sobrevivência

em ambientes que contêm metais pesados. Já na porção inicial de PAGI-3 predominam genes com funções metabólicas, como genes relacionados a transporte de aminoácidos, coenzimas e porfirinas, além de um grande número de enzimas putativas (Larbig, et al. 2002; Schmidt & Hensel 2004; Klockgether, et al. 2007).

PAGI-4. Encontrada no clone C, os 11 primeiros genes que esta ilha carrega, com exceção de *xerC*, são proteínas hipotéticas. Além disso, os dez primeiros são similares ao plasmídeo integrativo pKLC102 e o décimo primeiro é similar a PA0980 de PAO1. PAGI-4 possui ainda um transposon Tn4652 e uma subunidade putativa de um transportador ABC (Klockgether, et al. 2004).

PAGI-5. Em um isolado de *P. aeruginosa* altamente virulento tanto em modelo animal quanto em planta, denominado PSE9, foi encontrada PAGI-5. Entretanto, esta não foi a única ilha genômica encontrada nesta cepa altamente virulenta; juntamente com ela foram também descritas mais seis ilhas denominadas de PAGI-6 a -11. PAGI-5 foi a maior ilha genômica encontrada em PSE9 (Battle, et al. 2008). Baseando-se em comparação de sequências, PAGI-5 é relacionada a uma grande família de ilhas genômicas que inclui PAPI-1 (He, et al. 2004) (objeto deste estudo e será descrita posteriormente), PAPI-2 e ilhas ExoU, bem como pKLC102 (He, et al. 2004; Kulasekara, et al. 2006; Battle, et al. 2008). Deste grupo, PAGI-5 é mais relacionada a PAPI-1, compartilhando 79 de suas 121 ORFs. Em duas regiões denominadas de NR-I e NR-II, está concentrada a grande maioria dos genes diferentes de PAPI-1. Em NR-I, quatro de seus cinco genes são hipotéticos e o gene restante possui 25% de similaridade com uma metilase putativa de *Bacillus cereus*. Já NR-II contém 23 genes preditos, sendo que os nove primeiros não possuem similaridade com nenhuma sequência previamente caracterizada, sendo seguidas por um gene cujo produto apresenta um domínio similar a LexA, o repressor transcricional da resposta SOS. Ainda em NR-II, está presente um gene para resistência ao antibiótico tetraciclina e seu regulador, e também se encontra um

bloco conservado de genes similar a um fragmente de 4 kb do transposon Tn5041, que confere resistente a mercúrio. Além disso, mutantes para a região NR-II testados em ensaios de virulência em modelos de infecção aguda em ratos, apresentaram uma diminuição significativa na taxa de mortalidade destes animais. Diferentemente de NR-II nestes ensaios, não houve diferenças entre os mutantes da região NR-I para a linhagem selvagem. Nenhum dos mutantes destas duas regiões se mostraram atenuadas para infecção no modelo vegetal. Dessa maneira, os autores ressaltam que PAGI-5 não deve ser o único responsável pelo fenótipo altamente virulento da cepa PSE9 (Battle, et al. 2008).

PAGI-6. Esta ilha é similar a um fago ϕ CTX (que foi isolado da linhagem de *P. aeruginosa* PA158), responsável por produzir R-piocina, uma partícula protéica com propriedades antibacterianas. Entretanto, PAGI-6 é um pouco maior que ϕ CTX, que contém 35.538 pb, mas carece dos genes de citotoxina e integrase do fago (*ctx* e *int*) e carrega um segmento de 7.403 pb contendo dois genes putativos de integrases (Battle, et al. 2009).

PAGI-7. Esta ilha não está localizada próximo a um tRNA mas sim próximo a um gene que codifica para a proteína HprB (PA3961 em PAO1), uma provável helicase dependente de ATP. PAGI-7 possui vários genes relacionados a mobilidade de DNA, reguladores transcricionais preditos e um operon *ptxABCDE*, primeiramente identificado em *Pseudomonas stutzeri* e requerido para oxidação de fosfito em fosfato (Battle, et al. 2009).

PAGI-8. Esta ilha genômica carrega o elemento de inserção IS407, um gene de um regulador transcricional dependente de zinco e uma proteína similar a TraY (fator acessório necessário para ligação da relaxase no plasmídeo F) de *Cupriavidus metallidurans* (Battle, et al. 2009).

PAGI-9, PAGI-10 e PAGI-11. PAGI-9 e -10 são formadas por apenas um único gene cada, ambos relacionados a família Rhs que são elementos acessórios presente em *E. coli*, relacionada com biogênese do envelope celular e membrana externa, e PAGI-11 é uma região

de 2 kb que não contém nenhum gene predito e que não está presente em PSE9 e sim em PAO1 (McNulty, et al. 2006; Battle, et al. 2009).

PAPI-1 e PAPI-2 (Tabela 1) estão descritas na seção seguinte.

1.4.1 Ilhas na linhagem PA14.

P. aeruginosa UCBPP-PA14 (ou simplesmente PA14), um isolado de um paciente com queimadura, é capaz de infectar uma ampla variedade de hospedeiros (Mahajan-Miklos, et al. 1999; Lee, et al. 2006) e vem sendo utilizada como modelo de estudo em diferentes aspectos, como virulência, interação patógeno-hospedeiro e percepção de quorum. PA14 possui duas ilhas de patogenicidade conhecidas como PAPI-1 e PAPI-2, descritas abaixo (He, et al. 2004). PAPI-1 é o objeto de estudo desta dissertação.

PAPI-2. Esta ilha carrega genes de integrase, quatro genes de transposase, um pseudogene e um elemento IS222 quase completo. Metade de PAPI-2 é homóloga a PA0977-0987, uma ilha genômica de PAO1 que contém o gene para R-piocina. Interessantemente, os genes de piocina são substituídos por genes para um efector de sistema de secreção tipo III, ExoU e sua chaperona SpcU em PA14. A presença de *exoU* define PAPI-2 como uma ilha de patogenicidade (He, et al. 2004). Cerca de 2,5 kb de uma das extremidades de PAPI-2 são idênticos a uma das extremidades de PAPI-1, com três genes presentes em ambas as ilhas (He, et al. 2004).

PAPI-1. Desde sua descoberta, tem-se demonstrado que PAPI-1 está relacionada com virulência. Anteriormente ao sequenciamento do genoma de PA14, uma varredura de uma biblioteca de mutantes construída por inserção de transposon em busca de fatores importantes para sua patogenicidade revelou a existência de uma grande região ausente no genoma de PAO1 (He, et al. 2004). Essa região foi completamente seqüenciada e apresenta-se como a maior ilha genômica de PA14, entretanto 61 de suas 115 ORFs não possuem similaridade

com genes de função conhecida. Dentre as linhagens derivadas de PA14 com mutações em genes presentes em PAPI-1 analisadas, vinte e uma se mostraram atenuadas em virulência em pelo menos um modelo de hospedeiro (He, et al. 2004; Lee, et al. 2006). A presença de PAPI-1 no genoma de PA14, carregando tantos genes potencialmente ligados a mecanismos conservados de patogenicidade, muito provavelmente contribui para o amplo espectro de hospedeiro e a alta virulência desta linhagem. Um trabalho recente, em que linhagens derivadas de PA14 desprovidas de PAPI-1, PAPI-2 ou de ambas, demonstrou que a virulência deste isolado depende cooperativamente da presença das duas ilhas (He, et al. 2004; Harrison, et al. 2010).

Figura 4 – Organização de PAPI-1, evidenciando as classes de genes presentes. Cada seta larga representa uma ORF e sua respectiva orientação. O triângulo no início representa o tRNA, os retângulos são pseudogenes e a linha vertical marcada representa o *attR*. As linhas numeradas acima representam o tamanho (em kb), os triângulos invertidos representam repetições invertidas, retângulos sem setas são repetições diretas e a seta dupla em roxo representa um elemento de inserção. (Adaptado de (He, et al. 2004))

A organização modular de PAPI-1, que carrega blocos de genes não relacionados entre si e repetições invertidas, diretas e elementos de inserção, sugere que ela foi gerada a partir de uma série de eventos de recombinação, (Figura 4). Entre as sequências repetidas diretas DR2, encontra-se um bloco de genes que codificam para proteínas de um sistema de dois

componentes e uma fimbria do tipo *cup* (do inglês “*chaperone-usher pathway*”), entre as DR3, genes para uma bacteriocina e sua proteína de imunidade (He, et al. 2004; Nicastro, et al. 2009), além de um grupo de genes para um provável pilus tipo IVB, que pode estar envolvido com adesão.

Vários grupos de genes de PAPI-1 também estão presentes nos plasmídeos pKLC102 e pKLK106, e nas ilhas genômicas PAGI-2, PAGI-3 e PAGI-5 (Larbig, et al. 2002; Battle, et al. 2008). As regiões variantes em PAGI-2, -3 -5 parecem conferir capacidades diferentes de adaptação para estas linhagens, assim como as regiões variantes de PAPI-1 se mostraram relevantes em patogenicidade (Kiewitz, et al. 2000; Klockgether, et al. 2004; Battle, et al. 2008). Recentemente, ilhas semelhantes a PAGI-2 foram detectadas em 31 de um total de 71 linhagens de *P. aeruginosa* analisadas e também na β -proteobactéria *Cupriavidus (Ralstonia) metallidurans* (Klockgether, et al. 2007). No mesmo trabalho, foi demonstrado que o elemento circular pKLC102 ocorre na forma episomal e a porcentagem de cromossomos livres de pKLC102 em fase inicial de crescimento é de 2 a 3%. Esta frequência de mobilização espontânea aumenta em fase estacionária, podendo atingir 10% da população, podendo haver até 30 cópias do elemento por célula (Klockgether, et al. 2007).

A frequência de PAPI-1 na forma circular foi estimada em 2% em relação ao número de cromossomos, enquanto cerca de 0,3-1% dos cromossomos de PA14 não carregam PAPI-1 (Qiu, et al. 2006). Além disso, ela pode ser transferida por conjugação para outras linhagens. A excisão e transferência de PAPI-1 dependem de uma integrase funcional, codificada por *int*, que está presente numa das extremidades da ilha. Mutantes neste gene fizeram com que PAPI-1 ficasse permanentemente fixada ao cromossomo. Na extremidade oposta a *int*, está a região codificadora de *soj*, um ortólogo de *parA*, que é um gene de divisão cromossomal cujo produto é responsável também pela segregação de plasmídeos de baixa cópia durante a divisão celular. Mutações em *soj* levaram à perda de PAPI-1, tanto na forma integrada quanto

epissomal. Interessante destacar que o promotor de *soj* encontra-se na extremidade oposta de PAPI-1, próximo a *int*, o que só permite a transcrição deste gene quando a ilha se encontra na forma circular epissomal (Qiu, et al. 2006).

PAPI-1 apresenta 12 genes com homologia ao T4SS do elemento *ICEHin1056* de *Haemophilus influenzae* (Tabela 2), e dessa forma se enquadra como integrante do grupo de ilhas sintênicas definidas como GI mencionadas na Seção 1.2 e descritas abaixo com maiores detalhes. As semelhanças entre PAPI-1 e *ICEHin1056* vão pouco além dos genes para o aparato de transferência, compartilhando mais 16 genes homólogos, sendo que alguns são genes hipotéticos e outros que codificam proteínas hipotéticas que apresentam domínios relacionados a replicação, recombinação e segregação de DNA (Tabela 2). Esses blocos de genes conservados não são exclusivos de *P. aeruginosa*, tendo sido encontrados em diversas ilhas genômicas de β - e γ -proteobactérias (Mohd-Zain, et al. 2004; Battle, et al. 2008).

Dentre as ilhas da família GI, encontra-se uma região de cerca de 86 Kb que compreende 82 ORFs do genoma do fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* 306 (XAC) (Mohd-Zain, et al. 2004). XAC é o agente causador do cancro cítrico, uma doença que afeta laranjeiras (*Citrus spp.*), sendo de extrema importância econômica para o Brasil, Estados Unidos e outras regiões do mundo (da Silva, et al. 2002). O genoma de XAC apresenta várias regiões potencialmente adquiridas por transferência horizontal com características de ilhas genômicas (Lima, et al. 2005; Monteiro-Vitorello, et al. 2005).

A potencial ilha genômica de XAC que contém os genes da família PAPI-1 compreende as ORFs anotadas como XAC2205 a XAC2286, sendo 28 homólogas aos genes “core” (Tabela 2). Estes genes “core” foram assim denominados por definirem uma subfamília de ilhas genômicas sintênicas consistindo de 33 genes presentes em ilhas genômicas de 16 espécies de β e γ -proteobactéria, indicando que estes elementos podem ter uma origem comum (Mohd-Zain, et al. 2004). O conteúdo G+C desta região é 69,6 %, mais

alto que a média do genoma, que é de 64% (da Silva, et al. 2002). Parte dessa ilha corresponde à UBI (“unusual best-match island”) específica de XAC denominada A4, que compreende as ORFs XAC2237 a XAC2268 (Lima, et al. 2005). Esta região de XAC também apresenta genes homólogos ao sistema responsável pela transferência do elemento *ICEHin1056*, além de outros genes conservados entre PAPI-1, *ICEHin1056* e os genes “core”, como está evidenciado na Tabela 2.

O elemento móvel *ICEclc* presente em *Pseudomonas knackmussii* B13, que confere à bactéria a capacidade de metabolizar 3-clorobenzoato e 2-aminofenol, também possui a capacidade de se excisar e ser transferido para outras células por meio de um T4SS. Foi demonstrado que o gene *inrR* presente no elemento *ICEclc* é necessário para que este seja excisado do cromossomo bacteriano e transferido para outra célula (Minoia, et al. 2008). Entretanto, como esse fenômeno é iniciado ainda não é claro, pois a proteína InrR, apesar de necessária para a expressão de *intB13*, não apresenta características de um fator de transcrição. Homólogos de *inrR* são encontrados também em PAPI-1 e em *ICEHin1056*, anotados como RL096 e p1056.07, respectivamente. Apesar de evidências apontarem que o sistema de transferência homólogo ao de *ICEHin1056* é o responsável pela transferência de ilhas genômicas da família PAPI-1, ainda não há estudos funcionais dos produtos de seus genes conservados. Outro detalhe importante de *ICEclc*, é que há um aumento significativo na frequência de excisão a quando as células são crescidas em meio de cultura contendo 3-clorobenzoato, sugerindo que a capacidade de utilizar esta fonte de carbono pode ser compartilhada pela população crescendo nessas condições (Minoia, et al. 2008).

Dentre vários possíveis sinais que possam levar a transferência de ilhas genômicas é plausível considerar dois sistemas de sinalização que poderiam desempenhar esse papel: o segundo mensageiro bis (3'5') monofosfato de diguanosina cíclico (c-di-GMP) e percepção de quorum.

Tabela 2. Genes correspondentes às ilhas da família PAPI-1 em *P. aeruginosa* PA14, *X. axonopodis* pv. *citri* 306 e *ICEHin1056* de *H. influenzae*.

PAPI-1 ORF ID ^a	Gene em PA14 ^b	Gene em XAC ^c	Gene em <i>ICEHin1056</i> ^d	Gene T4SS em <i>ICEHin1056</i> ^e	Gene “core” ^f	Observações ^g
RL002	PA14_60140	XAC2286	p1056.63		ORF61(PA14)	<i>xerC</i>
RL003	PA14_60130		p1056.62			
RL014	PA14_60020		P1056.48			
RL016	PA14_60000	XAC2284	p1056.51		ORF49	
RL017	PA14_59990	XAC2283	p1056.52		ORF50	
RL018	PA14_59980	XAC2282			ORF51(XAC)	
RL020	PA14_59960	XAC2275				Domínio DsbG *
RL022	PA14_59940	XAC2274	p1056.45	<i>tfc16</i>	ORF43	Domínio VirB4 *
RL023	PA14_59930		P1056.44	<i>tfc15</i>		
RL024	PA14_59920	XAC2273	p1056.43	<i>tfc14</i>	ORF41	
RL025	PA14_59910	XAC2272	p1056.42	<i>tfc13</i>	ORF40	
RL026	PA14_59900		p1056.41	<i>tfc12</i>		
RL027	PA14_59890	XAC2271	p1056.40	<i>tfc11</i>	ORF38	
RL028	PA14_59880	XAC2270	p1056.39	<i>tfc10</i>	PAPI-1_29	
RL030	PA14_59860	XAC2269	p1056.38	<i>tfc9</i>	ORF36	Proteína secretada (?) Hop20
RL035	PA14_59820	XAC2260	p1056.37	<i>tfc8</i>	ORF35*	
RL046	PA14_59700	XAC2260	p1056.37	<i>tfc8</i>	ORF35*	
RL047	PA14_59690	XAC2259	p1056.35	<i>tfc6</i>	ORF33	
RL049	PA14_59670	XAC2257	p1056.34	<i>tfc5</i>	ORF32	
RL050	PA14_59660	XAC2256			PAPI-1_49	
RL051	PA14_59650	XAC2255	p1056.32	<i>tfc3</i>	ORF30	
RL063	PA14_59540	XAC2243				“plasmid related” <i>orf8</i>
RL064	PA14_59530	XAC2242	p1056.29			“plasmid related” <i>orf10</i>
RL065	PA14_59520	XAC2241				
RL066	PA14_59510	XAC2240				
RL069	PA14_59480	XAC2237				
RL072	PA14_59430	XAC2217			PAPI-1_71	
RL074	PA14_59400	XAC2236	P1056.12		ORF12	
RL086	PA14_59240	XAC2253	p1056.31	<i>tfc2</i>	ORF29	<i>pilL2</i>
RL092	PA14_59180	XAC2212	p1056.11		ORF11	<i>topA</i>
RL095	PA14_59150	XAC2211	p1056.08		ORF8	<i>ssb</i>
RL096	PA14_59140	XAC2210	p1056.07		ORF7	Ortólogo de <i>inrR</i>
RL097	PA14_59130	XAC2209	p1056.06		ORF6	
RL100	PA14_59100	XAC2208	p1056.05		ORF5	
RL101	PA14_59090	XAC2207	p1056.04		ORF4	
RL102	PA14_59070	XAC2206	p1056.03		ORF3	<i>parB-like</i> **
RL109	PA14_58990		p1056.02		ORF2	<i>dnaB</i>
RL115	PA14_58910	XAC2205	p1056.01		ORF1	Soj

^a Anotação segundo He *et al*, 2004.; ^b Anotação segundo Lee *et al*, 2006.; ^c Anotação segundo da Silva *et al*, 2002.; ^d Anotação segundo Juhas *et al*, 2007.; ^e Anotação segundo Juhas *et al* 2007, corresponde ao T4SS do elemento *ICEHin1056*; ^f Anotação segundo Mohd-Zain *et al*, 2004 (<http://www.ndcls.ox.ac.uk/mohd-zain.html>); ^g Domínios (completos ou parciais) encontrados em busca no “Conserved Domains Database”, NCBI e anotações dos genomas; * Genes envolvidos com patogenicidade segundo He *et al*, 2004(He, *et al*. 2004); **Gene envolvido com patogenicidade segundo Lee *et al*, 2006.

1.5 O segundo mensageiro c-di-GMP

O c-di-GMP tem sido caracterizado nos últimos tempos como um segundo mensageiro celular em bactérias. Recentes descobertas têm demonstrado que c-di-GMP controla, antagonicamente, a mobilidade e o estado sésil de uma bactéria, e virulência ou adesão e persistência de comunidades multicelulares (Simm, et al. 2004; Romling & Amikam 2006). Assim, altos níveis de c-di-GMP têm sido relacionados com células no seu estado sésil, estimulando expressão de organelas de adesão e também de enzimas e proteínas estruturais da matriz de exopolissacarídeos, favorecendo a formação de biofilmes. Em contraste, baixos níveis de c-di-GMP aparecem inibindo a formação de biofilme e de organelas adesivas de superfície, estimulando a motilidade (Figura 4).

c-di-GMP é sintetizado por uma classe de enzimas (ciclases ou sintetases) que contêm o domínio GGDEF e hidrolisado por fosfodiesterases com os domínios EAL ou HD-GYP. Os homólogos destas proteínas são encontrados apenas em Eubactéria, o que indica que a sinalização por c-di-GMP é específica para este Domínio. O número de genes codificando proteínas com domínios GGDEF, EAL e HD-GYP nos genomas bacterianos é muito variável, indo de nenhuma a mais de 100. Em PA14, são codificadas 17 proteínas com domínios GGDEF, 6 com EAL, 16 com ambos e ainda 3 HD-GYP (Wolfe & Visick 2008). Como a transferência horizontal via conjugação depende de contato entre as células, é possível supor que altos níveis de c-di-GMP possam levar a um aumento na frequência com que esse fenômeno ocorre.

Figura 5 - Metabolismo e sinalização por c-di-GMP. Proteínas que apresentam o domínio GGDEF sintetizam c-di-GMP a partir de duas moléculas de GTP. Proteínas com domínios EAL clivam c-di-GMP em pGpG e HD-GYP em duas moléculas de GMP. Altos níveis de c-di-GMP celular promovem o estado sésil da célula, ajudado pelo aumento da produção de componentes extracelulares de adesão como polissacarídeos e fímbrias. Inversamente, baixos níveis de c-di-GMP promovem a motilidade celular (“swimming”, “swarming” e “twitching”) e virulência (Romling & Amikam 2006).

1.6 Percepção de quorum em *P. aeruginosa*

Bactérias são seres altamente sociais e capazes de comportamentos cooperativos sofisticados por meio de comunicação química. Percepção de quorum (ou simplesmente QS, do inglês “Quorum-sensing”) é um termo usado para enfatizar o fato de que um número suficiente de bactérias, um quorum bacteriano, é necessário para induzir ou reprimir a expressão de um conjunto específico de genes. Durante o crescimento bacteriano ocorre acúmulo destas pequenas moléculas, os auto-indutores, intra e extracelularmente. Quando um limite de concentração destes auto-indutores é atingido, estas moléculas ativam vários

sistemas reguladores, o que leva a expressão de certos grupos de genes (Juhas, et al. 2005; Williams & Camara 2009).

Em proteobactérias, o paradigma de um sistema de QS é composto por um auto-indutor da classe das acil homosserina-lactonas, sintetizado por uma proteína do tipo LuxI. Em concentrações apropriadas, o auto-indutor se liga a uma proteína regulatória LuxR, que ativa a transcrição de um determinado conjunto de genes, incluindo o gene *luxI*, o que amplifica o sinal. (Smith & Iglewski 2003).

P. aeruginosa é um dos principais modelos de estudos deste fenômeno, e dentre os fatores de virulência regulados por QS em *P. aeruginosa*, podemos destacar a produção de elastases, proteases alcalinas, exotoxina A, ramnolipídeos, piocianina, secreção de proteínas entre outros. Existem pelo menos três vias de QS em *P. aeruginosa*, sendo duas delas do tipo LuxRI e um terceiro que envolve um ativador transcricional tipo LysR, que liga auto-indutores da família das hidróxi-quinolinas.

As vias de Las e Rhl consistem nos genes *lasRI* e *rhlRI*, onde LasR e RhlR são membros da família de reguladores transcricionais LuxR, que é ativado por *N*-(3-oxododecanoil) homosserina lactona (3-oxo-C₁₂-HSL) e *N*-butiril homosserina lactona (C₄-HSL), respectivamente (Wade, et al. 2005). O ativador transcricional do terceiro sistema é denominado MvfR/PqsR, que pode ligar tanto 4-hidróxi-2-heptil-quinolina (HHQ) e 3,4-dihidroxi-2-heptilquinoline (PQS, de *Pseudomonas* quinolone signal).

As três vias estão intimamente conectadas e são auto-reguladas, formando uma rede regulatória. LasR-3-oxo-C₁₂-HSL positivamente regula *lasI*, criando um ciclo de retroalimentação positiva. LasR-3-oxo-C₁₂-HSL também regula a expressão de *rhlR*, e RhlR-C₄-HSL então regula a transcrição de *rhlI* resultando na amplificação do sinal (Venturi 2006). Além disso, a atividade de RhlR também é controlada de maneira pós-transcricional por *las*, uma vez que 3-oxo-C₁₂-HSL pode se associar a RhlR impedindo sua ligação a C₄-HSL (Pessi,

et al. 2001). A via de MvfR está numa posição intermediária entre os sistemas Las e Rhl (Wade, et al. 2005). A síntese de PQS requer várias enzimas codificadas pelos operons *pqsABCDE*, *phnAB*, *pqsH* e o regulador transcricional MvfR. Além de PQS, MvfR é necessário para a produção de vários fatores secretados, incluindo fatores de virulência (Schell 1993; Déziel, et al. 2004; Wade, et al. 2005; Xiao, et al. 2006). Os operons *phn* e *pqs* são exemplos de genes alvos desse regulador transcricional. *phnAB* direciona a produção de ácido antranílico, precursor primário das 4-hidroxi-2-alquilquinolinas (HAQs); enquanto *pqsABCDE* direciona a produção de 4-hidroxi-2-heptilquinolina (HHQ) a partir de HAQs. HHQ é convertido a PQS pela monooxigenase produto do gene *pqsH* (Déziel, et al. 2004; Lesic, et al. 2007). Ambos, HHQ e PQS funcionam como co-indutores de MvfR para induzir a transcrição dos genes por ele regulados (Xiao, et al. 2006). Os sistemas *las* e *rhl* também controlam a síntese de PQS indiretamente, sendo positivamente regulada por *las*, mas estando sob controle negativo de *rhl*; por outro lado, PQS regula positivamente a expressão de RhlI, favorecendo o acúmulo de C₄-HSL (Juhas, et al. 2005).

1.7 O regulador global MvaT.

Inicialmente descrito em *Pseudomonas mevalonii* como um ativador transcricional do operon *mvaAB*, que codifica proteínas HMG-CoA (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA) redutase e liase, respectivamente (Rosenthal & Rodwell 1998), MvaT é uma proteína funcionalmente semelhante a membros da família H-NS de proteínas associadas ao DNA (Dorman 2004). Proteínas dessa família têm a capacidade de se ligar ao DNA através da sua porção C-terminal e propensão de formar oligômeros pela porção N-terminal, com função no empacotamento do DNA e geralmente funcionando como repressores da transcrição (Tendeng, et al. 2003; Dorman 2004). Em *P. aeruginosa*, MvaT está envolvido na percepção de quorum e na formação de biofilme e foi descrito como um regulador global de genes de

virulência (Diggle, et al. 2002). Estudos baseados em análises de microarranjo de DNA revelaram que MvaT influencia a expressão de aproximadamente 150 genes, muitos deles envolvidos em virulência (Vallet, et al. 2004).

Uma proteína semelhante à MvaT, MvaU, possui um alto nível de similaridade com MvaT e pode fazer praticamente as mesmas funções regulatórias além de poderem interagir através de suas regiões N-terminais formando heterodímeros. Em geral mutações em *mvaT* parecem ter um efeito mais profundo do que mutantes em *mvaU*. Em estudos utilizando imunoprecipitação de cromatina acoplados a microarranjos de DNA (CHIP-on-Chip), foram determinados os potenciais sítio de ligação de MvaT e MvaU, mas não foram determinadas sequências consenso de ligação, embora haja preferência por sequências ricas em AT, sugerindo um mecanismo de silenciamento de DNA xenogênico, visto que o DNA *P. aeruginosa* apresenta um alto conteúdo G+C (Castang, et al. 2008).

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral estudar a transferência de ilhas da família PAPI-1.

Dentre os objetivos específicos, pretendeu-se:

- Verificar se os genes conservados em ilhas genômicas são essenciais para a transferência de PAPI-1 para outras linhagens de *P. aeruginosa*.
- Verificar o papel de genes envolvidos com QS, com a regulação dos níveis de c-diGMP e outros na transferência de PAPI-1.
- Identificar condições que favorecem a transferência de PAPI-1.
- Verificar se a provável ilha genômica de *X. axonopodis* pv. *citri* pode se excisar do cromossomo.
- Encontrar parceiros de interação com proteínas codificadas pela provável ilha de *X. axonopodis* pv. *citri*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagens e condições de cultura

E. coli DH5 α e *P. aeruginosa* (Tabela 3) foram cultivadas rotineiramente em meio LB (triptona 1%, NaCl 1%, extrato de levedura 0,5% em pH 7,0) (Sambrook, et al. 1989) a 37°C. Antibióticos em concentrações apropriadas foram adicionados quando necessário.

Tabela 3 – Linhagens, vetores e construções utilizadas.

<i>Linhagem</i>	<i>Descrição</i>	<i>Fonte ou Referência</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
PA14	Tipo selvagem	(He, et al. 2004)
RB205	PA14 contendo a construção pGN101	Gianlucca Nicastro
RB206	PA14 contendo a construção pGN102	Gianlucca Nicastro
RB403	PA14_59710::MT7, Gm ^R , contendo a construção pGN101 integrada no sítio <i>ctx</i> , Tet ^R .	Este trabalho
RB404	PA14_59710::MT7, Gm ^R , contendo a construção pGN102 integrada no sítio <i>ctx</i> , Tet ^R .	Este trabalho
RB407	PA14_59710::MT7, Gm ^R , contendo a construção pGN101 integrada no cromossomo sem a marca de seleção Tet ^R .	Este trabalho
RB408	PA14_59710::MT7, Gm ^R , contendo a construção pGN102 integrada no cromossomo sem a marca de seleção Tet ^R .	Este trabalho
PAO1	Tipo selvagem.	(Stover, et al. 2000)
PAO1Tet ^R	PAO1 contendo mini-CTX- <i>lacZ</i> , Tet ^R	Este trabalho
PA14_59940::MrT7	PA14 com transposon em PA14_59940, Gm ^R	(Liberati,

		et al. 2006)
PA14_59920::MrT7	PA14 com transposon em PA14_59920, Gm ^R	(Liberati, et al. 2006)
PA14_59880::MrT7	PA14 com transposon em PA14_59880, Gm ^R	(Liberati, et al. 2006)
PA14_59860::MrT7	PA14 com transposon em PA14_59860, Gm ^R	(Liberati, et al. 2006)
PA14_59710::MrT7	PA14 com transposon em PA14_59710, Gm ^R	(Liberati, et al. 2006)
PA14 <i>lasR</i> ::Gm ^R	PA14 com o gene <i>lasR</i> interrompido por um cassete de resistência a gentamicina	(Déziel, et al. 2004)
PA14 <i>rhlR</i> ::Tet ^R	PA14 com o gene <i>rhlR</i> interrompido por um cassete de resistência a tetraciclina	(Déziel, et al. 2004)
PA14 Δ <i>mvfR</i>	PA14 com mutação “nonsense” do gene <i>mvfR</i>	(Cao, et al. 2001)
RB200	PA14 com transposon em <i>mvaT</i> , Gm ^R	Gianlucca Nicastro
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
PJ694-a	(MATa <i>trp1-901 leu2-3 112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ</i>)	(James, et al. 1996)
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	F- <i>endA1 hsdRJ7</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>supE44 thi-1 λrecA1 gyrA96 relA1 deoR Δ(lacZYA-argF)-U169 Φ80dlacZAM15</i>	Invitrogen
S17-1	<i>recA pro thi hsdR</i> RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7	(Simon, et al. 1983)
KC8	<i>hsdR, leuB600, trpC9830, pyrF::Tn5, hisB463, lacΔX74, strA, galU, K</i>	Clontech
<i>Vetores</i>		
pGEM-T Easy	Vetor de clonagem em <i>E.coli</i> . Amp ^R .	Promega

pOBD	Vetor de expressão que adiciona ao gene o domínio de ligação usados nos ensaios de duplo-híbrido na levedura <i>S. cerevisiae</i> pJ694a. Amp ^R e TRP1.	(Uetz, et al. 2000)
pOAD	Vetor de expressão que adiciona ao gene o domínio de ativação usados nos ensaios de duplo-híbrido na levedura <i>S. cerevisiae</i> pJ694a. Amp ^R e LEU2.	(Uetz, et al. 2000)
pProEx HTa	Vetor de expressão induzível por IPTG que adiciona uma cauda de histidina a região N-terminal da proteína. Amp ^R	Invitrogen
mini-CTX- <i>lacZ</i>	Vetor de entrega para inserção de gene no sítio <i>att</i> do fago CTX no cromossomo de <i>P. aeruginosa</i> . Tet ^R .	AF140579 .1
mini-CTX2	Vetor de entrega para inserção de gene no sítio <i>att</i> do fago CTX no cromossomo de <i>P. aeruginosa</i> . Tet ^R . Ω FLP.	(Hoang, et al. 2000)
pFLP2	Fonte da FLP recombinase, Amp ^R .	(Hoang, et al. 1998)
<i>Construções</i>		
pGES001	pGEM-T Easy contendo PA14_59860	Este trabalho
pGES002	pGEM-T Easy contendo XAC2269	Este trabalho
pGES003	pGEM-T Easy contendo XAC2206	Este trabalho
pGES004	pGEM-T Easy contendo XAC2260	Este trabalho
p2HES001	pOBD contendo PA14_59860	Este trabalho
p2HES002	pOBD contendo a região codificadora de XAC2269	Este trabalho
p2HES003	pOBD contendo a região codificadora de XAC2260	Este trabalho
pPEXES001	pProEx HTa contendo a região codificadora de XAC2260	Este trabalho

pGN101	<i>pvrR</i> sob o controle de P _{BAD} clonado no vetor mini-CTX2. Tet ^R	Gianluca Nicastro
pGN102	PA14_72420 sob o controle de P _{BAD} clonado no vetor mini-CTX2. Tet ^R .	Gianluca Nicastro

---

O meio rico YAPD (extrato de levedura 10 g/L, peptona 20 g/L, glicose 20 g/L, adenina 0,08 g/L) foi utilizado para crescimento e manutenção das culturas de levedura. O meio mínimo SC (fonte de nitrogênio [sem aminoácidos] 6,6 g/L, glicose 20 g/L, adenina 0,08 g/L, a mistura de aminoácidos (descrita abaixo) e pH ajustado à 5,6) foi utilizado quando a seleção por marcas de auxotrofia se fizer necessária. O meio SC foi modificado e preparado com carência de um ou mais componentes com as seguintes combinações: SC-Trp (sem triptofano), SC-Trp-His (sem triptofano e sem histidina), SC-Trp-Ade (sem triptofano e sem adenina), SC-Trp-His-Leu (sem triptofano, histidina e leucina) e SC-Trp-His-Leu-Ade (sem triptofano, histidina, leucina e adenina). A composição da mistura completa de aminoácidos: Ade 20 mg/L, Arg 20 mg/L, His 20 mg/L, Ile 30 mg/L, Leu 100 mg/L, Lys 30 mg/L, Met 20 mg/L, Phe 50 mg/L, Ser 400 mg/L, Thr 200 mg/L, Trp 20 mg/L, Tyr 30 mg/L, Ura 20 mg/L, Val 150 mg/L, Glu 100 mg/L e Asp 100 mg/L. No caso de crescimento em meio sólido, 15 g/L de ágar bacteriológico.

O meio mínimo M9 foi utilizado para selecionar as linhagens de *E. coli* KC8 contendo apenas o plasmídeo pOAD-presena. Os sais M9 (6 g/L de Na₂HPO₄, 3g/L de KH₂PO₄, 0,5 g/L de NaCl e 1 g/L de NH₄Cl) e o agar (15 g/L contendo 0,02 g/L Uracila, 0,02 g/L histidina e 0,02 g/L triptofano) foram autoclavados separadamente e misturados apenas no momento de plaquear, acrescentando ainda as seguintes soluções estéreis ao meio: 2 mL de MgSO₄ 1 M, 10 mL de glicose 20% e 2 mL de CaCl₂ 50 mM.

3.2 Técnicas básicas de biologia molecular

Isolamento de DNA plasmidial, digestão, reações em cadeia da polimerase (PCR), ligações, transformação, conjugação, sequenciamento e outras técnicas básicas de biologia molecular foram utilizadas de acordo com metodologia padrão, descritas em manuais de referência (Sambrook, et al. 1989; Ausubel, et al. 1996) ou com protocolos específicos, quando necessário. DNA genômico de PA14 e XAC foi isolado pela técnica de Chen e Kuo (Chen & Kuo 1993), e o RNA foi isolado de RNA com o reagente Trizol (Invitrogen), segundo as indicações do fabricante.

Os oligonucleotídeos para PCR foram desenhados com o auxílio do programa Primer3, disponível em <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>. Entretanto, para alguns genes de interesse os oligonucleotídeos foram feitos de maneira manual com auxílio do programa Oligo Analyzer, disponível no site <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>. Este programa foi utilizado ao invés do Primer3, quando este não era capaz de encontrar pares de oligonucleotídeos em regiões de interesse. As sequências dos oligonucleotídeos utilizados para este trabalho estão mostradas na Tabela 4.

Tabela 4 - Oligonucleotídeos desenhados para ensaios de duplo híbrido, expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* e estudo da forma inserida/episomal das ilhas genômicas.

Sítios de restrição destacados em negrito

Oligonucleotídeo	Sequência (5' → 3')	Uso	Sítio de restrição
PA14_59860L	TATGA AATTC CTTGCGGAATGGAATCAGGG	clonagem da região	<i>EcoRI</i>
PA14_59860R	AAACCCGGGAGATCAGCAGGCCGACAC	codificadora de PA14_59860	<i>XmaI</i>
XAC2206 Up	AAAG TCGAC CCACGGACACGACGGGAGCAT	clonagem da região	<i>SalI</i>
XAC2206 Down	AAAG TCCGT CCGAAGCCCATGGAACGC	codificadora de XAC2206	<i>SalI</i>
XAC2260L	AAAGA AATTC CGACGATCTACTGGCAGGTT	clonagem da região	<i>EcoRI</i>
XAC2260R	AAACCCGGG CCCTT GGAAAGAAATGCTGAC	codificadora de XAC2260	<i>XmaI</i>
XAC2269L	TATGA AATTC ATGGGCCTCGCCAG	clonagem da região	<i>EcoRI</i>
XAC2269R	TTTCCCGGGACGGTCATGGCAGATCC	codificadora de XAC2269	<i>XmaI</i>
XAC2274Up	ATCGA AATTC GTGGACATGCTGCCCTGG	clonagem da região	<i>EcoRI</i>
XAC2274Down	AATCCCGGGT CGA AGCATGGTTCTGTC	codificadora de XAC2274	<i>XmaI</i>
XAC2275Up	ATACCCGGG CCCTG GAAGTAAACGGAG	clonagem da região	<i>XmaI</i>
XAC2275Down	AACGA AATTC CGGATGGTCGATCCAG	codificadora de XAC2275	<i>EcoRI</i>
4541F	GACAAGACCAGCCACAACCT	verificação da presença de forma episomal e/ou integrada de PAPI-1	
4542F	GTGGTGATGACCTCCAACCT		
intF	AGCTACATCGAGGCCGACTA		
sojR	CGAGCACAGAAATGTCCTGA		

qRT_RL001_R qRT_sojR	GCTAGACAAGAACCGGCGTA ACTCGTTGTAAACGGGAGTGG	PCR quantitativo para verificar a presença da forma epissomal e/ou integrada de PAPI-1 sob diferentes condições Normalizador em qPCR
nadB up nadB down pOBDleft pOBDright	CTACCTGGACATCAGCCACA GGTAATGTGCGATGCCGAAGT TGCCGTCACAGATAGATTGG GCACGATGCACAGTTGAAGT	Amplificação e sequenciamento do fragmento inserido no sitio de múltipla clonagem
pOADleft pOADright	GCGTATAACGCGTTTGAAT GACAAGCCGACAACCTTGAT	Amplificação e sequenciamento do fragmento inserido no sitio de múltipla clonagem
XAC2203L XAC2205R XAC2286L XAC2287R Pser-up Pser-down	CGATATCCACGCAAACAGAA CTTGGTCGAGATGATGGACA GCGATCATCTTCTTGGCTTC CGATCTTCATCGACGAAGT CGAGTGGTTTAAGGCAACGGTCTTGA AGTTCGGCCTGGTGAACAACCTCG	verificação da presença de forma epissomal e/ou integrada da ilha de XAC Confirmação da integração do plasmídeo mini-CTX2 no DNA genômico de PA14

3.3 Verificação de genes necessários para a excisão de PAPI-1 do cromossomo

Para esse ensaio foram utilizadas PA14 como controle positivo, PAO1 como controle negativo e as linhagens PA14_59860::MrT7, PA14_59880::MrT7, PA14_59920::MrT7 e PA14_59940::MrT7 para verificação se esses genes são necessários para excisão de PAPI-1 do cromossomo. Um pré-inóculo foi crescido durante a noite e então as células foram diluídas para $DO_{600} = 0,1$. Todas as culturas foram crescidas em meio LB e alíquotas de 1 mL foram retiradas de cada uma nas DOs 1, 2, 3 e 4. O DNA das amostras foi extraído e PCR foi executado com a combinação de oligonucleotídeos descritos na figura 5. As condições de PCR foram as seguintes: 1,5 μ M de cada oligonucleotídeo, 1,25 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTPs, 5% de DMSO, 1X tampão da enzima e 1 U de Taq DNA Polimerase em 20 μ L de reação. As condições de PCR foram as seguintes: 94°C/7 minutos, seguido por 35 ciclos de 94°C/30'', 60°C/30'' e 72°C/1'30'' e um passo final de 72°C/7'.

Figura 6 – Detecção das formas integrada e episossômica da ilha de patogenicidade, PAPI-1, de *Pseudomonas aeruginosa* PA14. As setas abertas indicam os oligonucleotídeos a serem usados, sendo feitas as seguintes combinações: 4542F+intF para a extremidade esquerda da ilha integrada no cromossomo; sojR+4541F para a extremidade direita da ilha integrada no cromossomo; sojR+intF para a ilha na forma episossômica e 4542F+4541F para os cromossomos desprovidos da ilha. Retirado de Qiu *et al.* 2006.

3.4 Influência da fase de crescimento na excisão de PAPI-1

Um pré-inóculo de PA14 foi crescido durante a noite e inoculado em meio LB para $DO_{600} = 0,1$, incubado a 37°C sob agitação. Aguardou-se até que as culturas chegassem às DOs 0,6; 1,2; 2,4; 3,0 e 4,0; sendo retirado uma alíquota de 1 mL das células de PA14, sendo então centrifugadas, o sobrenadante foi aspirado e então as células foram congeladas.

O DNA total foi extraído das amostras, sua concentração estimada por leitura de A_{260} e diluído para 120 ng/μL. A fim de se comparar a influência da fase de crescimento na excisão da ilha, PCR semi-quantitativo foi feito para cada uma das amostras extraídas usando-se os oligonucleotídeos intF e sojR (5 mM cada). As concentrações dos outros elementos necessários para o PCR foram 0,4 mM de dNTPs, 1X Tampão da enzima, 5% de DMSO, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,5 U de enzima Taq DNA Polimerase e 60 ng de DNA, em um volume final de 50 μl. As condições de PCR foram: 94°C/7 minutos, seguido por 25 ciclos de 94°C/30'',

60°C/30'' e 72°C/1'30'' e um passo final de 72°C/7'. Os oligonucleotídeos foram desenhados para que o produto da amplificação seja de aproximadamente 1600 pares de base.

As amostras foram distribuídas em tubos de PCR em tiras, cada tira contendo os as DOs 0,6; 1,2; 2,4; 3,0 e 4,0; foram retiradas após completados 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 e 25 ciclos. Após retirada das alíquotas, estas foram imediatamente colocadas em gelo seco e então foram separados em gel de agarose 0,8%.

3.5 Análise do papel dos genes de PAPI-1 na mobilização para outra linhagem de *P. aeruginosa*.

Tanto as linhagens doadoras (PA14_59940::MrT7, PA14_59920::MrT7, PA14_59880::MrT7, PA14_59860::MrT7 e PA14_59710::MrT7, todas com gene de resistência a gentamicina em genes de PAPI-1) quanto a linhagem receptora (PAO1Tet^R) foram crescidas a 37°C durante a noite em meio líquido sob constante agitação. Células doadoras em fase estacionária (DO₆₀₀ = 5,0) foram diluídas em LB para DO₆₀₀ = 0,2 e incubadas a 37°C por duas horas. Células da linhagem receptora em fase estacionária foram adicionadas e as culturas foram incubadas por 48h a 37°C sem agitação. Passadas as 48h, uma quantidade igual de meio LB foi adicionado ao tubo e as culturas foram homogeneizadas por agitação ou com auxílio de pipeta, diluídas e semeadas em LB ágar contendo 40 µg/mL de gentamicina e 100 µg/mL de tetraciclina (para seleção dos transconjugantes), em placas contendo apenas gentamicina (para contagem das células doadoras) e em placas contendo apenas tetraciclina (para a contagem de receptoras). A eficiência da transferência foi calculada usando-se o número total de transconjugantes dividido pelo total de receptores na mistura de conjugantes (Qiu, et al. 2006). Para confirmar a transferência de PAPI-1, de 10 a 20 colônias foram selecionadas ao acaso para análise em PCR usando os pares de oligonucleotídeos descritos na Figura 5 e Tabela 3.

As marcas de resistência à gentamicina presentes nos transposons em genes de PAPI-1 das linhagens de PA14 mutantes foram utilizadas para a seleção de linhagens PAO1Tet^R que receberam as ilhas, tornando-se Tet^RGm^R. Como controle positivo da transferência, uma linhagem contendo o transposon no gene *cupDI* (PA14_59710) foi utilizada, já que este gene não está conservado nas ilhas genômicas da família PAPI-1.

3.6 Influência da percepção de quorum na excisão/manutenção de PAPI-1.

A estabilidade da ilha integrada foi analisada, devido a capacidade de PAPI-1 se excisar do cromossomo, formando uma estrutura circular (forma episomal). Como o gene *soj* apenas é expresso quando a ilha se encontra na forma circular, a medida da quantidade relativa de seu mRNA é uma indicação de quanto a ilha estaria nessa forma em uma população, em comparação a uma população controle. O ensaio foi feito baseando-se no trabalho de Qiu (Qiu, et al. 2006) da seguinte forma:

Pré-inóculos dos mutantes dos reguladores de QS além do mutante para o regulador transcricional MvaT e da linhagem selvagem foram inoculados em 3 mL de meio LB durante a noite sob agitação de 250 rpm e temperatura constante a 37°C. A partir destes pré-inóculos, as culturas foram diluídas para DO₆₀₀ = 0,1 em 40 mL de meio LB e postas novamente para crescer nas condições já mencionadas. As culturas foram monitoradas através de absorbância em espectrofotômetro de hora em hora até que atingissem as fases de crescimento desejadas (exponencial DO₆₀₀= 1,0, exponencial tardia DO₆₀₀= 2,0, transição para a fase estacionaria DO₆₀₀= 3,0 e fase estacionaria DO₆₀₀= 4,0) e então 1 mL das culturas foram removidas de seus frascos, centrifugadas, o sobrenadante foi aspirado e então as células foram suspensas em Trizol (Invitrogen) e congeladas para posterior extração do RNA.

Após extração do RNA todas as amostras tiveram sua concentração estimada por absorbância em NanoDrop (Thermo Scientific) por leitura de A₂₆₀. Aproximadamente 3 ng do

RNA total de cada uma das amostras foi devidamente tratado com DNase I (Fermentas) e inibidor de RNase (RiboLock Fermentas) e destes 1 ng foi utilizado como molde para a síntese de cDNA com oligonucleotídeos hexaméricos randômicos e transcriptase reversa ImProm II (Promega) ou RevertAid Premium Reverse Transcriptase (Fermentas).

O cDNA foi utilizado para ensaios de PCR quantitativo (qPCR) descritos mais a frente a fim de verificar a influência dos genes reguladores de QS e o mutante de *mvaT* na frequência de excisão de PAPI-1 do cromossomo.

3.7 Influência de diferentes concentrações do segundo mensageiro c-di-GMP na excisão/manutenção de PAPI-1.

Utilizando-se das linhagens RB205 e RB206 (Tabela 3) com o propósito de verificar se os níveis de c-di-GMP, têm um papel na frequência de excisão de PAPI-1.

Pré-inóculos seguiram as mesmas condições das previamente descritas no item acima entretanto quando estas duas linhagens foram inoculadas em 40 mL de meio LB, foi acrescentado arabinose na concentração final de 1%.

Extração de RNA, tratamento e síntese de cDNA foram feitas conforme descrito previamente.

3.8 Influência de estresse térmico na excisão/manutenção de PAPI-1.

Um pré-inóculo de PA14 foi crescido durante a noite e então a partir deste, dois inóculos foram feitos meio LB para $DO_{600} = 0,1$, e foram mantidos a 30°C sob agitação. Aguardou-se até que as culturas chegassem a fase exponencial inicial ($DO_{600} = 0,5$) e então uma delas foi submetida a choque térmico (42°C) enquanto a outra permaneceu a 30°C. Aliquotas de 1 mL foram retiradas de ambas as amostras nos tempos 0, 5, 30 e 60 minutos,

foram centrifugadas, o sobrenadante foi aspirado e então as células foram ressuspensas em trizol (Invitrogen) e congeladas.

O RNA total foi extraído, quantificado e tratado como descrito anteriormente, a fim de se comparar a influência de choque térmico na excisão da ilha o PCR quantitativo em tempo real (qPCR) foi feito para cada uma das amostras extraídas usando-se os oligonucleotídeos mostrados na Tabela 4 de acordo com o descrito a seguir.

3.9 Ensaios de PCR quantitativo (qPCR)

Ensaios de qPCR serão realizados a fim de verificar a variação da frequência de excisão de PAPI-1 sob as diferentes condições apresentadas anteriormente. Oligonucleotídeos foram desenhados seguindo a mesma lógica apresentada por Qiu e seus colaboradores (2006), mas seguindo as especificações recomendadas para amplificação com o equipamento 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems), ou seja, temperatura de anelamento de 60°C e fragmento amplificado de 80 a 150 bp. O seguinte programa foi utilizado: 60°C 2 minutos; 95°C 10 minutos e 40 ciclos de 95°C 15 segundos; 60 °C 1 minuto. Foram utilizados 10 ng de DNA de cada amostra para os ensaios e o fluoróforo utilizado foi o Maxima SYBR Green (Fermentas). As taxas de excisão relativas foram calculadas de acordo com o método de $-2^{\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen 2001). O gene *nadB*, que possui apenas uma cópia no cromossomo, foi utilizado como normalizador.

3.10 Construção das linhagens superexpressando PvrR e PA14_72420.

Com a finalidade de verificar se os níveis do segundo mensageiro c-di-GMP, têm um papel na transferência de PAPI-1, linhagens superexpressando a fosfodiesterase PvrR, codificada por um gene presente em PAPI-1, ou a diguanilato ciclase PA14_72420 foram

construídas. As construções mini-CTX2 contendo os genes *pvrR* ou PA14_72420, ambos sob o controle de um promotor indutível por arabinose foram construídas pelo doutorando Gianluca Nicastro (Tabela 2). *E. coli* S17-1 contendo essas construções foram utilizadas como doadoras de conjugação para a linhagem *cupD1::MrT7*, resistente ao antibiótico gentamicina. A seleção dos transconjugantes foi feita em 50 µg/mL gentamicina e 100 µg/mL tetraciclina, originando duas linhagens que foram denominadas de RB403 (contendo uma cópia de *pvrR* sob o controle de P_{BAD}) e RB404 (P_{BAD}-PA14_72420).

Para retirar o cassete de resistência a tetraciclina do cromossomo, células de S17-1 carregando o plasmídeo pFLP2 foram conjugadas com as linhagens contendo os cassetes de superexpressão de PA14_72420 e PvrR. Após conjugação, a mistura de células foi estriada em placas LB contendo 50 µg/mL de gentamicina e 10 µg/mL de ácido nalidíxico. Para a contra seleção, aproximadamente 50 colônias isoladas de cada uma das conjugações foram plaqueadas tanto em meio LB contendo gentamicina quanto LB contendo gentamicina e tetraciclina. Foram selecionadas apenas as células que cresceram em gentamicina e perderam a capacidade de crescer em tetraciclina, indicando a excisão das sequências do vetor mini-CTX2 pela ação da FLP recombinase, dando origem às linhagens RB407 (P_{BAD}-PvrR) e RB408 (P_{BAD}-PA14_72420). Como o pFLP2 não se replica em *P. aeruginosa* e, portanto, é perdido espontaneamente, não houve necessidade de contra-seleção.

3.11 Detecção da ilha de XAC na forma episomal

Para verificar se a região contendo os genes conservados de PAPI-1 em *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* 306 também possui a capacidade de se excisar do cromossomo, oligonucleotídeos foram desenhados baseando-se no mesmo princípio descrito na figura 1 (Qiu, et al. 2006). Os oligonucleotídeos usados estão descritos na Tabela 3.

3.12 Ensaio de interação proteína-proteína – duplo híbrido

3.12.1 Escolha das iscas

Inicialmente foram clonados os genes XAC2269, PA14_59860 no vetor pOBD para serem utilizados como iscas no sistema de duplo híbrido, considerando-se a homologia entre eles a fim de avaliar se uma proteína heteróloga (no caso de PA14_5986) é capaz de interagir com as mesmas presas que a proteína codificada por XAC2269 é capaz de reconhecer. Também foi escolhida a proteína XAC2260, homóloga de PA14_59700, sendo que ambas são homólogos a um dos genes presente na ilha genômica ICEHin1056 de *Haemophilus influenza* que faz parte do sistema de secreção tipo IV, responsável pela transferência deste elemento móvel à outros microrganismos.

3.12.2 Clonagem das iscas.

As ORFs a serem utilizadas como iscas foram amplificadas por PCR, usando-se DNA genômico de XAC ou PA14 e oligonucleotídeos desenhados especificamente com base na sequência dos genomas (Tabela 3). Os produtos de PCR foram inicialmente clonados no vetor pGEM-T easy (Promega), sequenciados com o kit BigDye Terminator v.3 (Applied Biosystems) e após confirmação de que os fragmentos amplificados não contém erros, os insertos foram isolados e clonados no vetor pOBD abaixo e em mesma fase de leitura com o domínio de ligação ao DNA GAL4. Após transformação em células de *E. coli* DH5 α , colônias isoladas crescidas em meio com ampicilina (gene *bla* no vetor pOBD) foram selecionadas para serem isolados os plasmídeos e a clonagem confirmada por digestão com enzimas de restrição apropriadas e eletroforese em gel de agarose. Após confirmação das construções, estas foram introduzidas em levedura por transformação (abaixo).

3.12.3 Transformação rápida em levedura.

Transformação rápida dos plasmídeos pOBD-isca foi realizada usando-se o protocolo modificado a partir de Gietz *et al* e, (Gietz & Woods 2002; Alegria, et al. 2004). Resumidamente, células de culturas frescas foram obtidas de placas, lavadas com água estéril e adicionadas rigorosamente nesta sequência: solução contendo PEG MW 3350 (50%), acetato de lítio (0,1 M), DNA de espermatozoides de salmão (0,1 mg/mL) e 0,5 -10 µg de DNA plasmidial. A mistura foi homogeneizada e então incubada a 42°C por 30 minutos. A suspensão foi centrifugada, lavada novamente em água, e alíquotas foram semeadas em placas SC-Trp e incubadas a 30°C por um período de 2 a 4 dias. Os clones obtidos foram repicados em novas placas contendo o mesmo meio (SC-Trp).

3.12.4 Teste de auto-ativação para as iscas.

A fim de se determinar se as iscas utilizadas eram capazes de auto-ativar a expressão dos genes repórteres, os seguintes testes de auto-ativação foram realizados:

Auto ativação do gene repórter *GAL1-HIS3* - Para determinar a quantidade de 3-aminotriazol (3-AT), a ser usado em cada isca, células de levedura contendo o plasmídeo pOBD-isca foram plaqueadas em meio SC-His-Trp contendo 0, 5, 10, 25, ou 50 mM de 3-AT e incubados por 5 dias a 30°C e a concentração inibitória de 3-AT (ausência de colônias) foi determinada para cada isca.

O 3-AT é um inibidor competitivo da proteína His3p, codificada pelo gene *HIS3*, que no caso de PJ694-a está sob o controle de um promotor *GAL*. Esta molécula é capaz de inibir baixos níveis de His3p e, desta forma, apenas os clones que conseguirem expressar níveis mais altos dessa proteína serão capazes de crescer em carência de histidina (James, et al. 1996).

Auto ativação do gene repórter *GAL2-ADE2* – Clones serão crescidos em meio SC-Trp-Ade (meio seletivo) ou YAPD (como controle positivo) foram incubados à 30°C por

cinco dias. O crescimento de colônias em placas com meio seletivo indicaria auto-ativação do gene repórter.

3.12.5 Transformação com a biblioteca de duplo-híbrido.

Os transformantes contendo a construção pOBD+isca mantidas em placas SC-Trp foram crescidos durante a noite em 50 mL de meio SC-Trp líquido. A cultura foi centrifugada a 4000 rpm durante 5 minutos e o pellet foi suspenso em 1 mL de YAPD líquido e diluído em 150 mL de YAPD. As células foram crescidas sob agitação a 200 rpm e a temperatura de 30°C até atingir uma densidade óptica de 2,0 ($DO_{600} = 2,0$). Assim que as células atingiram a densidade necessária, a cultura foi centrifugada durante 5 minutos a 4000 rpm e então o pellet foi lavado com 75 mL de água estéril, seguido de mais um passo de centrifugação por 5 minutos a 4000 rpm. A esse pellet, foi adicionado 3 mL de acetato de lítio 100 mM e foi incubado a 30°C durante 15 minutos. Decorrido o tempo da incubação, as células foram centrifugadas por 5 minutos a 4000 rpm, o sobrenadante foi desprezado e os seguintes reagentes foram adicionados rigorosamente nessa ordem: 7,2 mL de PEG 3350 50%, 1,08 mL de acetato de lítio 1 M, 1,5 mL de DNA de espermatozoides de salmão ou arenque, 30 µL do DNA da biblioteca e 190 µL de água estéril para completar o volume final para 10 mL. O pellet foi suspenso e incubado a 30°C por 15 minutos, os tubos foram agitados a cada 5 minutos, e subsequentemente incubados a 42°C por 45 minutos, sempre agitando os tubos a cada 10 minutos. Decorrido o tempo da incubação, novamente a amostra foi novamente centrifugada por 5 minutos a 4000 rpm, e o pellet de células foi suspenso em um volume final de 10 mL de água estéril, distribuindo-se o conteúdo em 10 placas de Petri de 20cm de diâmetro contendo meio SC-Trp-His-Leu com a quantidade necessária de 3-AT para cada isca. As placas foram incubadas de 12 a 15 dias a 30°C, até o aparecimento das colônias.

Após transformação das linhagens contendo o pOBD-isca com a biblioteca de pOAD as colônias que crescerem no meio seletivo SC-Trp-Leu-His, foram então repicadas para uma nova placa contendo meio seletivo SC-Trp-Leu-His-Ade e incubadas de 3 a 5 dias a 30°C.

3.12.6 Isolamento do DNA Plasmidial da levedura.

O DNA plasmidial foi isolado da colônia de levedura capaz de crescer sob a seleção de ambos os repórteres. As células foram crescidas em 1,5 mL de meio SC-Leu à 30°C durante 48 horas e então centrifugadas à 2700 rpm durante 8 minutos e o sobrenadante descartado. Os pellets foram suspensos no volume residual de meio de cultura e então foi adicionado o 1 mL de tampão de recuperação (50 mM Tris pH=7,5, 10 mM EDTA e 0,3% de β -mercaptoetanol). A mistura foi então centrifugada novamente, descartado o sobrenadante e o pellet suspenso no volume residual. Então, foi adicionado 25 μ L de solução de lise (tampão de recuperação contendo 0,2 mg/mL de RNase e enzima de lise 4 mg/mL), homogeneizadas e incubadas por 1 hora a 37°C sob agitação de 150 rpm. Após esse tempo, 25 μ L de SDS 10% foram adicionados e a amostra incubada durante 5 minutos em temperatura ambiente, quando foi acrescentado 100 μ L de acetato de potássio 3 M pH 5,2, o material foi homogeneizado e deixado em banho de gelo durante 10 minutos. Centrifugou-se as amostras a 4000 rpm à 4°C por 15 minutos e o sobrenadante foi recuperado e 200 μ L de etanol 100% foi adicionado. Sucedeu-se um novo passo de centrifugação (4000 rpm, 4°C por 15 minutos) e o sobrenadante foi descartado seguido de uma nova lavagem com 100 μ L de etanol 70% e subsequente centrifugação. Após descarte do sobrenadante, as amostras foram secas e o pellet de DNA suspenso em 15 μ L de água milli-Q estéril (Alegria, et al. 2004).

3.12.7 Transformação do DNA plasmidial em *E. coli*.

O DNA plasmidial isolado da levedura foi então transformado em *E. coli* KC8 por dois métodos diferentes:

Choque térmico - As células de *E. coli* KC8 competentes preparadas segundo o método de Nishimura et al (Nishimura, et al. 1990) para choque térmico foram descongeladas em gelo e assim que estivessem prontas para serem utilizadas, foi acrescentado 5 µl da extração de plasmídeos das leveduras e permaneceram no gelo por mais 30 minutos. Então foram colocadas em banho Maria a 42°C durante 1 minuto e imediatamente devolvidas ao gelo, onde permaneceram por mais 1 ou 2 minutos. Foi acrescido 900 µl de LB e as células ficaram recuperando sob agitação durante 45 minutos a 37°C. Após esse período todos os 900 µl de células foram semeadas em placas contendo meio M9 com carência de leucina e contendo o antibiótico ampicilina, sendo incubadas de 1 a 2 dias a 37°C.

Eletroporação – As células de *E. coli* KC8 eletrocompetentes transformadas utilizando-se de cubetas de 0,2 cm, com pulso de 2,5 kV, 200 Ω e 25 µF e plaqueadas em meio mínimo M9 contendo ampicilina e com carência do aminoácido leucina para seleção do vetor pOAD.

3.12.8 Extração de plasmídeo dos transformantes em *E. coli* KC8.

Após transformar as células com os plasmídeos extraídos da levedura, foi feita a extração dos plasmídeos das culturas em placa de 96 poços com ajuda do sistema Millipore Multiscreen GV. Células de *E. coli* KC8 foram crescidas durante a noite em 1 ml de meio LB contendo ampicilina em placa de 96 poços. Após o crescimento, as células foram centrifugadas durante 8 minutos a 2700 rpm em temperatura ambiente e o sobrenadante descartado. Sobre o pellet foi adicionado 200 µl de GET (0,92% de Glicose, 10 mM de EDTA e 26 mM de Tris pH 7,4) e então ressuspensão em vortex. A essa mistura, adicionamos mais 85 µl de GET contendo 0,5 mg/ml de RNase e novamente misturamos com auxílio de vortex. A seguir adicionamos a solução de lise (0,2 N de NaOH e 1% SDS), misturamos levemente e incubamos a amostra por 5 minutos em temperatura ambiente. Passado o tempo de incubação, foi acrescentado 60 µl de acetato de potássio 3 M gelado, misturamos delicadamente e

incubamos por mais 10 minutos em temperatura ambiente, vedamos a placa e então levamos as amostras ao forno aquecido a 90°C de 30 a 40 minutos. Na sequência as amostras ficaram de 15 a 30 minutos em banho de gelo e então centrifugadas por 15 minutos a 4000 rpm a 4°C. Preparar placas contendo 110 µl de isopropanol em cada poço e transferir o conteúdo da outra placa para o sistema Multiscreen GV da Millipore, que se encaixa na placa de 96 poços já contendo o isopropanol e então a amostra é centrifugada a 4°C a 4000 rpm por 40 minutos. O sobrenadante foi descartado e então foi acrescentado 200 µl de etanol 70% em cada poço e então as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 4°C e a 4000 rpm, e então descartado o sobrenadante. A placa foi deixada em fluxo laminar durante 30 minutos para secagem e então as amostras foram suspensas em 50 µl de água.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Papel dos genes PA14_59710, PA14_59860, PA14_59880, PA14_59920 e PA14_59940 e da fase de crescimento na excisão de PAPI-1

Qiu e colaboradores (Qiu, et al. 2006) demonstraram que mutações em *int* fizeram com que a ilha PAPI-1 não se encontrasse mais na forma epissomal, ficando dessa forma sempre integrada ao cromossomo, enquanto mutações em *soj* fizeram com que a célula perdesse a ilha. Uma hipótese seria a de que alguns dos genes estudados neste projeto pudessem participar também do processo de excisão.

Foram feitos ensaios de PCR combinatorial (Seção3.3) com as linhagens PAO1, PA14, PA14_59710::MrT7, PA14_59860::MrT7, PA14_59880::MrT7, PA14_59920::MrT7 e PA14_59940::MrT7, em diferentes fases de crescimento. Foram obtidos produtos de amplificação de aproximadamente 1600 pb correspondentes aos limites de PAPI-1 com o cromossomo, a partir dos oligos 4542F + intF e 4541F + *soj*R (Figura 7, canaletas a e b, respectivamente) e com sua forma epissomal (oligos intF + *soj*R Figura 7, canaletas c), para todas as linhagens derivadas de PA14. O produto correspondente ao cromossomo desprovido de ilha (oligos 4541F+4542F, Figura 7, canaletas d) não pode ser observado em nenhuma das linhagens mutantes e tampouco na selvagem. Este último produto foi observado apenas com amostras de PAO1 utilizadas como controle (Figura 7B, canaletas d), que não carrega PAPI-1.

Nenhuma alteração quanto à excisão ou a manutenção da ilha foi identificada em nenhum dos mutantes analisados, em relação à linhagem PA14, nas condições analisadas, sugerindo que os genes PA14_59710, PA14_59860, PA14_59880, PA14_59920 e PA14_59940 não estão envolvidos com a excisão de PAPI-1 do cromossomo. Entretanto, esse

foi um experimento apenas qualitativo, não se podendo medir se há uma contribuição dos genes mutados na frequência de excisão e/ou manutenção de PAPI-1.

Figura 7 – PCR combinatório do DNA total das linhagens PA14 (A); PAO1 (B); PA14_59940::MrT7 (C); PA14_59920::MrT7 (D); PA14_59880::MrT7 (E) e PA14_59860::MrT7 (F), obtidos com os pares de oligonucleotídeos 4542F+intF (a); 4541F+sojR (b); intF+sojR (c); 4541F+4542F (d); DO₆₀₀; densidade ótica das culturas em diferentes fases de crescimento. Os conjuntos de oligonucleotídeos (a) e (b) amplificam os flancos da ilha integrada, o par (c), a forma episssomal e o par (d), o cromossomo desprovido de ilha. Os produtos foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

Uma informação importante que pode ser retirada desse experimento é que a intensidade dos produtos da forma epissomal (canaletas c) encontrava-se aumentada quando as amostras provinham de células obtidas de cultura em fase exponencial tardia/início de fase estacionária ($DO_{600} = 3$ e 4). A fim de se estimar esse aumento, ensaios de PCR semi-quantitativos foram inicialmente realizados para verificar se a fase de crescimento tem influência na frequência de excisão de PAPI-1.

D

Figura 8 – Eletroforese em gel de agarose mostrando os produtos do PCR combinatorial usando como molde o DNA da linhagem selvagem de PA14 e os oligos intF+sojR, que detectam a forma epissomal de PAPI-1. Os números que vão de 16 a 25 representam o número de ciclos de PCR completados antes da retirada das amostras do termociclador. DO₆₀₀: densidade ótica das culturas das quais as amostras de DNA foram obtidas (A e B). Curva de crescimento de PA14 (C). Frequência relativa da excisão de PAPI-1 do cromossomo em relação a fase de crescimento (D).

Na figura 8, pode-se observar que, em células na fase de crescimento exponencial (DO₆₀₀= 0,6 e 1,2), os produtos da amplificação da ilha na forma epissomal começam a aparecer apenas após 22 ciclos de PCR. Já nas fases mais tardias, quando a taxa de crescimento já é menor (2,4; 3,0 e 4,0), as bandas tornaram-se evidentes a partir do 20º ciclo na DO₆₀₀= 2,4; e no 18º ciclo nas DO₆₀₀= 3,0 e 4,0. Considerando que a cada ciclo da reação de PCR a quantidade de produto presente na amostra dobra e levando em conta que a mesma quantidade de DNA foi usada como molde em cada amostra, pode-se concluir que a forma epissomal de PAPI-1 se mantém numa frequência constante na fase de crescimento exponencial e, quando a taxa de crescimento diminui, essa frequência aumenta, estabilizando-se na fase estacionária (Figura 8C). Neste experimento semi-quantitativo, não foi utilizado nenhum controle interno de amplificação, para garantir que a concentração inicial de DNA estivesse uniforme em todas as reações. Para que se pudesse ter uma melhor estimativa, oligonucleotídeos foram desenhados para ensaios de PCR quantitativo (Tabela 4) flanqueando

as regiões *att* de PAPI-1, a fim de verificar a quantidade relativa da forma epissomal durante a curva de crescimento. O gene *nadB* foi utilizado como referência para o ensaio.

Figura 9 – Ensaio de PCR quantitativo utilizando 10 ng de DNA de PA14 obtido de células em diferentes fases de crescimento da cultura. Os oligonucleotídeos utilizados para este ensaio foram qPCR_RL001_R e qPCR_sojR, com a finalidade de amplificar a forma epissomal de PAPI-1. *nadB* foi amplificado e utilizado como normalizador da quantidade de DNA total. Os resultados são a média de três experimentos independentes.

Neste ensaio quantitativo, ficou evidente que a frequência de excisão de PAPI-1 não é constante durante as diferentes fases de crescimento da cultura e, diferentemente do que foi mostrado no ensaio semi-quantitativo, onde a frequência de PAPI-1 se mantinha constante nas fases mais tardias da cultura, estes ensaios quantitativos mostraram um pico na fase de crescimento exponencial tardio ($DO_{600}=2$), e conforme fosse chegando a fase estacionária da cultura (DOs 3 e 4), a frequência de ilhas na forma epissomal diminui até próximo aos níveis iniciais. A aparente incoerência desses resultados pode ter sido ocasionada pela ausência de um normalizador interno nos ensaios semi-quantitativos, o que não permitiu a detecção da queda na frequência de excisão em $DO_{600}=4$.

4.2 Ensaio de transferência de PAPI-1 para linhagem receptora PAO1.

Com a finalidade de verificar se os genes conservados em PAPI-1 e outras ilhas genômicas estavam envolvidos na sua transferência para outras linhagens, ensaios de conjugação foram feitos. As linhagens doadoras foram derivadas de PA14 que contém o transposon MrT7 em genes presentes em PAPI-1 que, além de interromper esses genes, fornece uma marca de resistência a gentamicina que é usada na seleção dos transconjugantes, conforme descrito em MATERIAL E MÉTODOS (Seção 3.5).

Tabela 5 - Frequência de conjugação para mutantes de PAPI-1

Linhagem doadora*	<i>tfc</i>	Frequência de conjugação (transconjugantes/receptores)
PA14_59940::MrT7	<i>tfc16</i>	0
PA14_59920::MrT7	<i>tfc14</i>	0
PA14_59880::MrT7	<i>tfc10</i>	0
PA14_59860::MrT7	<i>tfc9</i>	0
PA14_59710::MrT7		$1,59 \times 10^{-2} \pm 0,02 \times 10^{-2}$

*As linhagens apresentam transposon interrompendo genes de PAPI-1 em estudo. A linhagem PA14_59710::MrT7, com transposon em *cupDI*, foi usada como controle positivo.

Como descrito anteriormente, um conjunto de genes envolvido na propagação de ilhas genômicas de *H. influenza* apresenta genes similares aos encontrados em PAPI-1. Apesar dos autores terem denominado esse sistema de propagação como um novo sistema de secreção tipo IV, a similaridade entre as proteínas de *H. influenza* com sistemas bem descritos é pequena. Alguns desses genes mostraram-se essenciais para a propagação da ilha genômica ICEHin1056 de *H. influenza*, sendo que mutações nesses genes diminuem acentuadamente a eficiência de conjugação (Juhas, et al. 2007). Os genes PA14_59710, PA14_59860, PA14_59880, PA14_59920 são importantes para a eficiência da conjugação (Tabela 5), já que transconjugantes não foram obtidos quando as linhagens mutantes nesses genes foram usadas como doadoras, em inúmeras ocasiões onde os ensaios foram repetidos.

O gene PA14_59940 é homólogo ao gene p1056.45 do elemento móvel ICEHin1056, que se mostrou envolvido com a conjugação em *H. influenzae*, corroborando os resultados

apresentados. Ambos possuem um domínio VirB4, que é envolvido na formação do pilus conjugativo, o que explicaria a diminuição da frequência de conjugação tanto em *H. influenzae* (Juhás, et al. 2007) quanto em *P. aeruginosa*.

A linhagem mutante no gene PA14_59920 não foi eficiente como doadora na conjugação (Tabela 5), sugerindo que este gene também tenha um papel no processo. O gene correspondente em ICEHin1056, *tfc14*, também está envolvido com a transferência deste elemento, ainda que a linhagem mutante apresente pilus (Juhás, et al. 2007). Portanto, o produto deste gene aparentemente não tem função na montagem no aparato de transferência, mas tem função na transferência em si.

A mesma deficiência na transferência de PAPI-1 foi notada quando os genes PA14_59880 e PA14_59860 foram interrompidos pela inserção do transposon (Tabela 5). Estes genes correspondem aos *tcf10* e *tfc9*, que não foram avaliados na conjugação de ICEHin1056, sendo portanto esse trabalho o primeiro a demonstrar o possível papel destes genes na transferência das ilhas da família GI.

Figura 10 – Comparação entre a região de PAPI-1 contendo os mutantes testados nos ensaios de transferência com sua região homóloga em ICEHin1056. Os genes mostrados correspondem aos anotados como RL030 a RL020 na Figura 4. Em amarelo, está destacado o gene que codifica uma proteína homóloga a VirB4 (RL022 ou PA14_59940 em PAPI-1 e *tfc16* em ICEHin1056). Em vermelho estão os outros genes homólogos entre as duas ilhas genômicas. A barra superior mostra o tamanho em Kb e cada seta representa um gene e sua orientação.

Foi demonstrado que, em ICEHin1056, os genes que codificam para o T4SS responsável pela transferência deste elemento estão organizados em dois operons que vão de

tfc1 a *tfc19* e de *tfc24* a *tfc20*. Como todos estes genes testados de PA14 estão aparentemente organizados também como um operon em PA14, não se pode descartar um possível efeito polar da inserção do transposon nos primeiros genes sobre a expressão do homólogo de VirB4, por exemplo. Para que se confirmasse o efeito de cada um dos genes analisados, seria necessário que mutações não polares fossem construídas. Por outro lado, provavelmente todos os genes do provável operon PA14_59860- PA14_59960 codificam proteínas que estão diretamente envolvidas com a transferência de PAPI-1, devido a sua organização e sintenia entre as várias ilhas da família GI.

4.3 Influência da percepção de quorum na excisão/manutenção de PAPI-

1.

A percepção de quorum regula uma grande quantidade de genes em *P. aeruginosa*, tendo sido mostrado em experimentos de análise de transcriptoma que ele regula diferencialmente pelo menos 616 genes, incluindo genes envolvidos com processamento de nitrato, com a via geral de secreção, genes para a formação de pilus, genes envolvidos com quimiotaxia, além de genes envolvidos com virulência e formação de biofilmes, e uma grande quantidade de genes hipotéticos (Wagner, et al. 2003). Como esses e outros experimentos de análise de transcriptoma se valem dos Affimetrix GeneChips (Déziel, et al. 2004), desenhados a partir da sequência do genoma de PAO1, nenhum dado relativo à expressão dos genes presentes em PAPI-1 está contido nesses trabalhos. Sabe-se que há uma certa hierarquia na sequência de expressão dos genes de percepção de quorum, sendo que o primeiro a entrar em ação é a via de Las, seguido pela de Rhl no final da fase exponencial de crescimento. A via de PQS/MvfR tem seu funcionamento máximo durante a fase exponencial tardia/início de fase estacionária ($DO_{600} = 2,5$) (Déziel, et al. 2004; Wade, et al. 2005). A análise do promotor de *soj* na linhagem selvagem mostrou que seu pico de expressão ocorre no início de fase

estacionária (Qiu et al. 2006), coincidindo com o pico de concentração de C₄-HSL sintetizado por RhlI (Déziel, et al. 2005; Qiu, et al. 2006).

Para verificar se a expressão dos genes *int* e *soj* poderia estar sob a influência de QS, ensaios de RT-PCR quantitativo foram feitos com linhagens mutantes em *lasR*, *rhlR* ou *mvfR*, que codificam os reguladores transcricionais de QS em *P. aeruginosa*

Figura 11 – Expressão relativa de *int* nos mutantes de percepção de quorum, tendo como base a expressão em PA14, em DO₆₀₀=1. Amostras de RNA foram coletadas ao longo do crescimento da linhagem selvagem PA14 e dos mutantes nos genes *lasR*, *rhlR* e *mvfR* e a expressão relativa de *int* foi determinada por qRT-PCR, usando a expressão de *nadB* como normalizador.

A Figura 11 mostra que a expressão de *int* apresenta-se bastante aumentada nos mutantes *rhlR* e *mvfR*, enquanto o mutante do regulador *lasR* comportou-se como a linhagem selvagem. Nos mutantes *rhlR* e *mvfR*, a diferença na expressão em relação à PA14 é muito grande, variando de 69 a 172 vezes para o mutante de *rhlR* e de 57 a 282 no de *mvfR*,

sugerindo que RhlR e MvfR inibem direta ou indiretamente a expressão de *int*. Como o sistema Las é necessário para a expressão máxima de *rhlR* e *mvfR*, estes resultados mostram que a inibição da expressão de *int* nesses mutantes acontecem por um mecanismo ainda não elucidado.

Para verificar se houve aumento na excisão de PAPI-1 correspondente ao aumento de mRNA de *int*, ensaios de qPCR com DNA extraído das linhagens selvagem, e nos mutantes de *rhlR* e *mvfR* foram feitos (Figura 12).

Figura 12 – Frequência de excisão de PAPI-1, estimada por PCR quantitativo utilizando DNA das linhagens mutantes para os reguladores de QS, em relação à linhagem selvagem. O gene *nadB* foi utilizado como normalizador da quantidade de DNA cromossômico presente em cada amostra.

No mutante *rhlR*, a frequência de excisão aumenta gradualmente até a $DO_{600} = 4$, porém as diferenças em relação a PA14 são significativas apenas neste último ponto da curva de crescimento. Pode-se concluir que, apesar da maior expressão de *int* no mutante *rhlR*, esse aumento de expressão não é suficiente para aumentar a frequência de excisão de PAPI-1 durante o crescimento, podendo indicar que outros fatores presentes em altas densidades celulares também estejam envolvidos.

Já no mutante *mvfR*, a frequência de excisão de PAPI-1 foi quatro vezes maior que em PA14 em $DO_{600}=1$, mantendo-se constante durante as diferentes fases da cultura. Portanto, MvfR deve controlar outros fatores importantes para a excisão de PAPI-1, além de *int*, visto que a maior frequência de excisão não corresponde ao pico de ativação da via regulada por MvfR. Desta forma, é possível que *rhlR* e *mvfR* estejam provavelmente controlando a excisão de PAPI-1 de alguma forma indireta.

Como a expressão de *int* e a frequência de excisão aumentam nos mutantes de *rhlR* e de *mvfR*, seria esperado que a expressão de *soj* acompanhasse o aumento de frequência de ilhas excisadas, já que *soj* somente é transcrito quando PAPI-1 encontra-se na forma epissomal, com seu promotor localizado à montante de sua região codificadora. Entretanto, os níveis de mRNA de *soj* não se alteraram em nenhum dos mutantes de QS analisados, como mostra a Figura 13. Nessa figura, também é possível verificar que, apesar da maior frequência de ilhas na forma epissomal em $DO_{600}=2$ (Figura 12), não foi possível detectar um aumento correspondente na expressão de *soj* nessa fase de crescimento, o que pode indicar que nem todas as poucas células na população que apresentam PAPI-1 epissomal expressam *soj* constitutivamente, ou ainda que os níveis de indução da expressão sejam mais baixos do que o detectado por essa abordagem.

Figura 13 – Expressão relativa de *soj* nos mutantes dos reguladores de percepção de quorum tendo como base PA14, em DO₆₀₀=1. Amostras de RNA foram coletadas ao longo do crescimento da linhagem selvagem PA14 e dos mutantes nos genes *lasR*, *rhlR* e *myfR* e a expressão relativa de *soj* foi determinada por qRT-PCR, usando a expressão de *nadB* como normalizador.

4.4 Influência do mutante de *mvaT* na frequência de excisão/manutenção de PAPI-1

MvaT é uma proteína funcionalmente semelhante a membros da família H-NS de proteínas associadas ao DNA, além de ser um provável regulador transcricional. Foi documentado que proteínas H-NS reprimem mais de 400 genes em *Salmonella*, sendo que aproximadamente 90% destes foram provavelmente adquiridos por transferência horizontal (Navarre, et al. 2007). Em ICEBs1, encontrado em *Bacillus subtilis*, um membro da família das proteínas H-NS conhecida como ImmR, reprime os genes necessários para a transferência deste elemento para outras células bacterianas (Auchtung, et al. 2007). Recentemente, foi demonstrado que um membro da família H-NS presente no plasmídeo R27 de *Salmonella* restringiu-se apenas em regular uma pequena quantidade de genes que foram provavelmente adquiridos por transferência horizontal, em comparação com as centenas de genes regulados

pela H-NS codificada pelo cromossomo (Baños, et al. 2009). Em *P. aeruginosa*, MvaT está envolvida na percepção de quorum e na formação de biofilme e foi descrita como um regulador global de genes de virulência (Diggle, et al. 2002). Como MvaT foi proposto como um repressor de genes exógenos, ou seja, incorporados no genoma por transferência horizontal (Castang, et al. 2008), seu papel na expressão dos genes *int* e *soj* foi analisada. Para testarmos esta hipótese, ensaios de qRT-PCR foram feitos com uma linhagem mutante no gene *mvaT*.

Figura 14 – Expressão relativa de *int* no mutante de *mvaT* durante o crescimento de *P. aeruginosa*. Amostras de RNA foram extraídas da cultura durante as diferentes fases de crescimento tanto da linhagem selvagem quanto do mutante *mvaT*. Tendo como base PA14, em $DO_{600}=1$, a expressão de *int* foi determinada por qRT-PCR usando a expressão do gene *nadB* como normalizador.

Na Figura 14, estão contidos os resultados desses experimentos, mostrando que no mutante de *mvaT* o nível de expressão relativa de *int* teve apenas um pequeno aumento, que não foi considerado relevante, sugerindo que MvaT não regula a expressão de *int*. Nesse tipo de ensaio, foi considerado como diferencialmente expressos apenas valores maiores que 4, já que uma pequena variação intrínseca é frequentemente encontrada.

Figura 15 – Nível de expressão relativa de *soj* no mutante de *mvaT* durante as diferentes fases de crescimento de *P. aeruginosa*. Amostras de RNA foram extraídas da cultura durante o crescimento tanto da linhagem selvagem quanto do mutante *mvaT* tendo como base PA14, em $DO_{600}=1$ e a expressão de *soj* foi determinada por qRT-PCR usando a expressão do gene *nadB* como normalizador.

Não foram detectadas diferenças na expressão de *soj* no mutante de *mvaT* quando comparado com a linhagem selvagem (Figura 15), sugerindo que MvaT não estaria regulando a expressão de *soj*, assim como a de *int*. Porém, como em *P. aeruginosa* existe uma segunda proteína H-NS, denominada MvaU, que é capaz de se ligar ao DNA, com algumas diferenças sutis, às mesmas regiões que MvaT (Castang, et al. 2008), esta poderia suprimir a ausência de MvaT. Portanto, a fim de se concluir se os genes *int* e *soj* são reprimidos por proteínas da família H-NS, seria necessário analisar sua expressão no duplo mutante *mvaT-mvaU*, que não se encontra disponível na linhagem PA14. Em PAO1, este mutante duplo apresenta um crescimento bastante reduzido, devido a indução do profago Pf-4 (Li, et al. 2009).

4.5 Influência de diferentes concentrações do segundo mensageiro c-di-GMP na excisão/manutenção de PAPI-1.

O segundo mensageiro c-di-GMP é um segundo mensageiro em bactérias que tem despertado interesse crescente, por seu papel na alternância entre os estilos de vida sésil e móvel, dentre outros efeitos. Esta molécula regula diretamente a expressão de vários genes em *P. aeruginosa*, sendo que 15 são regulados positivamente e 31 são regulados negativamente em células com altos níveis de c-di-GMP (Starkey, et al. 2009). Elevados níveis de c-di-GMP fazem com que as células se agreguem, formando biofilmes, por promover a expressão de genes de fimbria e de matriz de exopolissacarídeo. Já baixos níveis de c-di-GMP estimulam a motilidade e virulência.

A transferência de DNA depende de contato entre as células e altos níveis de c-di-GMP poderiam contribuir para este processo. Assim, pode-se supor que o aumento da concentração intracelular deste segundo mensageiro elevaria a frequência de transferência de PAPI-1 para outras linhagens, o que poderia refletir um aumento na expressão de *int*, já que a transferência depende de que a ilha esteja na forma episomal. Caso a frequência de excisão aumente, também haveria um aumento na expressão de *soj*, já que seu promotor encontra-se na extremidade oposta da ilha só podendo ser transcrito quando a ilha está na forma episomal.

Para testar esta hipótese, ensaios de qRT-PCR foram realizados utilizando-se o RNA extraído das linhagens RB205 e RB206 durante o crescimento. Estas linhagens superexpressam, respectivamente, a fosfodiesterase PvrR e a diguanilato ciclase PA14_72420.

Figura 16 – Expressão relativa de *int* na linhagem selvagem (PA14); superexpressando a fosfodiesterase (PvrR) e a diguanilato ciclase (PA14_72420). RNA foi extraído das culturas durante diferentes fases do crescimento. qRT-PCR foi feito tendo como base o nível de expressão de PA14 em $DO_{600}=1$. O nível de expressão do gene *nadB* foi utilizado como normalizador.

Figura 17 - Expressão relativa de *soj* na linhagem selvagem (PA14); superexpressando a fosfodiesterase (PvrR) e a diguanilato ciclase (PA14_72420). RNA foi extraído da cultura durante diferentes fases do crescimento da cultura. pRT-PCR foi feito tendo como base o nível de expressão de PA14 $DO_{600}=1$. O nível de expressão do gene *nadB* foram utilizados como normalizador.

Ao analisarmos os gráficos, podemos perceber que não houve aumento significativo da expressão tanto de *int* quanto de *soj*. Isso nos leva a concluir que apesar de altos níveis de c-di-GMP aumentarem a agregação celular, o segundo mensageiro não está envolvido com o aumento da frequência de excisão de PAPI-1 do cromossomo.

4.6 Ensaio de transferência de PAPI-1 em linhagens superexpressando uma diguanilato ciclase ou fosfodiesterase

A excisão e transferência de ilhas genômicas provavelmente são processos separados, apesar de que o processo de transferência destas ilhas por meio do T4SS dependa da excisão destas ilhas do cromossomo. Apesar de que o segundo mensageiro em bactérias, c-di-GMP, não alterar a expressão de *int* e *soj*, existe a possibilidade de que ele esteja regulando o processo de transferência destas ilhas genômicas. Para testarmos esta hipótese, ensaios de transferência foram feitos com as RB407 e RB408, que são derivadas das linhagens RB403 e RB404.

Tabela 6 – Frequência de conjugação na presença de altos e também baixos níveis de c-di-GMP.

Linhagem doadora	Frequência de conjugação (transconjugantes/receptores)	
	Sem Arabinose	Com 1% de Arabinose
RB407	$1,13 \times 10^{-1} \pm 4,80 \times 10^{-2}$	$9,55 \times 10^{-3} \pm 4,76 \times 10^{-3}$
RB408	$1,04 \times 10^{-3} \pm 1,10 \times 10^{-3}$	$2,64 \times 10^{-5} \pm 1,96 \times 10^{-5}$

A Tabela 6 mostra os resultados obtidos dos ensaios de conjugação. Quando a expressão de PvrR ou de PA14_72420 foram induzidas, houve uma redução de 100 vezes na frequência de conjugação, quando comparadas às linhagens na ausência do indutor arabinose. Caso apenas os níveis de c-di-GMP fossem responsáveis pela alteração na frequência de transferência de PAPI-1 para outras linhagens, seria esperado um comportamento oposto entre as duas linhagens analisadas. A diminuição da frequência de transferência nos dois casos pode

refletir um efeito apenas da presença de arabinose no meio de cultura, que pode ter levado a um desequilíbrio na expressão global da bactéria. Outra hipótese seria que as proteínas superexpressas nessas linhagens tenham um papel ainda não elucidado na transferência de PAPI-1.

4.7 Influência de Estresse Térmico na Excisão/Manutenção de PAPI-1.

Como descrito por Qiu e colaboradores, a eficiência de transferência de PAPI-1 aumentou significativamente (aproximadamente 10 vezes) quando as células doadoras foram tratadas com estresse térmico por um período de duas horas. A eficiência maior de transferência horizontal em choque térmico baseia-se no fato que, nas células submetidas ao estresse, genes relacionados a elementos de mobilidade (como por exemplo, integrases, transposases e genes relacionados a fagos), têm seus níveis de expressão aumentados. Além do choque térmico, danos ao DNA do hospedeiro induzem resposta via RecA, e também em casos mais extremos às proteínas de reparo SOS, fazendo com que repressores sejam clivados, ativando fagos lisogênicos e facilitando a transferência horizontal (Beaber, et al. 2004; Qiu, et al. 2006; Carruthers & Minion 2009).

Para avaliar se o choque térmico altera os níveis de transcrição de *int* e *soj*, as células de PA14 foram submetidas a choque térmico a 42°C por um período de uma hora, sendo que amostras foram retiradas nos tempo 0, 5, 30 e 60 minutos após exposição ao estresse e os RNAs foram extraídos.

Figura 18 – Expressão de relativa de *int* durante choque térmico à 42°C tendo como base PA14 DO₆₀₀=1. RNA foi extraído da cultura durante diferentes fases do crescimento da cultura. qRT-PCR foi feito e o nível de expressão do gene *nadB* foi utilizado como normalizador.

Figura 19 – Expressão de *soj* durante choque térmico à 42°C. RNA foi extraído da cultura durante diferentes fases do crescimento da cultura. qRT-PCR foi feito e o nível de expressão do gene *nadB* foi utilizado como normalizador.

Apesar das evidências de que choque térmico aumenta a frequência de transferência de PAPI-1 (Qiu, et al. 2006) não houve aumento considerado significativo no nível de expressão

de *int* (Figura 18). Em relação a *soj*, houve um pequeno aumento nos níveis de mRNA após uma hora a 42°C (Figura 19), o que pode indicar que a excisão de PAPI-1 seja favorecida nessas condições.

4.8 Comparação entre PAPI-1 e a provável ilha genômica de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* 306.

O genoma de XAC contém um grande conjunto de genes conservados que está presente em PAPI-1 e em outras ilhas genômicas, podendo indicar que esta região também faz parte de uma ilha. Estas regiões comuns entre XAC e PA14 compartilham 34 ORFs sendo que 28 delas são homólogas aos genes “core” (Mohd-Zain, et al. 2004). Também compartilham 24 genes relacionados ao T4SS do elemento móvel *ICEHin1056* de *H. influenzae* e genes relacionados a replicação (*topA* e *ssb*) e pilus (*pilT2* e *pilL2*) além de algumas proteínas hipotéticas (Tabela 2 e Figura 20). As principais diferenças entre PAPI-1 e XAC estão evidenciadas na Tabela 7. Enquanto PAPI-1 apresenta sequências repetidas diretas em suas extremidades, sendo parte de um gene de tRNA, a ilha de XAC está inserida entre o gene XAC2204, que codifica uma proteína hipotética com um domínio AlpA de função desconhecida, encontrado em proteínas de fagos e o gene *guaA*, de GMP sintase. Não há sequências repetidas próximas às extremidades delimitadas pelos genes comuns a PAPI-1 na ilha de XAC.

Tabela 7 – Quadro resumo das diferenças entre PAPI-1 e a ilha de XAC.

Ilha	Organismo	Loci de inserção	Tamanho (em pb)	Conteúdo G+C	Número de ORFs	Referência
PAPI-1	<i>P. aeruginosa</i> PA14	PA14_60150 (tRNA ^{Lys})	107.899	59,7%	115	He et al, 2004
XAC	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> 306	Entre XAC2204 (hipotético) e <i>guaA</i>	86.564	69,6%	82	da Silva, Ferro et al. 2002

Há uma grande variedade de ORFs dispersas entre estas duas ilhas que ficam evidentes na comparação das Figuras 21 e 22. Os genes acessórios em PAPI-1 e XAC são muito diferentes, codificando proteínas com uma grande variedade de funções. Enquanto PAPI-1 apresenta uma série de genes envolvidos com replicação/recombinação, sistemas de fosforelé, fimbria “chaperone-ushe” e pilus tipo IV (Figura 21), XAC apresenta uma série de reguladores transcricionais, desidrogenases e transportadores putativos (Figura 22).

Figura 20 - Organização de PAPL-1 (A) e XAC (B) mostrando os genes conservados (vermelho). As setas ligam os genes homólogos entre PAPL-1 e XAC. Integrase (em verde) e *soj* (em azul) estão presentes nas extremidades.

Figura 21 - Funções preditas dos genes acessórios em PAPI-1. Genes que codificam desaminases (laranja); proteína estabilizadora de plasmídeo (branco); proteína predita efector tipo III Hop (preto); DNA helicase (azul claro); sistema de dois componentes (roxo); fimbria tipo cup (vermelho escuro) e pilus tipo IV (rosa); transposase (verde); bacteriocina e sua proteína de imunidade (azul escuro) e integrase relacionada a fago (vermelha). As ORFs destacadas em amarelo são proteínas hipotéticas e em cinza, os genes comuns a XAC.

Figura 22 - Os genes acessórios em XAC codificam um transportador MSF (roxo); uma integrase relacionada a fago (vermelha); tranposases (verde); reguladores transcricionais TetR, AraC, e NocR (verde claro); desidrogenase (azul claro); transferase (laranja); hidróxi-prolina epimerase (branco) e helicase (preto). Em amarelo são as proteínas hipotéticas e em cinza, os genes conservados em PAPI-1.

Como existe em XAC genes homólogos a *int* e *soj*, além de genes conservados homólogos ao T4SS de *H. influenzae*, seria plausível especular que esta região possa se excisar e se transferir para outras linhagens, como acontece com PAPI-1.

4.8.1 Ensaio de Excisão da ilha de XAC.

A fim de se verificar se a provável ilha de XAC, proposta por similaridade com genes encontrados em PAPI-1, é capaz de se excisar do cromossomo, oligonucleotídeos específicos para XAC foram desenhados para a realização de PCR combinatorial, como mostrado na Figura 6 (Qiu, et al. 2006). Uma cultura de células de XAC foi incubada durante a noite, até atingir a fase estacionária, e teve seu DNA extraído conforme descrito pelo protocolo de Chen e Kuo (Chen & Kuo 1993).

Assim como observado em PAPI-1, caso a ilha de XAC possuísse a capacidade de se excisar do cromossomo e se circularizar, os produtos referentes a amplificação entre os genes XAC2286 e XAC2205 (similar a *int* + *soj*) seriam detectados no gel de agarose, bem como a amplificação entre os genes XAC2203 e XAC2287 (similar a PA4541 e PA4542), correspondente ao cromossomo desprovido da provável ilha. Não foi possível detectar a provável ilha na forma episomal, sendo apenas amplificados fragmentos correspondentes a suas extremidades (Figura 23). A ausência de sequências repetidas a serem reconhecidas pela integrase ou outras recombinases pode ser a causa da não-excisão desta ilha.

Figura 23 - PCR combinatório do DNA total de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* 306 evidenciando as bandas de aproximadamente 800 pb obtidos com os pares de oligonucleotídeos específicos para as extremidades direita (XAC2203L e XAC2205R, canaleta 1) e esquerda (XAC2286L e XAC2287R, 2), para a ilha epissomal (XAC2205R e XAC2286L, 3) e para o cromossomo desprovido de ilha (XAC2203L e XAC2287R, 4). Os produtos foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

Apesar de alguns elementos que caracterizam as ilhas genômicas não estarem presentes nessa região, isso não a descaracterizaria, já que não é obrigatório que elas apresentem todos os elementos característicos de ilhas genômicas descritos na introdução (Juhas, et al. 2008). Como muitas das ilhas foram identificadas apenas quando as sequências completas de genomas de diversas linhagens foram publicadas e não de evidências experimentais, provavelmente muitos elementos estão em um estado de regressão evolucionária como foi sugerido por Dobrindt e seus colaboradores (Dobrindt, et al. 2004). Ou seja, os elementos móveis perdem sua capacidade de mobilização, se estabilizam e passam a fazer parte integrante do genoma “hospedeiro”.

Como essa ilha de XAC não está próxima a um tRNA e também não foi encontrada uma região duplicada em seus flancos, pode-se sugerir que a ilha ancestral, assim como PAPI-2 de *P. aeruginosa* (Kulasekara, et al. 2006), pode ter passado por eventos de deleção, resultando na perda da região duplicada. Esse evento deve ter tido um efeito estabilizador na ilha ancestral, tornando-a permanentemente fixada no cromossomo.

4.9 Ensaios de duplo-híbrido.

Os ensaios de duplo-híbrido foram realizados na tentativa de se demonstrar que os produtos dos genes conservados entre as ilhas genômicas poderiam interagir, formando um aparato de transferência. A homologia entre as proteínas de PAPI-1 e XAC justificaram o uso da biblioteca de duplo-híbrido construída com os genes de XAC, ainda que nesta bactéria este aparato não seja funcional ou mesmo expresso, já que as proteínas seriam produzidas num sistema heterólogo.

4.9.1 Transformação rápida de levedura com o plasmídeo pOBD contendo a isca.

A linhagem PJ694-a foi inicialmente transformada com as construções p2HES001, p2HES002, contendo os genes homólogos PA14_59860 e XAC2260 e também com a construção p2HES003 (XAC2269, homólogo de *virB4*), como descrito em MATERIAIS E MÉTODOS e então foram incubadas a 30°C de 2 a 4 dias em meio seletivo SC-Trp.

Após o período de incubação, apenas as células que continham o p2HES001, p2HES002 ou o p2HES003 foram capazes de crescer no meio seletivo, graças ao gene *TRP1* presente no vetor pOBD, que suprime a auxotrofia da linhagem PJ649-a, tornando-a assim capaz de sintetizar o aminoácido triptofano. Várias colônias foram repicadas para outra placa SC-Trp para que fossem feitos os testes de auto-ativação e só posteriormente o ensaio de duplo-híbrido.

4.9.2 Ensaio de auto-ativação das iscas.

O primeiro passo no ensaio de duplo-híbrido é verificar se os genes clonados no vetor pOBD são capazes de auto-ativar os repórteres *GAL1-HIS3* e *GAL2-ADE2* presentes em PJ649-a, a fim de evitar falsos positivos.

Teste de auto-ativação do gene repórter *GAL1-HIS3* – Para testar se as construções p2HES001, p2HES002 e p2HEES003 eram capazes de auto-ativar o gene repórter *GAL1-HIS3*, as colônias repicadas nas placas SC-Trp foram inoculados em meio sólido SC-Trp-His,

contendo concentrações crescentes de 3-AT (5mM, 10 mM, 25 mM e 50 mM) a 30°C, durante 5 dias. Não houve crescimento da levedura em nenhuma das concentrações de 3-AT, o que indica que os produtos dos genes clonados não são capazes de auto-ativar o repórter e, dessa maneira, puderam ser utilizados para ensaio de duplo-híbrido com a concentração mínima de 5 mM de 3-AT, que é um inibidor competitivo do produto do gene *HIS3* de levedura, aumentando a exigência da seleção por histidina.

Teste de auto-ativação do gene repórter *GAL2-ADE2* – Para verificar se as construções p2HES001, p2HES002 e p2HES003 eram capazes de auto-ativar o gene repórter *GAL2-ADE2*, as células foram inoculadas em meio sólido SC-Trp-Ade a 30°C por cinco dias. Para todas as construções testadas, não houve crescimento de nenhuma colônia após transcorrido o período de incubação. Sendo assim, nenhum dos dois plasmídeos foi capaz de auto-ativar o gene repórter *GAL2-ADE2* e desta maneira puderam ser utilizados para triagem contra a biblioteca.

4.9.3 Triagem das iscas utilizando o ensaio de duplo-híbrido.

Assim que foi definida a concentração de 3-AT adequada para as construções, e também determinada a incapacidade dos produtos clonados de auto-ativar o promotor *GAL2-ADE2*, foi iniciada a transformação das linhagens contendo as iscas com a biblioteca de duplo-híbrido de XAC, gentilmente cedida pelo professor Dr. S.C. Farah (Alegria, et al. 2004).

As linhagens contendo as construções p2HES001 (PA14_59860), p2HES002 (XAC2260) ou p2HES003 (XAC2269) foram transformadas contra a biblioteca seguindo os passos descritos em MATERIAIS E MÉTODOS e então foram semeadas em placas com meio seletivo SC-Trp-Leu-His+3-AT e incubadas em estufa a 30°C de 12 a 15 dias. A ausência de triptofano e leucina é necessária para que haja a manutenção dos vetores pOBD e pOAD, respectivamente, durante todo o processo. A seleção dos clones com interação

positiva entre as proteínas foi feita através da carência de histidina no meio seletivo. Apenas as células onde houvesse interação entre as proteínas fusionadas com o domínio de ligação ao DNA do pOBD e a proteína-presa fusionada com o domínio de ativação presente no vetor pOAD da biblioteca foram capazes de crescer em meio sem histidina (James, et al. 1996), devido a ativação do gene repórter *GAL1-HIS3*. Decorrido o tempo de incubação, apareceram várias colônias de tamanho maior, que se destacavam sobre um tapete de colônias pequenas, o que é um bom indício de ativação do gene repórter *GAL1-HIS3*. Cerca de 200 dessas colônias grandes obtidas a partir de cada uma das iscas foram então repicadas para outra placa contendo o meio seletivo SC-Trp-Leu-His-Ade+3-AT. Em tentativas anteriores, apenas colônias pequenas foram obtidas, que não se mostraram capazes de crescer em meio sem adição dos aminoácidos acima.

O gene repórter presente na cepa PJ694-a *ADE2*, que está sob o controle do promotor *GAL2* reconhecido pelo domínio de ligação ao DNA presente no vetor pOBD, permite um segundo nível de seleção dos clones positivos. *ADE2* codifica para a enzima fosforibosilaminoimidazol carboxilase, que participa na via de biossíntese de adenina. A ausência dessa proteína causa um acúmulo de intermediários na célula, e esta se torna avermelhada. Os falso-positivos, a princípio, não crescem ou crescem muito pouco no meio seletivo SC-Trp-Leu-His-Ade e logo adquirem uma coloração vermelha intensa. Os clones positivos adquirem uma coloração branca ou rosada. Este também é um indicativo de ativação do sistema *GAL2-ADE2*, onde quanto mais branca for a cor da colônia, mais forte é a interação entre a isca e a presa (James, et al. 1996). Dessa forma, após incubação das placas a 30 °C durante 3 a 5 dias, foi possível notar claramente essa diferença entre colônias brancas ou levemente rosadas e colônias com coloração vermelha intensa, sendo possível reconhecer os falso-positivos. Das 200 colônias repicadas para cada ensaio, apenas 14 colônias de

PA14_59860 se mostraram positivas, 136 colônias para o gene XAC 2260 e 87 para o gene XAC2269.

4.9.4 Análise dos clones positivos.

As colônias de levedura consideradas positivas para a interação proteína-proteína foram inoculadas em meio líquido SC-Trp-Leu e os plasmídeos extraídos. A mistura de plasmídeos pOBD-isca e pOAD-presa extraídos das leveduras foram utilizadas para transformar células de *E. coli* KC8 por eletroporação.

Para selecionar apenas a construção pOAD-presa, já que tanto o pOAD como o pOBD possuem marca de resistência a ampicilina e são extraídos durante o procedimento, é necessária a utilização de uma cepa de *E. coli* que possua características que permitam a seleção por auxotrofia. A cepa de *E. coli* KC8 é auxotrófica para leucina, triptofano e histidina, e pode ser complementada pelos genes de levedura *LEU2*, *TRP1* e *HIS3*. Desta maneira, é possível selecionar apenas as células que receberam apenas um dos dois tipos de plasmídeo, bastando apenas suprimir o aminoácido condizente para o vetor de interesse. Como a intenção foi selecionar apenas a construção pOAD-presa e este vetor possui o gene *LEU2*, é necessário apenas usar um meio mínimo seletivo, como o meio M9, com carência do aminoácido leucina, mas com adição de triptofano e histidina para que os únicos clones capazes de crescer neste meio fossem os que contivessem as construções desejadas.

Após a recuperação dos plasmídeos pOAD-presa, foi feita a extração de plasmídeo de *E. coli* em placas como descrito em Materiais e Métodos e algumas amostras aleatórias foram analisadas por eletroforese em gel de agarose para verificar o rendimento. Confirmando-se que existia DNA proveniente da extração de KC8 em placa, algumas amostras foram sequenciadas utilizando-se do oligonucleotídeo pOADleft, específico para o vetor pOAD (Tabela 4). Entretanto, as sequências não apresentaram boa qualidade. Para se certificar que

os fragmentos estavam presentes nos vetores pOAD, foi feito um PCR contendo os oligonucleotídeos específicos para pOAD utilizando-se como molde 1 µL de algumas amostras escolhidas aleatoriamente das extrações. Ao serem separados em gel de agarose 0,8%, bandas de 500 e 1000 pares de base foram visualizadas (Figura 24).

Figura 24 – Produtos da amplificação das presas triadas no ensaio de duplo-híbrido. As amostras de DNA extraídas de *E. coli* KC8 foram utilizadas como molde em PCR utilizando oligos específicos para o pOAD e analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8%, confirmando a existência de plasmídeos provenientes da biblioteca de duplo-híbrido. Controle positivo com pOAD-PA14_59860 (A), amostras aleatórias (B, C e D).

Isso indica que existem plasmídeos portando insertos de tamanhos condizentes com os descritos na biblioteca de duplo-híbrido. Dessa forma, é possível que a quantidade de DNA utilizado para as reações de sequenciamento tenha sido muito baixa, portanto foi necessário fazer adequações para a obtenção das sequências das presas presentes no vetor pOAD.

Várias tentativas de otimização foram feitas, variando-se desde a quantidade de DNA na amostra de sequenciamento até a quantidade de oligonucleotídeos na reação. As condições ótimas foram atingidas quando a quantidade de oligos foi aumentada na reação (concentração final de 9,6 pmol para 12 pmol), bem como a quantidade de DNA extraído de KC8 no volume final da reação de sequenciamento.

As sequências dos clones positivos foram analisadas utilizando-se do algoritmo BLASTX. Foram considerados válidos apenas os resultados das sequências que se encontravam em fase de leitura com o domínio de ativação ao DNA do plasmídeo pOAD.

Todas as sequências fora de fase de leitura ou na fita anti-senso foram consideradas falsos positivos.

Dos 14 genes sequenciados a partir dos ensaios com PA14_59860, todos resultaram em falsos positivos, ou por estarem fora de fase de leitura ou o gene apresentado era um falso positivo comum aos ensaios de duplo-híbrido, o gene *tolC*. TolC é uma proteína transportadora que se localiza na membrana externa, e tem a capacidade de interagir diretamente com o domínio de ligação ao DNA do vetor pOBD, ativando a transcrição dos genes repórter. Sendo assim, não pode ser levado em consideração no ensaio de duplo-híbrido (Alegria, et al. 2004).

Com o gene XAC2260, dos 57 clones sequenciados, 55 foram falsos positivos. Os dois restantes apresentaram os genes *motD* (XAC1908), uma proteína motora que está envolvida com a motilidade flagelar; e XAC3426 que apresenta domínio de monoamina oxidase e possivelmente liga-se a NAD^+ . Entretanto, como esses resultados apareceram apenas uma vez, puseram em dúvida sua significância, já que normalmente resultados positivos em ensaios de duplo-híbrido costumam aparecer diversas vezes. Além disso, as funções preditas das proteínas selecionadas não se mostraram relacionadas às esperadas.

Tanto para XAC2269, bem como para PA14_59860, dos 77 clones sequenciados, todos foram falsos positivos, ou seja, ou estavam fora de fase de leitura ou correspondiam ao gene *tolC*.

O grande número de falsos positivos pode ser explicado pelo dobramento incorreto das proteínas, já que os genes escolhidos como isca foram clonados sem retirada de sequências correspondentes na proteína a regiões transmembrana (no caso de XAC2260) ou sequência sinal (no caso de PA14_59860). Outra possibilidade é a de que a região onde a interação entre isca e presa estaria ocorrendo ficaria voltada em direção contrária ao promotor do gene e

dessa forma o domínio de ativação não seria capaz de interagir com a RNA polimerase, como mostrado na figura 25.

Figura 25 – Interação entre isca e presa onde o domínio de ativação (AD) está voltado em direção ao gene repórter, permitindo sua interação com a região α -carboxi terminal da RNA Polimerase e portanto sua transcrição (A). Interação entre isca e presa onde o domínio de ativação se encontra em direção contrária ao gene repórter e, não sendo possível a interação entre o domínio de ativação e a RNA Polimerase (B). UAS, região de ativação a montante (do inglês *upstream activation site*); BD, domínio de ligação (do inglês *binding domain*).

Existe também a possibilidade de termos falsos negativos, comum em ensaios de duplo híbrido, pela impossibilidade de verificar interações com a região N-terminal das proteínas, já que estas se encontram fusionadas com o domínio de ativação ou o domínio de ligação ao DNA dos vetores. Portanto, a abordagem de duplo-híbrido não foi adequada às proteínas em estudo nas condições realizadas.

5. Conclusões

- A inserção de transposons nos genes PA14_59940, PA14_59920, PA14_59880 ou PA14_59860 fizeram com que PAPI-1 perdesse a capacidade de se transferir para outras linhagens, indicando um papel importante desse grupo de genes no processo.
- Os reguladores de percepção de quorum RhlR e MvfR, mas não LasR, tiveram influência na expressão de *int*, mas não de *soj*, podendo estar envolvidos na regulação da excisão de PAPI-1 do cromossomo.
- A proteína H-NS MvaT não teve efeito sobre a expressão de *int* e *soj*.
- O choque térmico não teve influência sobre a expressão de *int*, mas aumentou levemente os níveis de mRNA de *soj*, confirmando dados da literatura que relataram que a frequência de transferência de PAPI-1 aumentava quando a cultura era submetida a choque térmico.
- O segundo mensageiro c-di-GMP não teve influência na expressão de *int* e *soj* e na frequência de transferência de PAPI-1.
- A superexpressão de PA14_72420 e PvrR diminuíram a transferência de PAPI-1, porém não está descartada a hipótese de que este efeito se deve à adição do indutor arabinose nesses ensaios ou de outras funções dessas proteínas.
- A comparação de PAPI-1 com a provável ilha de XAC mostrou sua organização muito parecida para os genes conservados, mas diferenças marcantes em seus genes acessórios.
- A provável ilha de XAC não é capaz de se excisar do cromossomo nas condições analisadas.
- Não foi possível encontrar parceiros de interação para as proteínas codificadas pelos genes PA14_59860, XAC2260 e XAC2269 utilizando um sistema de duplo-híbrido em levedura.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alegria, M. C., C. Docena, L. Khater, C. H. Ramos, A. C. da Silva, & C. S. Farah. 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.
2. Alegria, M. C., C. Docena, L. Khater, C. H. Ramos, A. C. da Silva, & C. S. Farah. 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 186:6186-6197.
3. Alvarez-Martinez, C. E., & P. J. Christie. 2009. **Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems.** Microbiol Mol Biol Rev 73:775-808.
4. Atmakuri, K., E. Cascales, O. T. Burton, L. M. Banta, & P. J. Christie. 2007. **Agrobacterium ParA/MinD-like VirC1 spatially coordinates early conjugative DNA transfer reactions.** EMBO J 26:2540-2551.
5. Auchtung, J. M., C. A. Lee, K. L. Garrison, & A. D. Grossman. 2007. **Identification and characterization of the immunity repressor (ImmR) that controls the mobile genetic element ICEBs1 of *Bacillus subtilis*.** Mol Microbiol 64:1515-1528.
6. Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, & K. Struhl (ed.). 1996. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, New York.
7. Backert, S., & T. F. Meyer. 2006. **Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis.** Curr Opin Microbiol 9:207-217.
8. Baños, R. C., A. Vivero, S. Aznar, J. Garcia, M. Pons, C. Madrid, & A. Juarez. 2009. **Differential regulation of horizontally acquired and core genome genes by the bacterial modulator H-NS.** PLoS Genet 5:e1000513.
9. Battle, S. E., F. Meyer, J. Rello, V. L. Kung, & A. R. Hauser. 2008. **Hybrid pathogenicity island PAGI-5 contributes to the highly virulent phenotype of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate in mammals.** J Bacteriol 190:7130-7140.
10. Battle, S. E., J. Rello, & A. R. Hauser. 2009. **Genomic islands of *Pseudomonas aeruginosa*.** FEMS Microbiol Lett 290:70-78.
11. Beaber, J. W., B. Hochhut, & M. K. Waldor. 2004. **SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes.** Nature 427:72-4.
12. Boto, L. 2009. **Horizontal gene transfer in evolution: facts and challenges.** Proc Biol Sci.

13. Cao, H., G. Krishnan, B. Goumnerov, J. Tsongalis, R. Tompkins, & L. G. Rahme. 2001. **A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism.** Proc Natl Acad Sci U S A 98:14613-14618.
14. Carruthers, M. D., & C. Minion. 2009. **Transcriptome analysis of *Escherichia coli* O157:H7 EDL933 during heat shock.** FEMS Microbiol Lett 295:96-102.
15. Cascales, E., & P. J. Christie. 2004. **Definition of a bacterial type IV secretion pathway for a DNA substrate.** Science 304:1170-1173.
16. Cascales, E., & P. J. Christie. 2003. **The versatile bacterial type IV secretion systems.** Nat Rev Microbiol 1:137-149.
17. Castang, S., H. R. McManus, K. H. Turner, & S. L. Dove. 2008. **H-NS family members function coordinately in an opportunistic pathogen.** Proc Natl Acad Sci U S A 105:18947-18952.
18. Chen, W. P., & T. T. Kuo. 1993. **A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA.** Nucleic Acids Res 21:2260.
19. Christie, P. J. 2004. **Type IV secretion: the *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems.** Biochim Biophys Acta 1694:219-234.
20. Christie, P. J., K. Atmakuri, V. Krishnamoorthy, S. Jakubowski, & E. Cascales. 2005. **Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems.** Annu Rev Microbiol 59:451-485.
21. da Silva, A. C., J. A. Ferro, F. C. Reinach, C. S. Farah, L. R. Furlan, R. B. Quaggio, C. B. Monteiro-Vitorello, M. A. Van Sluys, N. F. Almeida, L. M. Alves, A. M. do Amaral, M. C. Bertolini, L. E. Camargo, G. Camarotte, F. Cannavan, J. Cardozo, F. Chambergo, L. P. Ciapina, R. M. Cicarelli, L. L. Coutinho, J. R. Cursino-Santos, H. El-Dorry, J. B. Faria, A. J. Ferreira, R. C. Ferreira, M. I. Ferro, E. F. Formighieri, M. C. Franco, C. C. Greggio, A. Gruber, A. M. Katsuyama, L. T. Kishi, R. P. Leite, E. G. Lemos, M. V. Lemos, E. C. Locali, M. A. Machado, A. M. Madeira, N. M. Martinez-Rossi, E. C. Martins, J. Meidanis, C. F. Menck, C. Y. Miyaki, D. H. Moon, L. M. Moreira, M. T. Novo, V. K. Okura, M. C. Oliveira, V. R. Oliveira, H. A. Pereira, A. Rossi, J. A. Sena, C. Silva, R. F. de Souza, L. A. Spinola, M. A. Takita, R. E. Tamura, E. C. Teixeira, R. I. Tezza, M. Trindade dos Santos, D. Truffi, S. M. Tsai, F. F. White, J. C. Setubal, & J. P. Kitajima. 2002. **Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities.** Nature 417:459-463.
22. Dagan, T., Y. Artzy-Randrup, & W. Martin. 2008. **Modular networks and cumulative impact of lateral transfer in prokaryote genome evolution.** Proc Natl Acad Sci U S A 105:10039-10044.
23. Déziel, E., S. Gopalan, A. P. Tampakaki, F. Lepine, K. E. Padfield, M. Saucier, G. Xiao, & L. G. Rahme. 2005. **The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting *lasRI*, *rhlRI* or the production of N-acyl-L-homoserine lactones.** Mol Microbiol 55:998-1014.

24. Déziel, E., F. Lepine, S. Milot, J. He, M. N. Mindrinos, R. G. Tompkins, & L. G. Rahme. 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.
25. Diggle, S. P., K. Winzer, A. Lazdunski, P. Williams, & M. Camara. 2002. **Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of N-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression.** J Bacteriol 184:2576-2586.
26. Dobrindt, U., B. Hochhut, U. Hentschel, & J. Hacker. 2004. **Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms.** Nat Rev Microbiol 2:414-424.
27. Dorman, C. J. 2004. **H-NS: a universal regulator for a dynamic genome.** Nat Rev Microbiol 2:391-400.
28. Gietz, R. D., & R. A. Woods. 2002. **Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method.** Methods Enzymol 350:87-96.
29. Gomis-Ruth, F. X., G. Moncalian, R. Perez-Luque, A. Gonzalez, E. Cabezón, F. de la Cruz, & M. Coll. 2001. **The bacterial conjugation protein TrwB resembles ring helicases and F1-ATPase.** Nature 409:637-641.
30. Guttman, D. S. 2009. **Bacterial evolution: dynamic genomes and the power of transformation.** Curr Biol 19:R857-859.
31. Hacker, J., & E. Carniel. 2001. **Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes.** EMBO Rep 2:376-381.
32. Harrison, E. M., M. E. Carter, S. Luck, H. Y. Ou, X. He, Z. Deng, C. O'Callaghan, A. Kadioglu, & K. Rajakumar. 2010. **Pathogenicity islands PAPI-1 and PAPI-2 contribute individually and synergistically to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14.** Infect Immun 78:1437-1446.
33. He, J., R. L. Baldini, E. Deziel, M. Saucier, Q. Zhang, N. T. Liberati, D. Lee, J. Urbach, H. M. Goodman, & L. G. Rahme. 2004. **The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes.** Proc Natl Acad Sci U S A 101:2530-2535.
34. Hoang, T. T., R. R. Karkhoff-Schweizer, A. J. Kutchma, & H. P. Schweizer. 1998. **A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants.** Gene 212:77-86.
35. Hoang, T. T., A. J. Kutchma, A. Becher, & H. P. Schweizer. 2000. **Integration-proficient plasmids for *Pseudomonas aeruginosa*: site-specific integration and use for engineering of reporter and expression strains.** Plasmid 43:59-72.

36. James, P., J. Halladay, & E. A. Craig. 1996. **Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast.** *Genetics* 144:1425-1436.
37. Juhas, M., D. W. Crook, I. D. Dimopoulou, G. Lunter, R. M. Harding, D. J. Ferguson, & D. W. Hood. 2007. **Novel type IV secretion system involved in propagation of genomic islands.** *J Bacteriol* 189:761-771.
38. Juhas, M., L. Eberl, & B. Tummmler. 2005. **Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*.** *Environ Microbiol* 7:459-471.
39. Juhas, M., J. R. van der Meer, M. Gaillard, R. M. Harding, D. W. Hood, & D. W. Crook. 2008. **Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution.** *FEMS Microbiol Rev* 33:376-393.
40. Kiewitz, C., K. Larbig, J. Klockgether, C. Weinl, & B. Tummmler. 2000. **Monitoring genome evolution *ex vivo*: reversible chromosomal integration of a 106 kb plasmid at two tRNA(Lys) gene loci in sequential *Pseudomonas aeruginosa* airway isolates.** *Microbiology* 146:2365-2373.
41. Klockgether, J., O. Reva, K. Larbig, & B. Tummmler. 2004. **Sequence analysis of the mobile genome island pKLC102 of *Pseudomonas aeruginosa* C.** *J Bacteriol* 186:518-534.
42. Klockgether, J., D. Wurdemann, O. Reva, L. Wiehlmann, & B. Tummmler. 2007. **Diversity of the Abundant pKLC102/PAGI-2 Family of Genomic Islands in *Pseudomonas aeruginosa*.** *J Bacteriol* 189:2443-2459.
43. Koonin, E. V., K. S. Makarova, & L. Aravind. 2001. **Horizontal gene transfer in prokaryotes: quantification and classification.** *Annu Rev Microbiol* 55:709-742.
44. Kulasekara, B. R., H. D. Kulasekara, M. C. Wolfgang, L. Stevens, D. W. Frank, & S. Lory. 2006. **Acquisition and evolution of the *exoU* locus in *Pseudomonas aeruginosa*.** *J Bacteriol* 188:4037-4050.
45. Larbig, K. D., A. Christmann, A. Johann, J. Klockgether, T. Hartsch, R. Merkl, L. Wiehlmann, H. J. Fritz, & B. Tummmler. 2002. **Gene islands integrated into tRNA(Gly) genes confer genome diversity on a *Pseudomonas aeruginosa* clone.** *J Bacteriol* 184:6665-6680.
46. Lawley, T. D., W. A. Klimke, M. J. Gubbins, & L. S. Frost. 2003. **F factor conjugation is a true type IV secretion system.** *FEMS Microbiol Lett* 224:1-15.
47. Lee, D. G., J. M. Urbach, G. Wu, N. T. Liberati, R. L. Feinbaum, S. Miyata, L. T. Diggins, J. He, M. Saucier, E. Deziel, L. Friedman, L. Li, G. Grills, K. Montgomery, R. Kucherlapati, L. G. Rahme, & F. M. Ausubel. 2006. **Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial.** *Genome Biol* 7:R90.
48. Lesic, B., F. Lepine, E. Deziel, J. Zhang, Q. Zhang, K. Padfield, M. H. Castonguay, S. Milot, S. Stachel, A. A. Tzika, R. G. Tompkins, & L. G. Rahme. 2007. **Inhibitors of**

- pathogen intercellular signals as selective anti-infective compounds. PLoS Pathog 3:1229-1239.
49. Li, C., H. Wally, S. J. Miller, & C. D. Lu. 2009. **The multifaceted proteins MvaT and MvaU, members of the H-NS family, control arginine metabolism, pyocyanin synthesis, and prophage activation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.** J Bacteriol 191:6211-6218.
  50. Liang, X., X. Q. Pham, M. V. Olson, & S. Lory. 2001. **Identification of a genomic island present in the majority of pathogenic isolates of *Pseudomonas aeruginosa*.** J Bacteriol 183:843-853.
  51. Liberati, N. T., J. M. Urbach, S. Miyata, D. G. Lee, E. Drenkard, G. Wu, J. Villanueva, T. Wei, & F. M. Ausubel. 2006. **An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants.** Proc Natl Acad Sci U S A.
  52. Lima, W. C., M. A. Van Sluys, & C. F. Menck. 2005. **Non-gamma-proteobacteria gene islands contribute to the *Xanthomonas* genome.** OMICS 9:160-172.
  53. Livak, K. J., & T. D. Schmittgen. 2001. **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $-2^{\Delta\Delta Ct}$ Method.** Methods 25:402-408.
  54. Lyczak, J. B., C. L. Cannon, & G. B. Pier. 2000. **Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist.** Microbes Infect 2:1051-1060.
  55. Mahajan-Miklos, S., M. W. Tan, L. G. Rahme, & F. M. Ausubel. 1999. **Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model.** Cell 96:47-56.
  56. Mathee, K., G. Narasimhan, C. Valdes, X. Qiu, J. M. Matewish, M. Koehrsen, A. Rokas, C. N. Yandava, R. Engels, E. Zeng, R. Olavarrieta, M. Doud, R. S. Smith, P. Montgomery, J. R. White, P. A. Godfrey, C. Kodira, B. Birren, J. E. Galagan, & S. Lory. 2008. **Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution.** Proc Natl Acad Sci U S A 105:3100-3105.
  57. McNulty, C., J. Thompson, B. Barrett, L. Lord, C. Andersen, & I. S. Roberts. 2006. **The cell surface expression of group 2 capsular polysaccharides in *Escherichia coli*: the role of KpsD, RhsA and a multi-protein complex at the pole of the cell.** Mol Microbiol 59:907-922.
  58. Minoia, M., M. Gaillard, F. Reinhard, M. Stojanov, V. Sentchilo, & J. R. van der Meer. 2008. **Stochasticity and bistability in horizontal transfer control of a genomic island in *Pseudomonas*.** Proceedings of the National Academy of Sciences 105:20792-20797.
  59. Mohd-Zain, Z., S. L. Turner, A. M. Cerdeno-Tarraga, A. K. Lilley, T. J. Inzana, A. J. Duncan, R. M. Harding, D. W. Hood, T. E. Peto, & D. W. Crook. 2004. **Transferable antibiotic resistance elements in *Haemophilus influenzae* share a common**

- evolutionary origin with a diverse family of syntenic genomic islands.** J Bacteriol 186:8114-8122.
60. Monteiro-Vitorello, C. B., M. C. de Oliveira, M. M. Zerillo, A. M. Varani, E. Civerolo, & M. A. Van Sluys. 2005. ***Xylella* and *Xanthomonas* Mobil'omics.** OMICS 9:146-159.
  61. Murphy, R. A., & E. F. Boyd. 2008. **Three pathogenicity islands of *Vibrio cholerae* can excise from the chromosome and form circular intermediates.** J Bacteriol 190:636-647.
  62. Navarre, W. W., M. McClelland, S. J. Libby, & F. C. Fang. 2007. **Silencing of xenogeneic DNA by H-NS-facilitation of lateral gene transfer in bacteria by a defense system that recognizes foreign DNA.** Genes Dev 21:1456-1471.
  63. Nicastro, G. G., A. L. Boechat, C. Abe, G. H. Kaihama, & R. L. Baldini. 2009. ***Pseudomonas aeruginosa* PA14 *cupD* transcription is activated by the RcsB response regulator but repressed by its putative cognate sensor RcsC.** FEMS Microbiol Lett submetido.
  64. Nishimura, A., M. Morita, Y. Nishimura, & Y. Sugino. 1990. **A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells.** Nucleic Acids Res 18:6169.
  65. Pessi, G., F. Williams, Z. Hindle, K. Heurlier, M. T. Holden, M. Camara, D. Haas, & P. Williams. 2001. **The global posttranscriptional regulator RsmA modulates production of virulence determinants and N-acylhomoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*.** J Bacteriol 183:6676-6683.
  66. Qiu, X., A. U. Gurkar, & S. Lory. 2006. **Interstrain transfer of the large pathogenicity island (PAPI-1) of *Pseudomonas aeruginosa*.** Proc Natl Acad Sci U S A 103:19830-19835.
  67. Romling, U., & D. Amikam. 2006. **Cyclic di-GMP as a second messenger.** Curr Opin Microbiol 9:218-228.
  68. Rosenthal, R. S., & V. W. Rodwell. 1998. **Purification and characterization of the heteromeric transcriptional activator MvaT of the *Pseudomonas mevalonii* *mvaAB* operon.** Protein Sci 7:178-184.
  69. Sambrook, J., E. F. Fritsch, & T. Maniatis. 1989. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
  70. Schell, M. A. 1993. **Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators.** Annu Rev Microbiol 47:597-626.
  71. Schmidt, H., & M. Hensel. 2004. **Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis.** Clin Microbiol Rev 17:14-56.
  72. Sentchilo, V., K. Czechowska, N. Pradervand, M. Minoia, R. Miyazaki, & J. R. van der Meer. 2009. **Intracellular excision and reintegration dynamics of the ICEclc**

- genomic island of *Pseudomonas knackmussii* sp. strain B13. Mol Microbiol 72:1293-1306.
73. Simm, R., M. Morr, A. Kader, M. Nimtz, & U. Romling. 2004. **GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility.** Mol Microbiol 53:1123-1134.
  74. Simon, R., U. Priefer, & A. Puhler. 1983. **A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria.** Biotechnology (N Y) 1:784-790.
  75. Smith, R. S., & B. H. Iglewski. 2003. ***P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence.** Curr Opin Microbiol 6:56-60.
  76. Starkey, M., J. H. Hickman, L. Ma, N. Zhang, S. De Long, A. Hinz, S. Palacios, C. Manoil, M. J. Kirisits, T. D. Starner, D. J. Wozniak, C. S. Harwood, & M. R. Parsek. 2009. ***Pseudomonas aeruginosa* rugose small-colony variants have adaptations that likely promote persistence in the cystic fibrosis lung.** J Bacteriol 191:3492-3503.
  77. Stover, C. K., X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warrener, M. J. Hickey, F. S. Brinkman, W. O. Hufnagle, D. J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G. K. Wong, Z. Wu, I. T. Paulsen, J. Reizer, M. H. Saier, R. E. Hancock, S. Lory, & M. V. Olson. 2000. **Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen.** Nature 406:959-964.
  78. Tatum, E. L., & J. Lederberg. 1947. **Gene Recombination in the Bacterium *Escherichia coli*.** J Bacteriol 53:673-684.
  79. Tendeng, C., O. A. Soutourina, A. Danchin, & P. N. Bertin. 2003. **MvaT proteins in *Pseudomonas* spp.: a novel class of H-NS-like proteins.** Microbiology 149:3047-3050.
  80. Tseng, T. T., B. M. Tyler, & J. C. Setubal. 2009. **Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology.** BMC Microbiol 9 Suppl 1:S2.
  81. Uetz, P., L. Giot, G. Cagney, T. A. Mansfield, R. S. Judson, J. R. Knight, D. Lockshon, V. Narayan, M. Srinivasan, P. Pochart, A. Qureshi-Emili, Y. Li, B. Godwin, D. Conover, T. Kalbfleisch, G. Vijayadamodar, M. Yang, M. Johnston, S. Fields, & J. M. Rothberg. 2000. **A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*.** Nature 403:623-627.
  82. Vallet, I., S. P. Diggle, R. E. Stacey, M. Camara, I. Ventre, S. Lory, A. Lazdunski, P. Williams, & A. Filloux. 2004. **Biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*: fimbrial *cup* gene clusters are controlled by the transcriptional regulator MvaT.** J Bacteriol 186:2880-2890.

83. Venturi, V. 2006. **Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas***. FEMS Microbiol Rev 30:274-291.
84. Wade, D. S., M. W. Calfee, E. R. Rocha, E. A. Ling, E. Engstrom, J. P. Coleman, & E. C. Pesci. 2005. **Regulation of *Pseudomonas* quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa***. J Bacteriol 187:4372-4380.
85. Wagner, V. E., D. Bushnell, L. Passador, A. I. Brooks, & B. H. Iglewski. 2003. **Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment**. J Bacteriol 185:2080-2095.
86. Williams, P., & M. Camara. 2009. **Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules**. Curr Opin Microbiol 12:182-191.
87. Wolfe, A. J., & K. L. Visick. 2008. **Get the message out: cyclic-Di-GMP regulates multiple levels of flagellum-based motility**. J Bacteriol 190:463-475.
88. Wolfgang, M. C., B. R. Kulasekara, X. Liang, D. Boyd, K. Wu, Q. Yang, C. G. Miyada, & S. Lory. 2003. **Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa***. Proc Natl Acad Sci U S A 100:8484-8489.
89. Xiao, G., E. Deziel, J. He, F. Lepine, B. Lesic, M. H. Castonguay, S. Milot, A. P. Tampakaki, S. E. Stachel, & L. G. Rahme. 2006. **MvfR, a key *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity LTTR-class regulatory protein, has dual ligands**. Mol Microbiol 62:1689-1699.