ESTELA YNÉS VALENCIA MORANTE

**ESTUDO DO SISTEMA BlaR/BlaI E DE
DOIS OPERONS CODIFICANDO SISTEMAS
DE EFLUXO RND EM *Caulobacter crescentus***

Tese apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em
Inteunidades em
Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/IPT, para obtenção
do Título de Doutor em
Biotecnologia.

São Paulo
2012

ESTELA YNÉS VALENCIA MORANTE

**ESTUDO DO SISTEMA BlaR/BlaI E DE
DOIS OPERONS CODIFICANDO SISTEMAS
DE EFLUXO RND EM *Caulobacter crescentus***

Tese apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
Inteunidades em
Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/IPT, para obtenção
do Título de Doutor em
Biotecnologia

Área de concentração:
Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra.
Marilis do Valle Marques

Versão corrigida

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Valencia Morante, Estela Ynés.

Estudo do sistema BlaR/Blal e de dois operons codificando sistemas de efluxo RND em *Caulobacter crescentus* / Estela Ynés Valencia Morante. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Marilis do Valle Marques.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Regulação gênica e genética bacteriana

Versão do título para o inglês: Study of the BlaR/Blal system and two operons encoding RND efflux systems in *Caulobacter crescentus*.

Descritores: 1. *Caulobacter* 2. Cádmio 3. Stress 4. Regulação gênica 5. Genômica funcional 6. I. Marques, Marilis do Valle II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB05/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Estela Ynés Valencia Morante.

Título da Tese: Estudo do sistema BlaR/Blal e de dois operons codificando sistemas de efluxo RND em *Caulobacter crescentus*.

Orientador(a): Marilis do Valle Marques.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS</p> <p>Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091-7438 e-mail: cep@icb.usp.br</p> <p>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAL</p>
---	--

Decl. CEUA.072/10

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 081/06/CEUA, datado de 22.06.2006 e por solicitação da Profa. Dra. Marilis do Valle Marques, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna **Estela Ynés Valencia Morante** ao projeto de pesquisa "*Estudo da regulação de genes envolvidos na resposta a estresses ambientais em caulobacter crescentus*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao referido certificado.

São Paulo, 19 de outubro de 2010.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador -CEUA- ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Decl. CEEA.034/2008

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 81/06/CEEA, datado de 23.06.06 e por solicitação da Profa. Dra. Marilis do Valle Marques, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna **Estela Ynés Valencia Morante** ao Projeto de Pesquisa "*Estudo da regulação de genes envolvidos na resposta a estresses ambientais em caulobacter crescentus*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao referido certificado.

São Paulo, 18 de julho de 2008.

Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborada
Vice-Coordenador da CEEA
ICB/USP

In memoriam

Meu filho Andrés

e

Papai Mario

Que desde onde eles estão, me
acompanham em todo momento.

A minha mãe Isidora, meus filhos Sergio
e Ricardo, meu esposo Felipe, meus irmãos:
Arecio, Mario, Julia, Baltazar e Celia que
me deram força para seguir sempre adiante.

AGRADECIMENTOS

A Professora Doutora Marilis do Valle Marques, pela orientação sólida e objetiva, e pela oportunidade a mim dada durante o período em que estive em seu laboratório.

Aos docentes do departamento de Microbiologia e aos professores do Programa Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, pela transmissão de conhecimentos e ensinamentos durante o curso de pós-graduação.

Aos colegas de laboratório Dra.Valéria Karla, Dra.Valéria Italiani, Dra.Vânia, Dr. Ricardo, Mirian, Maristela, Dr. José, MSc. Juliana, MSc. Heloise, Daniela, Daniele, Dra. Carolina e Carlos Eduardo pelo companheirismo com que compartilhamos o dia a dia.

À Íris, Marlene e Emilio pela eficiência, companheirismo e apoio técnico.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Interunidades em Biotecnologia, pelo apoio.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnologia (CNPq) pelo apoio financeiro concedido durante a realização deste trabalho.

RESUMO

Valencia, EY. Estudo do sistema BlaR/BlaI e de dois operons codificando sistemas de efluxo RND em *Caulobacter crescentus*. [Tese (Doutorado em Biotecnologia)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2012.

O presente trabalho tem como objetivo caracterizar três agrupamentos de genes da alfa proteobactéria *Caulobacter crescentus* envolvidos na resposta a metais e antibióticos. Analisamos o agrupamento composto pelos genes CC1637-CC1640, que contém um sistema BlaR/BlaI de transdução de sinal, e realizamos uma análise comparativa de dois sistemas de efluxo da família RND (resistência, nodulação e divisão celular) composto pelos genes CC2720-CC2725 e CC2388-CC2390 que estariam envolvidos na resposta a metais cádmio e zinco. Mutantes simples e duplos com deleção em fase foram obtidos, e o estudo da atividade promotora foi realizado através de ensaio de β -galactosidase utilizando gene repórter *lacZ*.

Ensaio de RT-PCR e atividade β -galactosidase mostraram que o gene CC1638 provavelmente não possui promotor próprio e que os genes CC1637- CC1640 podem constituir um operon. A atividade promotora do gene CC1640 não responde a H_2O_2 , Cd^{2+} e Zn^{2+} , mas a linhagem Δ CC1640 apresentou baixa viabilidade na presença de Cd^{2+} . As linhagens Δ CC1637 e Δ CC1638 mostraram sensibilidade a t-butil-hidroperóxido. A linhagem Δ CC1640 mostrou-se sensível aos antibióticos cefotaxima e piperacilina + Tazobactam, e ensaios de β -galactosidase em placa e em meio líquido mostraram indução da expressão pelos antibióticos cefotaxima e cefalexina. Observamos uma auto-regulação do operon pela proteína codificada pelo gene CC1640 (BlaI), confirmado por ensaios de EMSA. A presença de BlaR inibe a ligação da proteína BlaI ao promotor, sugerindo que ambas BlaI/BlaR regulem em conjunto o promotor do gene CC1640. Análise *in silico* do consenso TTACGNNCGTAA localizado no promotor de CC1640 identificou esta sequência na região promotora de outros genes. A análise da expressão relativa sugere que os genes CC1568, CC1230 e CC2661 são regulados pela proteína BlaI, sugerindo que BlaI regula a expressão de outros genes possivelmente envolvidos na resposta a antibióticos β -lactâmicos.

Ensaio de atividade β -galactosidase da região intergênica CC2720-CC2721 mostraram que esta não possui atividade promotora, e análise por RT-PCR confirmou que os genes CC2720-CC2721 são co-transcritos e que fazem parte do operon CC2720-CC2725. A expressão do operon mostrou indução significativa na presença de Cd^{2+} 10 μ M (2,6 vezes em 24 h); Zn^{2+} 100 μ M (1,7 vezes em 24 h); Co^{2+} 175 μ M (2,3 vezes em 24 h); Ni^{2+} 100 μ M (1,5 vezes em 24 h, mas não foi induzido em 48 horas). A expressão do operon CC2388-CC2390 é

altamente induzida na presença de cobalto 100 μM (2,7 vezes induzido em 24 h) e Níquel 100 μM (3,3 vezes em 24 h); pouco induzido por Zinco 100 μM (1,5 vezes em 24 h), pero não é induzida por cádmio (10 e 25 μM). A linhagem ΔCC2724 não é sensível a zinco, cobalto ou níquel. A linhagem ΔCC2390 é sensível a cobalto, pouco sensível a níquel e não sensível a zinco, e ambas as linhagens foram sensíveis a cádmio. A obtenção do duplo mutante, assim como sua complementação, foram realizadas, e os resultados sugerem que se trata de dois sistemas de efluxo com diferentes respostas a metal.

Palavras-chave: *Caulobacter crescentus*. Metais. Antibióticos. Cádmio. Estresse. Regulação gênica. Genômica funcional.

ABSTRACT

Valencia, EY. Study of the BlaR/BlaI system and two operons encoding RND efflux systems from *Caulobacter crescentus*. [Ph.D. thesis (Biotechnology)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2012.

The aim of this work is to characterize three clusters of genes from the alpha proteobacterium *Caulobacter crescentus* involved in metal and antibiotics response. We analyzed the cluster comprising genes CC1637-CC1640, which contains a BlaR/BlaI signal transduction system, and we performed a comparative analysis with two RND (Resistance-Nodulation and Cell Division) efflux systems consisting on genes CC2720-CC2725 and CC2388-CC2390, which are probably involved in cadmium and zinc response. Mutant strains for one or two of these genes were obtained, and the study of promoter activity was performed by β -galactosidase activity assays using *lacZ* as reporter gene.

RT-PCR and β -galactosidase activity assays revealed that the CC1638 gene probably does not possess an exclusive promoter, and that the genes CC1637-CC1640 may constitute an operon. The promoter of CC1640 does not respond to H_2O_2 , Cd^{2+} and Zn^{2+} , but the Δ CC1640 strain presented low viability in the presence of Cd^{2+} . The Δ CC1637 and Δ CC1638 strains showed sensitivity to t-butyl-hydroperoxide. The Δ CC1640 strain showed sensitivity to the antibiotics cefotaxime and piperacillim + Tazobactam, and β -galactosidase activity assays performed both on plates and liquid medium showed induction of the expression by the presence of antibiotics cefotaxime and cephalixin. We observed auto-regulation of the operon by the protein encoded by the CC1640 gene (BlaI), which was confirmed by EMSA assays. The presence of BlaR inhibits the binding of the BlaI protein to the promoter, suggesting that both BlaI/BlaR regulate the CC1640 gene promoter. *In silico* analyses for the TTACGNNCGTAA consensus, located on CC1640 promoter, identified this sequence in promoter regions of other genes. Relative expression analyses indicate that the genes CC1568, CC1230 and CC2661 are regulated by the BlaI protein, suggesting that BlaI regulates the expression of other genes, possibly involved in β -lactamic antibiotics response.

β -galactosidase activity assays of the intergenic region CC2720-CC2721 showed that it does not possess promoter activity, and a RT-PCR analysis confirmed that the genes CC2720-CC2721 are co-transcribed and belong to the CC2720-CC2725 operon. The expression of the operon showed significant induction in the presence of $10\ \mu M\ Cd^{2+}$ (2.6 fold in 24 h); $100\ \mu M\ Zn^{2+}$ (1.7-fold in 24 h); $175\ \mu M\ Co^{2+}$ (2.3-fold in 24 h); $100\ \mu M\ Ni^{2+}$ (1.5-fold in 24 h) but it was not induced in 48 hours. The expression of the CC2388-CC2390

operon showed that it is highly induced in the presence of 100 μM Co^{2+} (2.7-fold induction in 24 h) and 100 μM Ni^{2+} (3.3 fold in 24 h); slightly induced 100 μM Zn^{2+} (1.5 fold in 24 h), but it is not induced in the presence of 10 and 25 μM Cd^{2+} . The ΔCC2724 strain is not sensitive to zinc, cobalt or nickel. The ΔCC2390 strain is sensitive to cobalt, slightly sensitive to nickel and not sensitive to zinc, and both strains are sensitive to cadmium. A double mutant was constructed, as well as a complemented strain, and results suggest that these are two efflux systems with distinct metal responses.

Key words: *Caulobacter crescentus*. Metal. Antibiotics. Cadmium. Stress. Gene regulation. Functional genomics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismos gerais de resistência microbiana a metais	26
Figura 2 - Modelo molecular de efluxo de cádmio por uma ATPase tipo-P (A) e um antiporter quimiosmótico RND (B)	29
Figura 3 - Sistema de regulação controlando a expressão de β -lactamase e PBP2a	36
Figura 4 - Construção do vetor para análise da região promotora	53
Figura 5 - Esquema de construção do cassete e deleção do gene alvo	60
Figura 6 - Representação linear de parte do genoma de <i>Caulobacter crescentus</i> CB15	69
Figura 7 - Confirmação por PCR da deleção dos genes Δ CC1637 (A), Δ CC1638 (B) e Δ CC1634 (C)	72
Figura 8 – Sobrevivência na ausência e presença de metais Cd^{2+} (40 μM) e Zn^{2+} (100 μM) da linhagem NA1000 (A) e linhagens mutantes Δ CC1637 (B), Δ CC1638 (C), Δ CC1639 (D) Δ CC1640 (E)	75
Figura 9 - Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) da linhagem mutante Δ CC1640 (A) e linhagem NA1000 (B), na presença do antibiótico cefotaxima (CTX)	77
Figura 10 - Confirmação da clonagem do promotor do gene CC1638	78
Figura 11 - Análise da expressão dirigida pelo promotor do gene CC1638	79
Figura 12 - Localização dos oligonucleotídeos utilizados na análise por RT-PCR	80
Figura 13 - Determinação da co-transcrição dos genes em estudo	80
Figura 14 - Análises do padrão de expressão do operon CC1637- CC1640 (p1640 <i>lacZ</i>). Na ausência e presença de metais Cd^{2+} Zn^{2+} , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ e H_2O_2	82
Figura 15 - Análise do padrão de expressão dos genes CC1640 e CC1638 em meio sólido utilizando a linhagem Δ CC1634	84
Figura 16 - Análise do padrão de expressão do gene CC1640 utilizando meio M2-Glicose	85
Figura 17 - Análise de expressão do operon CC1637-CC1640 na linhagem mutante Δ CC1640 e NA1000	86
Figura 18 - Alinhamento da sequências de proteínas codificadas pelos genes peptidase M56, BlaR1 de <i>Maricaulis maris</i> MCS10, BlaR de <i>C. crescentus</i> e proteína relacionada a ankirina de <i>Oceanicaulis</i> sp. HTCC2633	88
Figura 19 - Expressão e purificação da proteína BlaI codificada pelo gene CC1640	90
Figura 20 - Confirmação da clonagem do domínio peptidase da proteína BlaR	91

Figura 21 - Expressão e purificação do domínio peptidase da proteína BlaR a partir de corpos de inclusão	92
Figura 22 - Expressão e purificação do domínio peptidase da proteína BlaR	93
Figura 23 - Análise de interação da proteína recombinante BlaI ao DNA do promotor do gene CC1640, pela mudança de mobilidade eletroforética	94
Figura 24 - Análise de inibição da interação da proteína reguladora BlaI com o promotor na presença da proteína com domínio peptidase (BlaR), pela inibição de mudança da mobilidade eletroforética	95
Figura 25 - Alinhamento da sequência de aminoácidos de proteínas BlaI (CC1640) de <i>C. crescentus</i> , BlaI-Sa de <i>Staphylococcus aureus</i> , MecI-Sa de <i>Staphylococcus aureus</i> e Rv1846c de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	96
Figura 26 - Localização dos putativos sítios de ligação da proteína BlaI no promotor do operon CC1636-CC1640	97
Figura 27 - Análise por RT-PCR semi quantitativo para determinar a expressão relativa do gene CC1568	100
Figura 28 - Análise por RT-PCR semi quantitativo para determinar a expressão relativa dos genes CC1230 e CC2661	101
Figura 29 - Representação linear de parte do genoma de <i>Caulobacter crescentus</i> e localização dos genes CC2720-CC2725	104
Figura 30 - Representação linear de parte do genoma de <i>Caulobacter crescentus</i> contendo os genes CC2388-CC2390	105
Figura 31 - Alinhamento parcial da sequência de aminoácidos dos genes parálogos ao gene CC2724	106
Figura 32 - Confirmação da clonagem do promotor dos genes CC2720 e CC2721 no plasmídeo pRKlacZ290	107
Figura 33 - Análise do padrão de expressão dos genes CC2720, CC2721 e CC2388 na linhagem <i>C. crescentus</i> NA1000	108
Figura 34 - Determinação da co-transcrição dos genes CC2720-CC2721	109
Figura 35 - Análise do padrão de expressão dos genes CC2720 e CC2388, na ausência e presença de metais cádmio e níquel	111
Figura 36 - Análise do padrão de expressão dos genes CC2720 e CC2388, na ausência e presença de metais zinco e cobalto	112
Figura 37 - Confirmação da clonagem dos fragmentos flanqueadores para deleção dos	114

genes CC2390 (A) e CC2724 (B) no vetor pNPTS138

Figura 38 - Confirmação por PCR da deleção dos genes e obtenção das linhagens 115
mutantes Δ CC2724 (A), Δ CC2390 (B) e Δ CC2724 Δ CC2390 (C)

Figura 39 - Crescimento das linhagens mutantes Δ CC2724, Δ CC2390 e linhagem 117
NA1000 na presença dos metais cádmio, cobalto e níquel

Figura 40 - Crescimento das linhagens mutantes Δ CC2724, Δ CC2390, 118
 Δ CC2724 Δ CC2390 e linhagem NA1000 na presença dos metais zinco e níquel

Figura 41 - Confirmação da construção dos plasmídeos comp2724pNPT228XNE (A) e 119
comp2390 pNPT228XNE (B)

Figura 42 - Análise de complementação das linhagens mutantes Δ CC2724 e Δ CC2390 121
utilizando os plasmídeos Comp2724-pNPT228XNE e Comp2390-pNPT228XNE

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Mecanismo de ação dos antibióticos	33
Tabela 2 -. Linhagens bacterianas	44
Tabela 3 - Oligonucleotídeos utilizados	45
Tabela 4 - Plasmídeos utilizados	48
Tabela 5 - Análise de sensibilidade a peróxido de hidrogênio	73
Tabela 6 -. Análise de sensibilidade a tert-butil hidroperóxido	74
Tabela 7 - Análise de sensibilidade a antibióticos das linhagens mutantes	76
Tabela 8 - Crescimento mínimo inibitório (CMI) da Linhagem NA1000 e Δ CC1640	77
Tabela 9 - Domínios de ankirina identificados na proteína codificada pelo gene CC1639	87
Tabela 10 - Genes apresentando a putativa sequência de ligação da proteína Blal	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP - adenosina trifosfato
CTX - antibiótico β -lactâmico cefotaxima
CFE - antibiótico β -lactâmico cefalexina
DNA - ácido desoxirribonucleico
DMSO - dimetilsulfóxido.
dNTP - desoxirribonucleotídeos fosfatados
DO₆₀₀ - densidade óptica a 600 nanômetros
DTT - ditioneitol
ECF - função extracitoplasmática
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético
FAD - flavina adenina dinucleotídeo
GMC - glicose-metanol-colina
gDNA - DNA genômico
HAE - efluxo de compostos anfífilos e hidrofóbicos
HME - efluxo de metais pesados
IPTG - isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo
kDa - quilodáton(s)
LB - luria-bertani
MFP - proteína de fusão de membrana
MFS - superfamília facilitador maior
mRNA - RNA mensageiro
NAD - nicotinamida adenina dinucleotídeo
OMF - fator de membrana externa
ONPG - orto-nitrofenil- β -galactosídeo
ORF - fase de leitura aberta (*open reading frame*)
Pb - pares de bases
PCR - reação em cadeia da polimerase
PMSF - fluoreto de fenilmetilsulfonil
PYE - extrato de levadura peptona
RNA - ácido ribonucleico
RNase - ribonuclease
RND - resistência, nodulação e divisão celular

Rpm - rotações por minuto

SDS - dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS

TBE - tris-borato-EDTA

TE - tris EDTA

TM - temperatura de anelamento

U - unidade(s)

UFC - unidade formadora de colônia

μ M - micro molar

x g - vezes a aceleração da gravidade

X-gal - 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 Bactérias e Metais	24
1.2 Bactérias e resistência a antibióticos	32
1.3 <i>Caulobacter crescentus</i>	38
2 OBJETIVOS	42
2.1 Caracterizar o agrupamento gênico CC1637 – CC1640 de <i>C. crescentus</i>	42
2.2 Comparar dois sistemas de efluxo da família RND constituídos pelos genes CC2720-CC2722-CC2724 e CC2388-CC2389- CC2390, que codificam potenciais sistemas de efluxo de resistência a metais Cd^{2+}, Zn^{2+} e Co^{2+}	42
3 MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1 Técnicas gerais de biologia molecular	43
3.2 Linhagens bacterianas e condições de cultura	43
3.3 Oligonucleotídeos utilizados	43
3.4 Plasmídeos utilizados	43
3.5 Amplificação e clonagens dos genes em estudo	49
3.5.1 <i>Minipreparação de DNA genômico (gDNA)</i>	49
3.5.2 <i>Reação de PCR e clonagem das regiões em estudo</i>	49
3.5.3 <i>Transformação de Escherichia coli DH5α por eletroporação</i>	50
3.5.4 <i>Minipreparação de DNA plasmídial</i>	50
3.5.5 <i>Seqüenciamento e análises de sequências</i>	51

3.6 Análises da expressão dos genes CC1638, CC1640, CC2720, CC2721 e CC2388	52
3.6.1 <i>Construção dos vetores p1638lacZ, p2720lacZ e p2721lacZ</i>	52
3.6.2 <i>Conjugação de <i>Caulobacter crescentus</i> e <i>Escherichia coli</i></i>	53
3.6.3 <i>Análise da atividade transcricional dos promotores em estudo</i>	54
3.6.4 <i>Análise da atividade transcricional dos genes CC1638 e CC1640, através do teste de difusão a partir de discos contendo antibióticos</i>	55
3.7 Ensaio de RT-PCR	56
3.7.1 <i>Extração de RNA por método de Trizol</i>	56
3.7.2 <i>Amplificação por RT-PCR</i>	56
3.8 Análise por RT-PCR semi-quantitativo	57
3.8.1 <i>Síntese de cDNA</i>	57
3.8.2 <i>Amplificação do cDNA</i>	58
3.9 Deleção dos genes em estudo e obtenção de linhagens mutantes	58
3.10 Análises do fenótipo das linhagens mutantes pertencentes ao agrupamento gênico CC1637-CC1640	61
3.10.1 <i>Ensaio de sensibilidade a agentes oxidantes por halo de inibição</i>	61
3.10.2 <i>Teste de sensibilidade a antimicrobianos</i>	61
3.10.3 <i>Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)</i>	61
3.10.4 <i>Teste de viabilidade na presença de metais</i>	62
3.11 Análises do crescimento das linhagens mutantes ΔCC2724 e ΔCC2390 e duplo mutante ΔCC2724Δ2390 na presença de metais cádmio, zinco, cobalto e níquel	62
3.12 Complementação das linhagens mutantes ΔCC2724 e ΔCC2390	62

3.13 Expressão e purificação do domínio peptidase da proteína BlaR	63
3.14 Ensaio de retardamento de mobilidade eletroforética em gel	64
3.14.1 <i>Ligação da proteína BlaI ao DNA</i>	64
3.14.2 <i>Inibição da ligação da proteína BlaI ao DNA</i>	65
3.15 Análise computacional	65
3.16 Análise estatística	66
4 RESULTADOS - Parte 1 – Parte 2	67
4.1 Caracterizações do agrupamento gênico CC1637 – CC1640	69
4.1.1 <i>Obtenção de linhagens mutantes</i>	70
4.1.2 <i>Análises dos fenótipos das linhagens mutantes</i>	72
4.1.2.1 <u>Na presença de peróxido de hidrogênio</u>	72
4.1.2.2 <u>Na presença de tert-butil hidroperóxido</u>	73
4.1.2.3 <u>Na presença de metais cádmio e zinco</u>	74
4.1.2.4 <u>Na presença de antibióticos</u>	76
4.1.3 <i>Análise da organização transcricional do agrupamento gênico CC1637-CC1640</i>	77
4.1.4 <i>Análise do padrão de expressão do operon CC1637-CC1640</i>	81
4.1.4.1 <u>Análises do padrão de expressão na presença de metais e peróxido de hidrogênio</u>	81
4.1.4.2 <u>Análises do padrão de expressão na presença de antibióticos</u>	83
4.1.5 <i>Análise do padrão de expressão do operon CC1637-CC1640 na linhagem mutante ΔCC1640</i>	85
4.1.6 <i>Determinação da ligação da proteína codificada pelo gene CC1640 (BlaI) a seu promotor</i>	86

4.1.6.1 <u>Expressão e purificação das proteínas codificadas pelos genes CC1639 (BlaR) e CC1640 (BlaI)</u>	90
4.1.6.2 <u>Ensaio de mudança de mobilidade eletroforética</u>	93
4.1.7 <i>Identificação de putativos genes regulados pela proteína BlaI</i>	95
4.1.8 <i>Análises semi quantitativa da expressão dos genes CC1230, CC1568 e CC2661</i>	99
4. 2 Comparação de dois sistemas de efluxo da família RND	103
4.2.1 <i>Análise comparativa dos genes em estudo</i>	103
4.2.2 <i>Análise da expressão dos genes CC2720, CC2721 e CC2388</i>	106
4.2.3 <i>Análise da co-transcrição entre os genes CC2720-CC2721</i>	108
4.2.4 <i>Análise do padrão de expressão dos genes CC2720 e CC2388 na presença de metais cádmio, zinco, cobalto e níquel</i>	109
4.2.5 <i>Obtenção de linhagens mutantes</i>	113
4.2.6 <i>Análises do fenótipo das linhagens mutantes ΔCC2724 e ΔCC2390</i>	115
4.2.7 <i>Complementação das linhagens mutantes ΔCC2724 e ΔCC2390</i>	118
5 DISCUSSÃO	122
6 CONCLUSÕES	135
REFERÊNCIAS	137
ANEXO A.1- Alinhamento da sequência de aminoácidos das proteínas codificada pelos genes CC2724 e CC2390 de <i>C. crescentus</i> e proteínas Cnr, NccA e Czc de <i>Ralstonia metallidurans</i>	147
ANEXO A.2- Tabela. Análise comparativo (porcentagem de identidade) de proteínas de sistemas HME-RND de <i>R. metallidurans</i> ^a e <i>C. crescentus</i> ^b envolvidas na resistência a metais	151

1 INTRODUÇÃO

Os microorganismos de vida livre estão expostos às mudanças do seu habitat causadas por fatores bióticos, abióticos ou antropogênicos, o que motiva um constante processo de adaptação para manter sua sobrevivência. Desde o início da vida os seres vivos têm se adaptado e desenvolvido na presença de metais, e a partir da década de 1940 a contaminação do meio ambiente com antibióticos tem constituído um novo mecanismo de pressão seletiva. Assim, os microorganismos têm desenvolvido uma sofisticada e dedicada maquinaria genética e metabólica para adquirir, utilizar, neutralizar, transportar, detoxificar e administrar a concentração intra e extracelular dos diversos tipos de íons de metais e antibióticos presentes no seu meio ambiente, dando origem à aparição de cepas bacterianas resistentes a estes produtos. O conhecimento dos eventos moleculares relacionados à resposta e resistência a antibióticos e metais são importantes para se estabelecer seu efeito sobre o metabolismo celular, e o sistema celular de manutenção da homeostase, o que permite explorar a capacidade metabólica dos organismos em resposta a estes produtos.

Nosso laboratório utiliza como organismo modelo a bactéria oligotrófica *Caulobacter crescentus*, encontrada em praticamente todos os ambientes aquáticos (marinho e de água doce) e em muitos tipos de solo. Em *C. crescentus* têm sido identificados genes envolvidos na resposta a metais (cromo, cádmio, selênio, urânio e zinco) (Hu, et al 2005; Braz e Marques 2005; Hillson et al 2007; Braz et al 2010) e antibióticos (β -lactâmicos) (Simm et al., 2001; Docquier et al., 2002), porém existe pouca informação sobre os mecanismos celulares de resposta e resistência à presença de antibióticos e metais nesta bactéria.

Nossa proposta consiste em caracterizar em nível molecular um agrupamento de genes (CC1637-CC1640) envolvido na resistência a metais (Cd^{2+} e Zn^{2+}), antibióticos e estresse oxidativo e comparar dois sistemas de efluxo da família RND (*resistance-nodulation-cell division*) (codificados pelos genes CC2721/ CC2722/ CC2724 e CC2388/ CC2389/ CC2390), envolvidos na resistência a Cd^{2+} e Zn^{2+} .

1.1 Bactérias e Metais

Os metais são componentes naturais de nosso planeta, estão naturalmente presentes na constituição de solos e rochas e desde o início da vida os seres vivos têm se desenvolvido na presença de metais. A origem da vida pode estar associada ao metal mais abundante na terra: o Ferro (Fe). A redução de Fe^{3+} a Fe^{2+} é considerada a forma inicial de respiração microbiana e tem sido conservada através da evolução (Barton et al., 2007).

Do ponto de vista fisiológico, os metais podem ser agrupados em: (i) essenciais e não tóxicos (por exemplo, sódio, potássio, cálcio e magnésio); (ii) essenciais, porém perigosos em altas concentrações (por exemplo, ferro, manganês, zinco, cobre, cobalto, níquel e molibdênio); e (iii) tóxicos não essenciais (por exemplo, prata, ouro, alumínio, chumbo, mercúrio e cádmio) (Bruins et al., 2000; Valls et al., 2002). Doze metais são conhecidos por ser essenciais aos seres vivos: sódio (Na), magnésio (Mg), potássio (K), cálcio (Ca), cromo (Cr), manganês (Mn), ferro (Fe), cobalto (Co), cobre (Cu), zinco (Zn), selênio (Se) e molibdênio (Mo). Dos metais não essenciais, mercúrio (Hg), chumbo (Pb), cádmio (Cd) e arsênio (As), são reconhecidos como perigosos à saúde humana (Silveira et al., 2003).

Desde a revolução industrial (século XVIII), a elevação dos teores de metais no meio ambiente vem sendo associada ao uso intensivo de produtos agrícolas (fertilizantes) e aos resíduos da indústria e mineração (Fernandez et al., 2007). Os metais, diferente dos poluentes orgânicos, não podem ser biodegradados e permanecem no meio ambiente de forma livre ou em complexos, sendo acumulados principalmente no solo e água (de rios, lagos e mananciais), podendo atingir até o lençol freático (Hsieh et al., 2007). No solo, os metais podem ser adsorvidos por meio de reações de adsorção específica e/ou não específica e entre os componentes que retêm metais destacam-se os óxidos de Fe e a matéria orgânica. Em solução, os metais encontram-se como íons livres e/ou formam complexos ligantes orgânicos e inorgânicos. As espécies livres são mais importantes em estudos de poluição ambiental, pois correspondem às formas prontamente biodisponíveis para os seres vivos (Silveira et al., 2003), por isso o meio aquático é o mais suscetível ao efeito tóxico da poluição por metais, o que torna os organismos aquáticos um bom modelo para o estudo da resposta à exposição a estes íons.

O estudo da composição dos seres vivos tem mostrado a existência de um metaloma (conteúdo de metais na célula), constituído pelos metais essenciais requeridos em grandes ou pequenas quantidades para a atividade celular (Barton et al., 2007), como processos redox, estabilização de moléculas, manutenção da pressão osmótica ou como parte da estrutura de

diversas proteínas e no centro ativo de muitas enzimas. Alguns metais não tem valor para a célula (metais não essenciais), e são potencialmente tóxicos.

Porém, em alta concentração, os metais essenciais e não essenciais podem ser nocivos à célula, prejudicando a membrana celular, diversas funções celulares, a estrutura do DNA ou alterando a especificidade das enzimas (Bruins et al., 2000). Assim, os microorganismos têm desenvolvido um sistema de homeostase adaptado à presença de metais essenciais e não essenciais, com a finalidade de manter a ótima concentração do metal intracelular. Isto é feito controlando os processos de transporte, tráfico intracelular, efluxo e conservação, garantindo sua biodisponibilidade para os processos celulares e evitando prejuízo aos componentes celulares (Ma et al., 2009).

O mecanismo de homeostase está constituído por diferentes tipos de proteínas: (i) transportadores de metal, que transportam íons ou pequenas moléculas quelantes através das barreiras impermeáveis, e geralmente são proteínas de membrana; (ii) metalochaperonas, que transportam o metal entre os diferentes compartimentos celulares (periplasma, citosol) e (iii) sensores de metal ou metaloreguladores, que controlam a expressão de genes que codificam as proteínas envolvidas na homeostase em resposta a condições de carência ou aumento de um metal (Ma et al., 2009).

Assim, os microrganismos têm desenvolvido uma maquinaria para administrar a concentração intracelular dos diversos tipos de íons de metais presentes no seu meio ambiente (Figura 1) (Giedroc et al., 2007; Haferburg et al., 2007). Desta forma, as bactérias respondem à presença de metais no seu meio, através de uma série de processos, que podem ser biotecnologicamente explorados (Valls et al., 2002; Ivask et al., 2004; Majewska et al., 2007):

a- Bioadsorção- ligação de metais a componentes da superfície celular (por exemplo, grupos carboxil, amino, imidazol, fosfato, sulfato e hidroxila); b- Precipitação do metal- capacidade de reduzir o metal, gerando uma forma menos ativa; c- Transformação enzimática- através da atividade de enzimas (oxidação, redução, metilação e alquilação), que levam à imobilização ou precipitação do metal; d- Bioacumulação- capacidade de transportar e acumular o metal no interior celular; e- Produção de biosurfactantes- produção de biopolímeros que poderiam participar na solubilização e desabsorção dos metais; f- Biosensor- o organismo é sensível a presença de metais e podem ser utilizados como indicadores.

Assim, é de grande interesse o conhecimento de todos os processos acima mencionados, para determinar o efeito biológico dos metais, os mecanismos moleculares da

resposta celular e o potencial de aproveitamento destes microorganismos em processos como bioremediação.

Figura 1 - Mecanismos gerais de resistência microbiana a metais\ (X)-Interação de constituintes celulares com íons metais, (M)-Metais.

Fonte: Adaptado de Haferburg, et al., 2007.

De forma geral, todas as bactérias apresentam genes para resistência a íons de metais, entre os quais temos: Ag^+ , AsO_4^{3-} , AsO_3^{3-} , Cd^{2+} , Co^{2+} , CrO_4^{2-} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , TeO_3^{2-} , Tl^+ e Zn^{2+} . Estes grandes grupos de sistemas de resistência funcionam através de mecanismos de efluxo, reações enzimáticas de transformação (oxidação, redução, metilação e demetilação), ou proteínas que ligam metais (por exemplo, metalotioneína SmtA, chaperona CopZ e proteína periplásmica Sile que liga prata). Alguns dos sistemas de efluxo são dependentes de ATPase e outros são trocadores quimiosmóticos íon/próton (Silver, 1996a; Silver et al., 1996 b; Valls et al., 2002; Silver et al., 2005). Por outro lado, as bactérias podem também sequestrar metais e elementos radioativos (por exemplo, urânio e tório) através de mecanismos de absorção passiva que envolve componentes com carga elétrica da superfície celular (bioabsorção) ou por processos de transporte ao interior celular (bioacumulação) (Lovley, 2003).

Entre os mecanismos de resistência a metais mais bem descritos em bactérias, temos os sistemas (Silver et al., 1994):

a. *mer*, pelo qual o mercúrio e compostos organomercuriais são detoxificados enzimaticamente.

b. *ars*, pelo qual o arseniato é reduzido enzimaticamente a arsenito. Arsenito é bombeado para fora da célula por uma proteína de membrana ou um sistema de ATPase.

c. *cadA*, pelo qual o cádmio (e zinco) é bombeado para fora da célula por um sistema ATPase tipo P.

d. *cop*, que confere resistência a cobre em *Pseudomonas* e *E. coli*. Em *E. coli* a resistência a cobre é devida a bioacumulação e ligação por proteínas de superfície.

e. *czc*, pelo qual o cádmio, zinco, e cobalto são bombeados pra fora da célula por um complexo de membrana de três componentes. O sistema *cnr* bombeia cobalto e níquel para fora da célula utilizando um complexo proteico acoplado à membrana.

6. *chr*, no qual a resistência a cromo é devida à redução do transporte celular.

Os mecanismos de resistência a qualquer metal consistem muitas vezes na ação conjunta de alguns sistemas de efluxo (Nies, 2003) (Figura 2). A primeira linha de resistência a metais é constituída pela família de proteínas RND envolvidas em resistência a metais pesados (*R. metallidurans*), nodulação (*Mesorhizobium loti*) e divisão celular (*E. coli*). O sistema RND é constituído por três proteínas que formam um complexo sistema de efluxo, que exporta substratos da membrana citoplasmática ao periplasma e deste ao exterior celular. A segunda linha de defesa é constituído pelo sistema facilitador de difusão de cátions (CDF), uma família de sistemas de transportadores secundários ligados a membrana que realizam o efluxo de metais cátions de transição como, Zn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , ou Mn^{2+} , desde o citoplasma ao exterior celular ou a espaço periplásmico. A maioria de proteínas CDF apresentam seis putativos domínios transmembrana (TMDs) com N- e C-terminal citoplasmático, sendo os mais conservados os TMDs I, II, V e VI, os quais estão envolvidos no transporte do metal (Nies, 2003; Montanini et al., 2007; Von Rozycki et al., 2009). A terceira linha de defesa é constituída pelo sistema ATPase tipo P que consiste em uma proteína com segmentos transmembrânicos que bombeia íons contra o gradiente eletroquímico com gasto de ATP, sendo utilizada para o transporte específico de metais bi e monovalentes (Wu et al., 2006). Um exemplo desta ação conjunta ocorre em bactérias Gram negativas e consistem de dois eventos, um que atua no citoplasma e outro no espaço periplasmático; inicialmente as proteínas ATPase tipo P e CDF transportam seu substrato através da membrana interna para o periplasma e em um segundo evento o sistema RND transporta o substrato através da membrana externa para fora da célula (Nies, 2003; Kim et al., 2011).

Em bactérias Gram negativas o sistema RND confere resistência a antibióticos e metais (Nies, 2003; Baker-Austin et al., 2006). O sistema RND esta composto por três

proteínas que são: (i) proteína RND de membrana interna que tem o motivo de reconhecimento ao metal, (ii) proteína de fusão de membrana (MFP) e (iii) proteína que efetua o efluxo através da membrana externa (OMF) (Nies, 2003). O sistema RND é dividido segundo sua especificidade de substrato em duas subclasses: (i) efluxo de antibióticos ou compostos hidrofóbicos/anfifílicos (HAE), e (ii) efluxo de metais pesados (HME) que transporta íons (cátions monovalentes ou divalentes), por exemplo, o sistema Czc de *Ralstonia metallidurans* (De Angelis et al., 2010). Perrin et al (2010) estudaram o sistema de efluxo HME e HAE presentes em bactérias do gênero *Burkholderia*, identificando genes pertencente a proteína RND no genoma de 21 espécies. O alinhamento múltiplo de 39 proteínas RND identificou a sequência G403XXXD407 XXXXXE414 (posição referente à proteína MexB de *P. aeruginosa*) no domínio transmembrana TM4 em ambos os sistemas HME e HAE, sugerindo que estes resíduos podem desempenhar um papel importante na translocação de prótons. Cinco resíduos de aminoácidos foram conservados em HAE: D407-D408 (localizados no domínio TM4) e K940, R971 e T978 (localizados no domínio TM10) na posição referente à proteína AcrB de *E. coli*. Destes 5 aminoácidos, somente D407, R971 e T978 encontram-se no sistema HME e o aminoácido K940 se encontra em todos os sistemas HAE1 e não em sistemas HME. A análise de 63 genomas procariotos de arqueas e bactérias (Nies, 2003) permitiu identificar e agrupar proteínas RND de acordo com seu substrato, comparando com a proteína CzcA de *Ralstonia metallidurans*. Assim, temos: HME1 (substrato: Zn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+}), HM2 (substrato: Co^{2+} , Ni^{2+}), HM3a (cátions divalentes), HME3b (cátions monovalentes), HM4 (Cu^+ ou Ag^+) e HME5 (Ni^{2+}), sendo os motivos de reconhecimento ao substrato localizados no domínio TM4. Por exemplo, em HME1 e HME2 foi identificado o motivo DFG-DGA-VEM, presente na proteína CzcA (HME1) ou CnrA e NccA (HME2) (Nies, 2003).

Figura 2 - Modelo molecular de efluxo de cádmio por uma ATPase tipo-P (**A**) e um antiporter quimiosmótico RND (**B**). A figura mostra o mecanismo de resistência a cádmio empregado os sistemas: ATPase tipo-P CadA (**A**) ou efluxo RND CzcCBA (**B**). CadA é uma proteína inserida na membrana interna que bombeia cádmio ao periplasma ou ao meio externo, utilizando energia proveniente da hidrólises de ATP. O complexo quimiosmótico CzcCBA RND é constituído por três polipetídeos: CzcA inserido na membrana interna, CzcB localizado no periplasma e CzcC proteína inserida na membrana externa, estas proteínas formam um canal que utiliza prótons para liberação de íons cádmio fora da célula, em alguns casos estes sistemas também bombeiam íons cádmio periplasmáticos para o exterior celular.

Fonte: Silver et al., 2005.

Um mecanismo para tolerar o efeito tóxico dos íons de metais em geral, consiste na diminuição do influxo dos íons, para o qual se deve reprimir a expressão do gene transportador (Zhao et al., 1996) ou ativar a proteólise da proteína transportadora (Liu et al., 1999).

Os mecanismos que controlam a resistência e a homeostase a metais são cuidadosamente regulados pela célula ao nível de expressão gênica e sistemas de transdução

de sinal, entre outros. Reguladores de transcrição dependentes de metal (metaloregulador) são um dos principais mecanismos que a célula tem para responder a metais. Portanto, é crucial entender como estes metaloreguladores são capazes de reconhecer e distinguir entre os diferentes metais gerando uma resposta transcricional de operons que codificam sistemas de efluxo, transportadores ligados à membrana, e proteínas que sequestram metais. Há algumas famílias de metaloreguladores em que os mecanismos de resposta a metais tóxicos foram bem estudados, como é o caso das famílias de reguladores de transcrição MerR e SmtB/ArsR (Pennella et al., 2005).

Proteínas da família MerR, são repressores de transcrição de operons relacionados a resposta de estresse induzido por íons de metais pesados. A ativação do operon acontece quando o metal se liga na proteína e provoca a distorção do DNA, de modo que libera o promotor para a transcrição de genes que codificam proteínas de efluxo em resposta a metal. São membros desta família o sistema MerR (mercúrio) de *P. aeruginosa*, ZntR (zinco) e CueR (cobre) de *E. coli*, CoaR (cobalto) de *Synechocystis* e PbrR (chumbo) de *R. metallidurans* (Outten et al., 2000; Busenlehner et al., 2003). Por outro lado, membros da família SmtB/ArsR são exclusivamente repressores da transcrição dos genes que codificam proteínas de efluxo de metal ligando-se como homodímeros na sequência operador/promotor (O/P) destes genes. A desrepressão do gene ocorre quando o metal que deve ser eliminado da célula se liga ao repressor provocando uma mudança na conformação da proteína de forma que o repressor perde a afinidade de ligação ao O/P liberando assim a transcrição. São membros desta família SmtB (zinco) de *Synechococcus* PCC7942, ArsR (arsênio) de *E. coli*, NmtR (níquel e cobalto) de *M. tuberculosis*, CziA ou ZntR (zinco e cobalto) e CadC (cádmio, chumbo, bismuto e zinco) de *S. aureus* (Busenlehner et al., 2003; Rensing, 2005).

Na análise do genoma de *Pseudomonas putida* KT2440 foram identificados: dois sistemas de resistência a arsênio (*arsRBCH*), um para cromo (*chrA*), quatro a seis sistemas para cátions divalentes (dois *cadA* e dois a quatro *czc*), dois sistemas para cátions monovalentes (*pacS*, *cusCBA*), dois operons que quelam íons de Cu (*copAB*), uma metalotioneína, um sistema para metilação de Te/Se (*tpmT*) e quatro transportadores ABC para Zn, Mn, Mo e Ni (um *nikABCDE*, dois *znuACB* e um *mobABC*) (Canovas et al., 2003), demonstrando a capacidade de resistência a metais desta bactéria. Uma análise genética realizada com 62 bactérias, entre Gram-positivas e Gram-negativas mostram que, 28,8% apresentam resistência múltipla à combinação dos seguintes metais: As, Cd, Cr, Zn, Hg, Pb, Co, Cu e Ni (Abou-Shanab et al., 2007). Esta múltipla resistência pode ser devida à

transferência horizontal de genes (HGT) entre cepas de bactérias, por exemplo, do sistema ATPase tipo P (Martinez et al., 2006).

Os maiores problemas de contaminação são atribuídos aos metais pesados (mercúrio, arsênio, chumbo e cádmio), que podem contaminar plantas e outros componentes da cadeia alimentar, colocando em sério risco a saúde humana (Silveira et al., 2003; Sun et al., 2006). Dentre eles, os íons de cádmio são considerados altamente tóxicos a todos os organismos devido a seu meio-tempo de vida biológico (permanece de 20 a 30 anos no organismo humano), baixa taxa de excreção (eliminação de 1 a 2 mg/dia) e armazenamento em tecidos brandos, como fígado e rim; em humanos há indícios de que mesmo baixas concentrações de cádmio são carcinogênicas (Tully et al., 2000, Deckert, 2005).

Em bactérias, íons de cádmio inativam ou desnaturam proteínas através da ligação a grupos tiol (Nies, 2003); inibe o sistema “mismatch”, um dos sistemas de reparo de DNA (Jin et al., 2003); provocam danos ao DNA simples fita e interrompem a síntese de ácido nucleico e proteínas (Mittra, 1984; Mittra e Bernstein, 1978); substituem outros íons metálicos em uma variedade de proteínas, nas quais tais íons têm papel de cofator (enzimas) ou estrutural (fatores de transcrição). Como cádmio não é um metal redox ativo, como é o caso do mercúrio e arsênio que são oxidados/reduzidos, tem se mostrado que íons de cádmio podem substituir ferro e zinco de metaloproteínas, e estes íons livres podem catalisar a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS induzido por metais) que podem produzir peroxidação lipídica e induzir uma resposta a estresse oxidativo (Nzengue et al., 2011).

Devido à sua alta toxicidade, diversos trabalhos têm abordado os mecanismos de resistência a íons cádmio. Como é um metal tóxico e não essencial, em *E. coli* cádmio age como um inibidor competitivo no transporte de zinco (Laddaga, et al., 1985) e em *Staphylococcus aureus* e *B. subtilis* entra pelo transporte de manganês (Weiss et al., 1978; Laddaga, et al., 1985). A resistência microbiana a cádmio é devida a três sistemas: antiporter quimiotático tipo CBA, ATPase tipo P e facilitador de difusão de cátions (CDF) (Rosen, 2002; Hu et al., 2007).

Diversas bactérias têm sido identificadas como tendo habilidade de resistência a cádmio. Em *S. aureus*, a resistência a cádmio é dada pelo operon *cad* que codifica as proteínas CadC e CadA. CadC é o repressor transcricional do operon *cad* e CadA é uma ATPase tipo P (Busenlehner et al., 2006). Genes para resistência a cádmio e outros metais têm sido identificados em diversas bactérias, entre as quais temos: *Pseudomonas putida* (genes *czcCBA1*, *cadA2R* e *colRS*) (Hu et al., 2007); *Helicobacter pylori* (genes *cznC*, *cznB* e *cznA*) (Stahler et al., 2006); *Ralstonia metallidurans* (genes *czcCBA*, *czcD*, *czcS*, *czcR* and the *czcE*)

(Legatzki *et al.*, 2003; Grosse *et al.*, 2004); e *Streptococcus thermophilus* genes *cadC* e *cadA* (Schirawski *et al.*, 2002), entre outros.

Metodologias abrangentes, como microarranjos de DNA e eletroforese bidimensional de proteínas, foram realizadas com o objetivo de identificar e analisar a resposta a cádmio em algumas bactérias, como *E. coli* (Wang *et al.*, 2005); *B. subtilis* (Moore *et al.*, 2005) e *C. crescentus* (Hu, *et al.*, 2005). Nestes trabalhos foi visto que a exposição a cádmio, além de aumentar a expressão de genes específicos do sistema de efluxo de metais, altera também a expressão de alguns genes que pertencem a outros sistemas de resposta a estresses, tais como: choque térmico, choque frio, SOS, estresse oxidativo, osmótico, ácido, antibióticos entre outros. Contudo, também foram observadas alterações na expressão de genes envolvidos no metabolismo, e em proteínas envolvidas na montagem do ribossomo (VanBogelen, *et al.*, 1987; Ferianc, *et al.*, 1998). Em uma proporção menor, este efeito de resposta ao estresse geral também foi observado através da estratégia de mutagênese por inserção aleatória de transposon na construção de uma biblioteca de linhagens mutantes de *P. fluorescens* e *C. crescentus* (Rossbach *et al.*, 2000; Braz e Marques., 2005).

1.2 Bactérias e resistência a antibióticos

No complexo sistema de interação dos microorganismos no meio ambiente, a luta pelo espaço e nutrientes se realiza de diferentes formas, uma das quais é a produção de uma substância que mata, inibe ou prejudica o desenvolvimento de outro microorganismo. Estas substâncias conhecidas como antibióticos têm sido utilizadas desde a década de 1940 (com a penicilina como primeiro representante) para o tratamento terapêutico de doenças infecciosas. Porém, a emergente e rápida disseminação de bactérias resistentes a antibióticos, nos últimos anos, expõe nossa falta de conhecimento sobre os processos ecológicos, evolutivos e metabólicos que permitem às bactérias desenvolver mecanismos de resistência contra a presença de antibióticos no seu meio ambiente ou pela intervenção humana (Aminov, 2009).

A resistência a antibióticos podem ser uma propriedade intrínseca ou uma capacidade adquirida (Kaye *et al.*, 2004). A resistência intrínseca (resistência natural) ocorre devido à ausência do alvo para ação do antibiótico, por exemplo, na relação entre antibióticos que inibem a síntese da parede celular (penicilina e outros) e os micoplasmas. Micoplasmas não apresentam parede celular, logo penicilinas não encontram alvo para sua ação. Esta característica fenotípica é transferida de geração a geração. A resistência adquirida ocorre quando uma alteração genética na bactéria diminui a eficiência ou efeito do antibiótico, resultando em uma resistência clínica. As bactérias podem utilizar um ou vários mecanismos

de resistência contra uma classe de antibióticos, ou um mesmo mecanismo pode proporcionar resistência a vários antibióticos relacionados ou não.

A partir de 1940, diversas classes de antibióticos têm sido identificadas, produzidas e introduzidas como parte de uma terapia de tratamento a doenças infecciosas em animais e humanos, porém, após alguns anos de uso, surgem bactérias resistentes a estes antibióticos (Brötz-Oesterhelt et al., 2010). O uso de antibióticos estimula condições de pressão seletiva, que dão origem a aparição de cepas bacterianas resistentes a agentes antimicrobianos. Os mecanismos de ação de algumas classes de antibióticos estão mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Mecanismo de ação dos antibióticos

Antibióticos	Modo de ação
β-lactâmicos: Penicilina, cefalosporina, carbapenemos Glicopeptídeos: Vancomicina	Interferência na síntese da parede celular
a-Cloranfenicol, macrólídeos, clindamicina b-Aminoglicosídeos e tetraciclina	Inibição de síntese de proteínas: a- ligam-se a subunidade 50S ribossomal b- ligam-se a subunidade 30S ribossomal
a-Fluoroquinolonas b-Rifampicina	Interferência na síntese de ácidos nucleicos: a- Inibe síntese de DNA b- Inibe síntese de RNA.
Trimetoprim-sulfametoxazol	Inibição de vias metabólicas
Polimixinas e daptomicina	Disrupção da membrana bacteriana

Fonte: Tenover, 2006.

As bactérias desenvolveram mecanismos para evitar o efeito dos antibióticos (Kaye et al., 2004):

- a)** Diminuição da concentração intracelular do antibiótico, através da diminuição de permeabilidade da membrana externa (por exemplo para β-lactâmicos, genes *ompF*, *oprD*), diminuição do transporte pela membrana plasmática (por exemplo para Quinolonas, gene *ompF*), aumento do mecanismo de efluxo (por exemplo para tetraciclina, gene *tetA*; quinolonas, gene *norA*; macrólidos, gene *mefA*; múltiplos antibióticos, genes *mexAB-oprF*),
- b)** Inativação (reversível ou irreversível) do antibiótico, através de enzimas (por exemplo para β-lactâmicos, enzima β-lactamase), e

c) Modificação da molécula alvo, quando uma mutação altera a característica da molécula, evitando o ação do antibiótico, por exemplo a resistência a β -lactâmicos devida a modificação da proteína que liga penicilina.

Uma bactéria sensível pode adquirir resistência através da ocorrência de mutações e seleção, ou pela aquisição do material genético de bactérias resistentes (transferência horizontal) pelo mecanismo de transformação, conjugação ou transdução. Dos vários mecanismos de resistência, o sistema de efluxo (que conferem resistência a macrólídeos, tetraciclina, cloranfenicol, quinolonas e β -lactâmicos) e o de enzimas inativadoras (que conferem resistência a β -lactâmicos), são os mais predominantes e favorecem a resistência bacteriana a várias classes de antibióticos.

Existem cinco classes de sistemas de efluxo de antibióticos conhecidos: MF (facilitador maior), MATE (efluxo de multidroga e tóxicos), RND (divisão-nodulação-resistência), SMR (sistema menor de resistência a múltiplas drogas) e ABC (cassete que liga ATP). O sistema de efluxo RND está presente em todos os seres vivos, porém, em bactérias Gram negativas está envolvido também na resistência a antibióticos. O sistema RND TolC e AcrB de *E. coli* e MexA e OprM de *Pseudomonas aeruginosa*, são os mais conhecidos (Guglielame et al., 2006).

Em *P. aeruginosa* as bombas de efluxo RND são o componente principal que confere resistência a múltiplos antibióticos (β -lactâmicos, fluoroquinolonas, tetraciclina, cloranfenicol, macrólídeos, aminoglicosídeos), pois remove e evita seu acúmulo no interior celular. Quatro destes sistemas de efluxo (MexABOprM, MexXY-OprM, MexCD-OprJ, e MexEFOprN), estão presentes em *P. aeruginosa* o que confere um efetivo mecanismo de resistência a antibióticos (Tenover, 2006)

Antibióticos β -lactâmicos (penicilinas, ampicilinas, cefalosporinas e outros relacionados), que interferem na biosíntese do peptidoglicano da parede celular das bactérias, são irreversivelmente inativados pela clivagem do anel β -lactâmico efetuado pela enzima β -lactamase. As enzimas β -lactamases são codificadas por elementos cromossômicos ou plasmídeos, de forma constitutiva ou induzida e secretada no espaço periplásmico (bactérias Gram-negativas) ou meio externo (bactérias Gram positivas). A ocorrência de mutações pontuais no gene codificador e sua rápida disseminação entre as populações bacterianas fazem do mecanismo de resistência a antibiótico mediado por enzimas β -lactamases o mais distribuído entre as bactérias, sendo também o mecanismo de resistência mais estudado (Matagne et al., 1998; Salverda et al., 2010).

Drawz e Bonomo (2010) classificam as enzimas β -lactamases em 4 classes:

1- Classe A: Constituída por: Serina- β -lactamases que hidrolisam benzilpenicilina; ESBLs (β -lactamase de amplo espectro) que hidrolisam penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos como aztreonam; e serina-carbapenemases que hidrolisam carbapenemos, cefalosporinas, penicilinas e aztreonam;

2- Classe B: metaloproteases;

3- Classe C: serina cefalosporinases; e,

4- Classe D: serina oxacilinases.

A classe C inclui enzimas β -lactamases tipo AmpC, CMY, ACT-1 e DHA. As enzimas β -lactamases tipo AmpC foram descobertas por conferir resistência a uma variedade de drogas, originando problemas de saúde pública por enterobactérias como *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis* (Coudron *et al.*, 2000; Jacoby 2009). Estas enzimas são usualmente codificadas por genes *bla* localizados no cromossomo bacteriano e conferem resistência a penicilinas e inibidores de β -lactamase (cefalosporinas e também cefoxitina, cefotetam, ceftriaxona e cefotaxima). Os genes das enzimas β -lactamases classe C em bactérias Gram negativas estão reprimidos e podem ser ativados por indução com alguns antibióticos β -lactâmicos, particularmente cefoxitina, e seu mecanismo de regulação está em estudo (Drawz e Bonomo, 2010).

O regulador de transcrição BlaI foi identificado no mecanismo de resistência a antibióticos β -lactâmicos (penicilina, ampicilina entre outros), presente em *Bacillus licheniformis* e *Staphylococcus aureus*. Nestas bactérias, os genes que codificam as enzimas β -lactamase (*blaZ*, *blaP*) e PBP2a (*mecA*), estão divergentes aos genes *blaI/blaR1* e *mecI/mecR1*, respectivamente (Figura 3). Os genes *blaI* ou *mecI* codificam uma proteína repressora citoplasmática que liga-se ao operador do gene de β -lactamase. A proteína reguladora BlaI apresenta uma região C-terminal responsável pela formação do homodímero, cuja região N-terminal liga-se ao operador e reprime a expressão da enzima (β -lactamase) que degrada os antibióticos β -lactâmicos. Os genes *blaR1* ou *mecR1* codificam proteínas que estão inseridas na membrana celular. BlaR1/MecR1 é uma proteína transmembrana, que apresenta duas regiões, uma C-terminal extracelular, com função de transdução de sinal e uma região N-terminal com uma alça citoplasmática contendo o motivo de Zn-metaloprotease. Na presença do antibiótico, a região C-terminal é acilada, produzindo uma alteração conformacional da proteína que leva a ativação, por autoclivagem, do motivo Zn-metaloprotease. Esta enzima então hidrolisa a proteína repressora BlaI, ativando a transcrição do gene *blaZ* (β -lactamase)

(Clarke *et al.*, 2001; Hanique *et al.*, 2004; Vreuls, *et al.*, 2004; Wilke *et al.*, 2004; Safo *et al.*, 2005; Cha *et al.*, 2007; Boudet *et al.*, 2007).

Figura 3 - Sistema de regulação controlando a expressão de β -lactamase ou PBP2a/ A expressão dos genes de β -lactamase e PBP2a (por exemplo *blaZ* e *MecA*, respectivamente) são reguladas por sistemas ortólogos, consistindo de um repressor (BlaI/MecI) e uma proteína sensor/transdutor (BlaR1/MecR1) que destrói a atividade do repressor quando ativado por antibióticos. Os repressores BlaI e MecI formam homodímeros que especificamente ligam seqüências de DNA no operador. BlaR1 e MecR1 são proteínas de membrana cada uma composta por três domínios: (i) um domínio extracelular C-terminal sensor β -lactâmico, (ii) um domínio transmembrana N-terminal contendo quatro hélices transmembrana, e (iii) um domínio intracelular metaloprotease que inativa por proteólise o repressor BlaI/MecI no citoplasma. A ligação do antibiótico β -lactâmico no domínio sensor provoca uma mudança conformacional que resulta na ativação autolítica do domínio protease intracelular, que catalisa a clivagem de BlaI/MecI afetando sua capacidade de ligação ao DNA, permitindo a transcrição de *blaZ/mecA*, *blaI/mecI* e *blaR1/mecR1*. A expressão destas proteínas é finalizada quando a sinalização pelo antibiótico é reduzida devido a hidrólise pela enzima β -lactamase.

Fonte: Modificado de Wilke *et al.*, 2004.

Da mesma família que as proteínas repressoras BlaI e MecI, a proteína repressora CopY de *Enterococcus hirae* liga-se ao operador com motivo TACANNTGTA. Nesta bactéria a homeostase de cobre é mantida pelo operon *cop*, o qual consiste de quatro genes, que codificam um repressor do operon, CopY, uma chaperona de cobre, CopZ e duas ATPases de tipo CPx, CopA e CopB. CopA realiza o influxo de cobre ao interior celular,

enquanto que CopB realiza o efluxo. Em meio com baixa concentração de cobre, CopY liga zinco e está presente como um homodímero ligado ao operador do operon. Em alta concentração de cobre, a chaperona CopZ realiza a troca do zinco por cobre, liberando o repressor CopY do promotor e ativando a transcrição do operon *cop*. (Magnani, et al., 2005; Portmann et al., 2006).

Desde o início da vida no planeta, as bactérias estão em contato com os metais, porém, a atividade humana, além de contaminar o meio ambiente com diversos metais, introduz os antibióticos como um novo contaminante. Considerando que os metais não sofrem degradação e que seu nível de concentração no meio é maior que o dos antibióticos, o estudo da resistência a metais como um fator importante na manutenção e proliferação de resistência a antibióticos é de grande importância. Em *E. coli* cepa K-12 AG100 o sistema de efluxo RND está envolvido na resistência ao antibiótico novobiocina (Baker-Austin et al., 2006), na *E. coli* K-12 OST3410 a sobre expressão do gene *robA* (uma proteína que liga DNA) incrementa a resistência a solventes orgânicos (difenil eter, ciclohexano), antibióticos (canamicina, novobiocina, cloranfenicol) e metais pesados (zinco, cobalto, níquel) (Nakajima et al., 1995).

Alguns dos mecanismos compartilhados que favorecem a co-resistência a metais e antibióticos podem ser (Baker-Austin et al., 2006)

- a- Redução da permeabilidade a membrana: As, Cu, Zn, Mn, Co, Ag e antibióticos: ciprofloxacina, tetraciclina, cloranfenicol e β -lactâmicos; por exemplo em cepas mutantes de *Serratia marcescens* deficientes em porina (Ruiz et al., 2003),
- b- Inativação e modificação: As, Hg e antibióticos: β -lactâmicos e cloranfenicol ,
- c- Aumento do efluxo: Cu, Co, Zn, Cd, Ni, As e antibióticos: tetraciclina, cloranfenicol e β -lactâmicos;
- d- Modificação/alteração do componente celular alvo, para diminuir a sensibilidade ao agente: Hg, Zn, Cu e antibióticos: ciprofloxacina, β -lactâmicos, trimetoprim e rifampicina; e,
- e- Sequestro do agente: Zn, Cd, Cu e antibiótico coumermicina.

Como mostrado, os mecanismos de homeostase e resistência a metais podem ser utilizados para resistir à atividade dos antibióticos. Isso representa um importante mecanismo de adaptação dos microorganismos, e também um potencial problema de saúde pública, ao contribuir para manutenção e dispersão de fatores de resistência a antibióticos.

1.3 *Caulobacter crescentus*

Segundo Poindexter (1964), o gênero *Caulobacter* foi proposto em 1935 por Henrici e Johnson, para agrupar bactérias Gram-negativas em forma de vibrios, arredondadas ou fusiformes, que apresentam um talo em um extremo da célula e se multiplicam por fissão binária transversal.

A espécie mais conhecida, *C. crescentus*, deve seu nome a forma de crescimento das células, que apresentam um flagelo em um pólo e um talo no pólo oposto. Após um longo tempo de crescimento na fase estacionária, *C. crescentus* pode alongar em uma célula maior helicoidal, sugerindo que as células menores seriam uma forma helicoidal truncada (Margolin, 2004).

C. crescentus é uma α -proteobactéria, que teve seu genoma de ~4 Mbp totalmente sequenciado, o qual apresenta 3,767 genes (Nierman et al., 2001). A linhagem de *C. crescentus* NA1000 é uma variante da cepa selvagem CB15, (ATCC 19089) que tem sido extensivamente utilizada por permitir a sincronização do seu ciclo celular (Evinger e Agabian, 1977).

A característica mais importante de *C. crescentus* é a presença de um ciclo celular assimétrico, gerando a cada ciclo de divisão dois tipos celulares de morfologia e programação celular diferente. A divisão celular dá origem a uma célula móvel e a uma célula sésil que apresenta um talo para fixação, continuamente dando origem a uma nova célula flagelada em cada divisão. A célula móvel possui um flagelo localizado no pólo da célula oposto ao sítio de divisão celular, e sua mobilidade favorece a competição por nutrientes em meio diluído e garante que a nova progênie irá colonizar um novo local (Nierman et al., 2001).

Espécies de *Caulobacter* podem ser encontradas em meios aquáticos ricos ou pobres em nutrientes, meios altamente tóxicos (minas de ouro), água e/ou sedimentos contaminados (Curtis et al., 2010). *C. crescentus* é uma bactéria oligotrófica de vida livre, encontrada em praticamente todos os ambientes aquáticos (marinhos e de água doce). A adaptação de *C. crescentus* à sobrevivência em condições oligotróficas incluem sua habilidade de crescer lentamente em condições limitadas de nutrientes, a regular/deter a progressão do seu ciclo celular em condições de carência de nitrogênio ou carbono, apresentar sensores, transportadores e vias metabólicas para aproveitamento de metabólitos derivados da degradação de plantas e a uma rede de sensores que permitem sua adaptação a otimizar a capacidade respiratória sobre uma ampla gama de diferentes concentrações de oxigênio (Laub et al., 2007).

Assim, a adaptação a ambiente pobre em nutrientes é devida à capacidade genética de *C. crescentus* (Nierman et al., 2010), que apresenta 65 genes que codificam proteínas que participam do transporte dependente de energia através da membrana externa, isto é mais que qualquer microorganismo caracterizado, 45 genes que codificam transportadores (com cassete que liga ATP). Este mecanismo de transporte utilizando canais de membrana externa específicos para o substrato, e transportadores de membrana interna de baixa afinidade, parece ser essencial no processo de sobrevivência em meio limitado de nutrientes. O equilíbrio de metabólitos em *C. crescentus* é regulado por sistemas de efluxo de aminoácidos e sistemas de efluxo tipo íon metais da família RND. Genes para quimiotaxia, degradação de celulose, xileno, lignina, glucano, pectina e genes transportadores de açúcares, são importantes para diversificar a utilização de metabólitos.

C. crescentus é utilizada como modelo para estudos de diferenciação celular, divisão celular assimétrica, coordenação e progressão do ciclo celular e resistência a diversas condições de estresse (Laub et al., 2000; Jenal, 2000). Embora o ciclo celular esteja sendo muito estudado, foram caracterizados poucos genes envolvidos na resposta às condições do meio ambiente, que fornecem a *C. crescentus* a capacidade de obter uma melhor adaptação ou resposta a diferentes estresses.

Fatores sigma da subfamília ECF (*extracytoplasmic function*) são importantes reguladores da resposta a estresse em bactérias. A determinação da sequência completa do genoma de *C. crescentus* mostrou a existência de 13 fatores ECF, que tipicamente promovem mudanças na expressão gênica quando são ativados por estímulos periplasmáticos ou extracelulares (Nierman et al., 2001). Lourenço et al. (2011) descreve o mecanismo molecular envolvido no controle geral da resposta a estresse em *C. crescentus*, identificando o ECF fator sigma $\sigma(T)$ como o regulador mestre deste mecanismo o qual controla a expressão do seu paralog $\sigma(U)$ e é regulado em sua expressão e função por PhyR e NepR. O fator sigma σ^E , é encontrado em níveis reduzidos, devido a ação do gene *chrR*, que é um regulador negativo do gene *rpoE*. Quando a célula é exposta a Cd^{2+} , hidróperóxidos orgânicos, íon superóxido e radiação ultravioleta, a transcrição de *rpoE* é induzida de uma maneira dependente de sigma σ^E (Lourenço et al., 2009).

O ECF fator sigma sigT (CC3475) é importante para resposta estresse osmótica e oxidativa, análise de microarranjo mostrou que tem função geral em resposta a estresse, regulando genes que codificam proteínas reguladoras (sigU e sigR), proteínas OmpA, proteína CC2722, entre outras (Alvarez-Martinez et al., 2007). O gene CC2722 codifica uma proteína de fusão a membrana (MFP) componente de uma bomba de efluxo, que é induzido

por cádmio e zinco e sua ausência torna a célula sensível a estes metais (Braz and Marques, 2005; Hu et al., 2005). Em *Xanthomonas campestris*, foi observada que adição inicial de baixa concentração de íon cádmio têm um efeito protetor (resistência cruzada) na presença de peróxido de hidrogênio e ter butil hidroperóxidos, devido a que induz a expressão dos genes *oxyR* e *ohrR*, que regulam a resposta a condições de estresse oxidativo em bactérias, desta maneira aumenta a resistência a estes agentes oxidantes (Banjerdikij et al, 2005).

C. crescentus é encontrada em praticamente todos os ambientes aquáticos, sendo sensível a substâncias tóxicas presentes no meio e, devido a seu crescimento lento, poderia ser utilizada como biosensor para detecção de substâncias tóxicas, como metais em excesso (Tada e Inoue, 2000). Andreazza et al., (2011) ao estudar os efeitos da biolixiviação de cobre sobre uma comunidade microbiana no solo e resíduos de mineiros de um vinhedo identificou uma grande diversidade de microorganismos, entre eles *C. vivroides* (sinônimo de *C. crescentus*), demonstrando que esta bactéria está em constante adaptação ao igual que outros microorganismos.

Hillson et al., (2007) modificaram, por engenharia genética, a linhagem de *C. crescentus* CB15N expressando o gene repórter GFP (*green- fluorescent protein*), sob o controle do promotor *urcA*. Esta linhagem produz a proteína verde fluorescente excitada pela luz ultravioleta, na presença de íons urânio, sendo capaz de discriminar o meio contaminado (4.2 μM urânio) do não contaminado ($< 0.1 \mu\text{M}$ urânio), demonstrando a utilização de *C. crescentus* como biosensor de urânio. Patel et al (2010), modificaram a linhagem recombinante *C. crescentus* JS4022/p723-6H, expressando em sua superfície o produto do gene RsaA contendo um peptídeo de 6 histidinas (6xHis). Quando a cepa recombinante é misturada com 1 ppm de cloreto de cádmio, a cepa sequestra entre 94,3 - 99% do metal em 15 minutos. Xu et al (2010) adicionaram ao meio de cultura da cepa JS4022/p723-6H, 0,3% de cloreto de cálcio, e obtiveram assim células com maior capacidade de sequestro do metal, resistente a presença de quelantes e tolerante a condições ácidas.

Na análise computacional realizada por Nies (2003), para identificar no genoma de 64 procariotos famílias de proteínas que exportam metais, foram identificadas proteínas do sistema RND HME1 (CC2390) que conferem resistência a Zn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} e HME2 (CC2724) que conferem resistência a Ni^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , no genoma de *C. crescentus*. Braz e Marques (2005) isolaram linhagens mutantes de *C. crescentus* sensíveis a cádmio cujos genes interrompidos pelo transposon Tn5Km2lacZ, permitiram identificar um putativo regulador de transcrição da família BlaI, o gene CC1640. A linhagem mutante neste gene, além da sensibilidade a cádmio, mostrou sensibilidade a zinco. Outras linhagens mutantes, obtidas

pela inserção de Tn5Km2*lacZ* nos genes CC2720, CC2722 e CC2724 (genes pertencem ao sistema de efluxo da família RND) mostraram o mesmo padrão de sensibilidade em resposta a cádmio. Por outro lado, Hu et al., (2005), através da análise de microarranjos de DNA, identificaram em *C. crescentus* genes induzidos por quatro metais (cromo, cádmio, selênio e urânio), sendo 144 genes induzidos por cádmio, entre os quais temos CC2720, CC2722 e CC2724, 48 genes induzidos por Urânio entre eles CC1638, 214 genes induzidos por cromo, dentre os quais o gene CC1640. Em todos estes trabalhos foram encontrados genes para resposta a metais, algumas proteínas hipotéticas, proteínas de sistemas de efluxo de cádmio e zinco, proteínas envolvidas com transdução de sinal e algumas proteínas envolvidas em regulação.

Além de genes envolvidos na resistência a metais, também têm sido identificados em *C. crescentus* genes envolvidos na resistência a antibióticos, como o gene *mbl1b* que codifica uma metalo β -lactamase de 29 kD identificado na linhagem 101123 (Simm et al., 2001), o gene CC2139 que codifica uma metalo β -lactamase, denominada blaCAU-1 (Docquier et al., 2002) e 14 proteínas que ligam penicilina (PBPs), relacionadas com antibióticos β -lactâmicos (Nathan, et al., 1988).

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é caracterizar três agrupamentos gênicos potencialmente envolvidos na resistência a metais e antibióticos em *Caulobacter crescentus*.

Os objetivos mais específicos deste estudo são:

2.1 Caracterizar o agrupamento gênico CC1637 – CC1640 de *C. crescentus*.

Através das seguintes abordagens :

- a. Determinar o padrão de expressão dos genes CC1637- CC1640, na presença de metais (Cd^{2+} e Zn^{2+}), agente oxidante (H_2O_2) e antibióticos β -lactâmicos.
- b. Obter e realizar análises fenotípicas de linhagens mutantes, na presença de metais (Cd^{2+} e Zn^{2+}), agentes oxidantes (H_2O_2 e tert-butil hidroperóxido), e antibióticos β -lactâmicos.
- c. Estudar se a regulação transcricional do cluster e sua dependência do regulador de transcrição da família BlaI (CC1640).

2.2 Comparar dois sistemas de efluxo da família RND constituídos pelos genes CC2720-CC2722-CC2724 e CC2388-CC2389- CC2390, que codificam potenciais sistemas de efluxo de resistência a metais Cd^{2+} , Zn^{2+} e Co^{2+} .

Para tanto pretendemos:

- a. Analisar o padrão de expressão dos genes em estudo na presença de metais pesados, como Cd^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} e Ni^{2+} .
- b. Obter linhagens mutantes para os genes CC2724 e CC2390 e realizar análise fenotípica, assim como a complementação dos mesmos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Técnicas gerais de biologia molecular

Extração e eletroforeses de DNA, RNA, proteínas, e outros procedimentos e técnicas comumente utilizadas foram realizadas segundo descrito por Sambrook *et al.* (1989), Ausubel *et al.* (1992) ou, ainda, de acordo com protocolos específicos fornecidos com produtos, equipamentos e kits utilizados.

3.2 Linhagens bacterianas e condições de cultura

As linhagens derivadas de *Caulobacter crescentus* NA1000 (Evinger *et al.*, 1977) foram cultivadas a 30 °C em meio PYE (peptona 2 g/L, extrato de levedura 1 g/L, MgSO₄ 0,2 g/L, CaCl₂ 0,5 mM) (Ely, 1991) ou meio mínimo M2-glicose (Na₂HPO₄ 0,5 g/L, KH₂PO₄ 1,74 g/L, NH₄Cl 1,06 g/L, FeSO₄ 10 uM, glicose 0,2 %, MgSO₄ 1 mM, CaCl₂ 0,5 mM, EDTA 1 mM, pH 6,9) (Ely, 1991). Quando necessário, os meios foram suplementadas com ácido nalidíxico (20 µg/mL), tetraciclina (1 µg/mL) ou canamicina (5 µg/mL).

Linhagens de *E. coli* (S17-1λpi, DH5α e BL21-DE3), foram cultivadas a 37 °C, em meio de cultura Luria-Bertani (LB, triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7,4). Quando necessário, os meios foram suplementados com tetraciclina (12,5 µg/mL), canamicina (50 µg/mL) ou ampicilina (100 µg/mL). Os meios sólidos contêm 1,5% de ágar-ágar.

A Tabela 2 mostra as linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho.

3.3 Oligonucleotídeos utilizados

Os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho estão listados na Tabela 3.

3.4 Plasmídeos utilizados

Os plasmídeos utilizados neste trabalho estão listados na Tabela 4.

Tabela 2 - Linhagens bacterianas

Microorganismo	Linhagem	Genótipo e/ou fenótipo	Referência
<i>Escherichia coli</i>	S17-1 λ pi	294::RP42(TC::Mu) (Km::Tn7)	Simon <i>et al.</i> , 1983.
	DH5 α	<i>Sup E44</i> Δ <i>lacU169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17 recA1</i> <i>endA1 gyrA96 thi-1 realA1</i>	Hanahan, 1983.
	BL21 (DE3)	<i>fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm]</i> <i>ΔhsdS</i> λ DE3 = λ <i>sBamHI</i> Δ <i>EcoRI-B</i> <i>int::(lacI:: PlacUV5::T7 gene1) i21</i> <i>Δnin5</i>	Novagen, Madison, Wisconsi, USA.
<i>Caulobacter crescentus</i>	NA1000	Linhagem padrão.	Evinger <i>et al.</i> , 1977.
	NA1000p1638 <i>lacZ</i>	NA1000 portando pRK <i>LacZ</i> 290 com promotor do gene CC1638.	Este trabalho.
	NA1000p2720 <i>lacZ</i>	NA1000 portando pRK <i>lacZ</i> 290 com promotor do gene CC2720.	Este trabalho.
	NA1000p2721 <i>lacZ</i>	NA1000 portando pRK <i>lacZ</i> 290 com promotor do gene CC2721.	Este trabalho.
	NA1000p2388 <i>lacZ</i>	NA1000 portando pRK <i>lacZ</i> 290 com promotor do gene CC2388.	Braz, 2006.
	NA1000p1640 <i>lacZ</i>	NA1000 portando pRK <i>lacZ</i> 290 com promotor do gene CC1640.	Vânia Santos Braz.
	Δ CC1634	NA1000 com gene CC1634 deletado.	Este trabalho.
	Δ CC1637	NA1000 com gene CC1637 deletado.	Este trabalho.
	Δ CC1638	NA1000 com gene CC1638 deletado.	Este trabalho.
	Δ CC1639	NA1000 com gene CC1639 deletado.	Vânia Santos Braz.
	Δ CC1640	NA1000 com gene CC1640 deletado.	Emerson de Souza Santos.
	Δ CC2724	NA1000 com gene CC2724 deletado.	Este trabalho.
	Δ CC2390	NA1000 com gene CC2390 deletado.	Este trabalho.
	Δ CC2724 Δ CC2390	NA1000 com gene CC27240 e CC2390 deletados.	Este trabalho.
	Δ CC2724 pNPT228XNE/CC2724	NA1000 Δ CC2724 contendo o gene CC2724 integrado á jusante do promotor do gene de xilose para estudo de complementação.	Este trabalho.
	Δ CC2390 pNPT228XNE/CC2390	NA1000 Δ CC2390 contendo o gene CC2390 integrado á jusante do promotor do gene de xilose para estudo de complementação.	Este trabalho.

Fonte: Valencia, EY. (2012).

Tabela 3 - Oligonucleotídeos utilizados

Oligonucleotídeo	Seqüência (5' – 3')	TM*/amplicon (pb)	Finalidade
1-prom1638F 2-prom1638R	CGGAATTCGAAGTACCTTGTCGAG CGGGATCCCAAATGGCTGGCGTC	43 °C/363	Obtenção da região promotora do gene CC1638, contém sítios de restrição <i>EcoRI</i> e <i>BamHI</i>
3-prom1640F 4-prom1640R	GGAATTCGAAGACCACCTCGAACG CGGGATCCTTCCATGAGCGAACGATTAC	55 °C/307	Obtenção da região promotora do gene CC1640, contém sítios de restrição <i>EcoRI</i> e <i>BamHI</i>
5-prom2720F 6-prom2720R	GGAATTCGCGATTGGCTAACGG CAAGCTTGACCAACGCAACCAAG	45 °C/454	Obtenção da região promotora do gene CC2720, contém sítios de restrição <i>EcoRI</i> e <i>HindIII</i>
7-prom2721F 8-prom2721R	GGAATTCGCCATCTGCGCCAACGATT CAAGCTTCTCATGAAGCCTAGAG	45 °C/430	Obtenção da região promotora do gene CC2721, contém sítios de restrição <i>EcoRI</i> e <i>HindIII</i> . Amplificação por RT-PCR para verificação da co-transcrição dos genes CC2720-CC2721
9-Cod1637-1 10-Cod1638-1	GCGGTGTCGCCAGGATGGG GGTCGACTGCATGAGGCGAACAA	60 °C/304	Amplificação por RT-PCR para verificar se os genes CC1637 e CC1638 são co-transcritos.
11-Cod1638-2 12-Cod1639-1	GATAATCACCAGATCGGCTTCCAAATGG AGGCCAATCCTGGGGAAATGCG	60 °C/340	Amplificação por RT-PCR para verificar se os genes CC1638 e CC1639 são co-transcritos.
13-BlaR1FC 14-BlaR1RC 15-BlaR12RC	CCGGAATTCCTGCAGGTCGAGCGACAA CCGCTCGAGATGGCGACGGCGGTTCG CAAGCTTATGGCGACGGCGGTTCG	53 °C/507	Amplificação do domínio peptidase do gene CC1639 com sítios de restrição <i>EcoRI</i> / <i>XhoI</i> ou <i>EcoRI</i> / <i>HindIII</i>
16-M13 <i>Forward</i> (-20) 17-M13 <i>Reverse</i>	GTAAAACGACGGCCAG CAGGAAACAGCTATGAC	55 °C/150	Amplificação para verificar a clonagem do inserto no vetor pRK <i>lacZ</i> 290 (sem inserto amplifica 150 pb).

continua

continuação

Oligonucleotídeo	Seqüência (5' – 3')	TM*/amplicon (pb)	Finalidade
18-del1637-1	ACTGCAGCCGCAAGCGGGGAGAACTGTAATG	65 °C/1226	Amplificação das regiões que flanqueiam o gene CC1637 para deleção do mesmo. Substituição do gene por sítio de <i>Pst</i> I e clonagem com sítios <i>Hind</i> III e <i>Eco</i> RI.
19-del1637-2	ACTGCAGCTAGAGTGTGCGCCCCGTG		
20-del1637-3	ACTGCAGGCTCAGGCTGCCTTCTTCTCGGATTTC	60 °C/953	
21-del1637-4	CGGAATTCCCAATATCGACGTCTATCTCTATGCC		
22- del1638-1	GGAAGATGTTTGTGGCGTCGATC	65 °C/894	Amplificação das regiões que flanqueiam o gene CC1638 para deleção do mesmo. Substituição do gene por sítio de <i>Eco</i> RI e clonagem com sítio <i>Bam</i> HI e <i>Mlu</i> I.
23 –del1638-2	GGAATTCCACCTGAAATCCGAGAAGAAGGC		
24- del1638-3	GGAATTCCTAGTCGCGAGCGCCTCGGCT	65 °C/863	
25- del1638-4	CGACGCGTGTCTGTTCAATCCGTTTCGTCC		
26-del1634-1	CAAGCTTCCTTCGCTTTGCAGGGCGATATAG	60 °C/945	Amplificação das regiões que flanqueiam o gene CC1634 para deleção do mesmo. Substituição do gene por sítio de <i>Pst</i> I e clonagem com sítio <i>Hind</i> III e <i>Eco</i> RI
27-del1634-2	ACTGCAGGTTTCGCTCCCTTCGCAGT		
28-del1634-3	ACTGCAGCCGCAAGCGGGGAGAACTGTAATG	65 °C/1005	
29-del1634-4	GGAATTCGCCCTTGTTGCTGCCCTTCT		
30-del2724-1	CAAGCTTCATCCTCACCTGAGACAA	45 °C/785	Amplificação das regiões que flanqueiam o gene CC2724 para deleção do mesmo. Substituição do gene por sítio de <i>Eco</i> RI e clonagem com sítio <i>Hind</i> III e <i>Mlu</i> I.
31-del2724-2	GGAATTCAGAGATCCAAGATCCTG		
32-del2724-3	GGAATTCGATCTGCCGGTTCGTCCTG	54°C/752	
33-del2724-4	CGACGCGTTAGCCTCTTTCAATGTGAAGAC		
34-del2390-1	CAAGCTTCTACCAAGGGCGGTCGCAT	54 °C/870	Amplificação das regiões que flanqueiam o gene CC2390 para deleção do mesmo. Substituição do gene por sítio de <i>Bam</i> HI e clonagem com sítio <i>Hind</i> III e <i>Mlu</i> I.
35-del2390-2	GGGATCCTGGTCGCCTCCCTAATGGT		
36-del2390-3	GGGATCCCATTTGAGCCTCCGCCAGCT	45 °C/654	
37-del2390-4	CGACGCGTCTATAGTACCATCGCAATAC		
38-del2724-2F	CATGCGCGGAGACGGACCG		Amplificação para verificar a deleção do gene CC2724.
39-del2390-2F	CGGACATTGAAAAGTCCCGCGC		Amplificação para verificar a deleção do gene CC2390.

continua

continuação

Oligonucleotídeo	Seqüência (5' – 3')	TM*/amplicon (pb)	Finalidade
40- Comp-2724F 41- Comp-2724R	GACTAGTATGATCGGCAGGATCTTGGAT GACTAGTTTAGGCTCCTTGCTCTTGA	50 °C/3243	Amplificação da região codificadora do gene CC2724 para complementação do mesmo gene. Produto com sítios de restrição <i>SpeI</i> .
42- Comp-2390F 43- Comp-2390R	GGAATTCATGCTTGAACGCATCATCGCC GACTAGTCTATCGTACCGCCCTGGCTTG	54 °C/3132	Amplificação da região codificadora do gene CC2390 para complementação do mesmo gene. Produto com sítios de restrição <i>EcoRI</i> e <i>SpeI</i> .
44-1230F 45-1230R	GTCCTTTCGCTGATGACCCTGAT CATAGGTCCCCATCACCAGATC	54 °C/331	Amplificação por RT-PCR para verificar a expressão do gene CC1230.
46-1568F 47-1568R	CGTCGGCTTCTCGGCCGAGGGGCTG GACCGTGTCAAACGATCCGTC	54 °C/340	Amplificação por RT-PCR para verificar a expressão do gene CC1568.
48-2661F 49-2661R	GAGCAGTCGCTGGCCGCGCACTAC CAGCGGGATCAAAATGCGGG	54 °C/366	Amplificação por RT-PCR para verificar a expressão do gene CC2661.
50- CspD-F 51- CspD-R	TGGTTACGATTTTGAGGACG GTTGAACCATTTACACCTTGG	54 °C/400	Amplificação por RT-PCR para utilizar este gene como controle de expressão em fase estacionária.

*TM =temperatura de anelamento utilizado na reação de PCR.

Fonte: Valencia, EY. (2012).

Tabela 4 - Plasmídeos utilizados

Plasmídeo	Características	Fonte ou referência
pGEM-T Easy	Vetor de clonagem, Ap ^r	Promega, Co, Madison, Wisconsin USA.
pNPTS138	Replicon ColE1, <i>oriT</i> , <i>npt</i> , (Km ^r), <i>sacB</i>	D. Alley.
pNPT228XNE	Plasmídeo utilizado para complementação, por integração no locus do gene para utilização de xilose. ColE1, <i>oriT</i> , (Km ^r).	Jenal <i>et al.</i> , 1998
pRKlacZ290	Vetor de fusão de transcrição <i>lacZ</i> , Tc ^r , replicon IncPI, <i>oriT</i>	Gober and Shapiro, 1992.
pPROEX-HTa	Vetor de expressão que adiciona 6 resíduos de histidina à extremidade amino-terminal da proteína a ser expressada, Ap ^r .	Invitrogen, Carlsbad, California, USA.
pET-28a	Vetor de expressão que adiciona 6 resíduos de histidina à extremidade amino-terminal da proteína a ser expressada, Km ^r .	Novagen, Madison, Wisconsin, USA.
p1638 <i>lacZ</i>	pRKlacZ290 contendo a região promotora (363 pb) do gene CC1638	Este trabalho.
p1640 <i>lacZ</i>	pRKlacZ290 contendo a região promotora (307 pb) do gene CC1640	Vânia Santos Braz.
p2720 <i>lacZ</i>	pRKlacZ290 contendo a região promotora (454 pb) do gene CC2720	Este trabalho.
p2721 <i>lacZ</i>	pRKlacZ290 contendo a região promotora (430 pb) do gene CC2721	Este trabalho.
p2388 <i>lacZ</i>	pRKlacZ290 contendo a região promotora (863 pb) do gene CC2388	Braz, 2006.
Del1634A/B pNPTS138	Vetor pNPTS138 contendo as 2 regiões flangeadoras do gene CC1634 a ser deletado	Este trabalho
Del1637-A/B pNPTS138	Vetor pNPTS138 contendo as 2 regiões flangeadoras do gene CC1637 a ser deletado	Este trabalho.
Del1638-A/B pNPTS138	Vetor pNPTS138 contendo as 2 regiões flangeadoras do gene CC1638 a ser deletado	Este trabalho.
Del1639-A/B pNPTS138	Vetor pNPTS138 contendo as 2 regiões flangeadoras do gene CC1639 a ser deletado.	Vânia Santos Braz.
Del1640-A/B pNPTS138	Vetor pNPTS138 contendo as 2 regiões flangeadoras do gene CC1640 a ser deletado.	Emerson de Souza Santos.
Del2724-A/B pNPTS138	Vetor pNPTS138 contendo as 2 regiões flangeadoras do gene CC2724 a ser deletado.	Este trabalho.
Del2390-A/B pNPTS138	Vetor pNPTS138 contendo as 2 regiões flangeadoras do gene CC2390 a ser deletado.	Este trabalho.
Comp2724-pNPT228XNE	Vetor pNPT228XNE contendo a região codificadora do gene CC2724 a ser utilizado em estudo de complementação.	Este trabalho.
Comp2390-pNPT228XNE	Vetor pNPT228XNE contendo a região codificadora do gene CC2390 a ser utilizado em estudo de complementação.	Este trabalho.
DomPep-pPROEX Hta	Vetor pPROEX-HTa contendo a região codificadora do domínio peptidase do gene CC1639.	Este trabalho.
DomPep-pet28a	Vetor pET-28a contendo a região codificadora do domínio peptidase do gene CC1639	Este trabalho.

Ap^r: resistência a ampicilina; Km^r: resistência a canamicina; Tc^r, resistência à tetraciclina.

Fonte: Valencia, E. Y. (2012).

3.5 Amplificação e clonagens dos genes em estudo

3.5.1 Minipreparação de DNA genômico (gDNA)

O DNA genômico foi preparado como descrito por Chen e Kuo (1993). Células de *C. crescentus* NA1000 foram inoculadas em 3 mL de PYE por 16 horas/250 rpm e incubadas a 30 °C. A cultura foi centrifugada a 12000 x g por 5 minutos em tubos Eppendorf e as células foram suspendidas em 200 µL de tampão de lise (Tris-acetato 40 mM pH 7,8 /acetato de sódio 20 mM/EDTA 1 mM/SDS 1%). Posteriormente foram adicionados 66 µL de NaCl 5M, seguido de agitação e a mistura foi centrifugada a 12000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo ao qual se adicionou o mesmo volume de clorofórmio. O tubo foi invertido gentilmente, até a mistura ficar leitosa, sem apresentar separação de fases. A mistura foi centrifugada a 12000 x g por 3 minutos a 4 °C, ao sobrenadante foi adicionando 2,5 vezes o volume de etanol absoluto gelado, e em seguida o tubo foi centrifugado a 12000 x g por 10 minutos a 4 °C. O DNA precipitado foi lavado por duas vezes com etanol 70% e finalmente ressuspendido em 50 µL de tampão TE (Tris-HCl pH 8,0 10 mM/EDTA pH 8,0 1 mM) contendo RNase A (20 µg/mL). A preparação do gDNA foi utilizado como molde para amplificar os genes de interesse através da técnica de PCR.

3.5.2 Reação de PCR e clonagem das regiões em estudo

Reações de PCR (utilizando o termociclador *Gene Amp PCR System* 2400 de *Applied Biosystems*, Carlsbad, California, USA), foram realizadas para obter fragmentos de DNA de regiões codificadoras, promotoras e intergênicas, para verificação de clonagens e análise de deleção de genes.

A amplificação dos fragmentos de DNA em estudo foi realizada utilizando 0,5 µg de DNA genômico de *Caulobacter crescentus* NA1000, 1,25 Unidades da enzima Platinum *Pfx* DNA polimerase (Invitrogen), dNTPs 0,3 mM, tampão para enzima, sulfato de magnésio 1 mM, DMSO (dimetilsulfóxido) 2,5%, oligonucleotídeo *forward* 0,3 µM e oligonucleotídeo *reverse* 0,3 µM. As condições de PCR foram as seguintes: 1 ciclo de desnaturação a 94 °C por 5 minutos; 30 ciclos de 94 °C (desnaturação) por 30 segundos, Temperatura em °C de acordo ao TM de cada oligonucleotídeo (ver tabela 3) por 30 segundos e 68 °C (extensão) de 1 minuto por kb (tamanho do fragmento); 1 ciclo de 72 °C (extensão) por 5 minutos e manutenção a 4 °C.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão de corrida TBE 1X pH 8.5 (Tris base 90 mM/ácido bórico 88 mM/EDTA 0,1 mM),

utilizando como marcador de peso molecular 1kb plus DNA *ladder* (Invitrogen,) ou 1 kb DNA *ladder plus* (Fermentas, Glen Burnie, Maryland, USA). O gel foi corado com uma solução de brometo de etídio 1 µg/mL (Sigma, USA), visualizado em um transiluminador de luz UV Gel-Doc 1000 (Bio Rad, Benicia, California, USA). As reações de amplificação foram purificadas com o QIAquick PCR purification Kit (Qiagen, Valencia, California, USA). Aos fragmentos de DNA foram adicionadas uma adenina utilizando 1,25 Unidades *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 1X tampão *Taq*, cloreto de magnésio 0,50 mM e dATP 0.5 mM, a mistura foi incubada a 70 °C por 30 minutos e posteriormente 5 µL desta reação foram utilizadas para ligação no vetor pGEM T-Easy (Promega), seguindo instruções do fabricante.

3.5.3 Transformação de *Escherichia coli* DH5α por eletroporação

As bactérias eletrocompetentes foram preparadas seguindo o procedimento descrito por Ausubel *et al* (1992). Uma cultura da linhagem *E. coli* DH5α em meio LB, foi incubada a 37 °C/250 rpm até atingir uma DO₆₀₀ entre 0,5-0,6. A cultura foi colocada em gelo por 15 minutos, e centrifugada a 5000 x g a 4 °C por 30 minutos. As células foram ressuspensas em 100 mL de água MilliQ estéril gelada os quais foram centrifugadas novamente a 5000 x g por 30 minutos a 4 °C (este último passo foi repetido por duas vezes). As células foram ressuspensas em 5 mL de glicerol 10% gelado, e levadas a centrifugar por 10 minutos a 5000 x g a 4 °C e ressuspensas novamente em 500 µL de glicerol 10% gelado. As células foram distribuídas em alíquotas de 50 µL, congeladas em gelo seco e armazenadas a -80 °C.

Na transformação, foram utilizados 50 µL de bactéria e 1 µL da ligação. Esta mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação gelada e submetida a choque de 200Ω, 25 µF e 1,8 kV. As células foram transferidas para tubos de vidro estéreis contendo 1 mL de meio LB e incubadas a 37 °C com rotação constante de 250 rpm. Após 1 hora as culturas foram semeadas em meio LB ágar contendo ampicilina 100 µg/mL, X-gal 80 µg/mL, IPTG 0,5 mM e incubadas a 37 °C.

3.5.4 Minipreparação de DNA plasmidial

O DNA plasmidial foi preparado segundo o método de lise alcalina (Ausubel *et al.*, 1992). Após a transformação de *E. coli* DH5α com vetor pGEM-T Easy, foram identificadas colônias brancas que continham os insertos clonados de interesse. Estas colônias foram inoculadas em 3 mL de meio LB contendo ampicilina, durante 16 horas a 37 °C com agitação constante de 250 rpm.

Após 16 horas de incubação, as culturas foram transferidas para tubos Eppendorf e centrifugadas por 5 minutos a 12000 x g. A seguir, as células foram ressuspensas em 100 µL de solução I (glicose 50mM/EDTA 10 mM/Tris-HCl 25 mM pH 8,0), e em seguida foram adicionados 200 µL de solução II (NaOH 0,2 N/SDS 1%). A mistura foi homogeneizada por inversão, e após ser homogeneizada foram adicionados 150 µL de solução III (acetato de potássio 3 M/ácido acético glacial 11,5 %) e agitou-se por 10 segundos. Os tubos foram centrifugados por 8 minutos a 12000 x g. O sobrenadante foi transferido para tubo novo e foi adicionado o mesmo volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), centrifugando-se por 5 minutos a 12000 x g. A fase aquosa foi precipitada com 2,5 volumes de etanol absoluto gelado, deixando-se em gelo, e após 5 minutos centrifugou-se por 15 minutos a 12000 x g a 4 °C. Os precipitados foram lavados com 500 µL de etanol 70% e centrifugados por 5 minutos a 12000 x g a 4 °C, secos a temperatura ambiente e ressuspensos em 50 µL de TE contendo 20 µg/mL de RNase A. Após a preparação do DNA plasmidial verificou-se a clonagem do inserto, através de digestão com enzimas de restrição e eletroforeses em gel de agarose 1%.

3.5.5 Sequenciamento e análises de seqüências

Confirmada a clonagem do fragmento de DNA no vetor pGEM-T Easy, o DNA plasmidial foi preparado utilizando o kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), para a reação de sequenciamento.

Aproximadamente 1 µg de DNA plasmidial foi transferido para um microtubo contendo 3,2 pmol de um dos oligonucleotídeos (M13 *forward* (-20) ou M13 *reverse*; ou oligonucleotídeos internos do inserto), tampão 1X e 1 µL do BigDye Terminator v3.1 *Cycle sequencing Mix* (Applied Biosystems), em um volume final de 10 µL. As reações de PCR para o sequenciamento foram realizadas através da seguinte rotina: 95 °C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 52 °C por 30 segundos e 60 °C por 4 minutos, no termociclador Gene Amp PCR System 2400 (Applied Biosystems).

Os 10 µL de cada reação foram precipitados, por adição de 50 µL de isopropanol 75% e em seguida, os tubos foram centrifugados por 50 minutos a 1500 x g a 20 °C. Os precipitados foram lavados por duas vezes com etanol 70% e centrifugados a 1500 x g a 20 °C. O DNA foi seco a temperatura ambiente, protegido da luz (cobrindo os precipitados com papel metálico) e ressuspendido em 10 µL de formamida deionizada. As amostras foram deixadas por 2 horas em temperatura ambiente ou por 16 horas a 4 °C, depois foram desnaturadas por calor para serem aplicadas no aparelho de sequenciamento ABI-377-36

Autosequencer (Perkin-Elmer Biosystem Foster City, California, USA) do serviço de sequenciamento do Instituto de química da universidade de são Paulo (IQUSP). A análise da seqüência foi realizada através da comparação com a base de dados do GenBank (NCBI, USA), utilizando o pacote de programas BLAST (Altschul *et al.*, 1990).

3.6 Análises da expressão dos genes CC1638, CC1640, CC2720, CC2721 e CC2388

3.6.1 Construção dos vetores *p1638lacZ*, *p2720lacZ* e *p2721lacZ*

Para o estudo de expressão utilizamos fusão de transcrição do promotor ao gene repórter *lacZ* (que codifica a enzima β -galactosidase), presente no plasmídeo pRK*lacZ*290 (Gober e Shapiro, 1992) (Figura 4). Na clonagem, foi utilizado um par de oligonucleotídeos específicos, contendo sítios para as enzimas de restrição *EcoRI*, *BamHI* ou *HindIII* como descrito na Tabela 3. As regiões promotoras dos genes CC1638, CC2720 e CC2721 foram subclonadas no vetor pRK*lacZ*290 à montante da região codificadora do gene repórter *lacZ*. A clonagem foi verificada por PCR, utilizando os oligonucleotídeos específicos M13 *reverse* e M13-*Forward* (-20) (Tabela 3), na qual o produto de PCR do vetor sem inserto tem um tamanho de 150 pb. Os vetores *p1640lacZ* e *p2388lacZ* (Tabela 4) foram construídos anteriormente em nosso laboratório e cedidos para o estudo.

Figura 4 - Construção do vetor para análise da região promotora\ A região promotora dos genes em estudo foi clonada à montante do gene repórter *lacZ* do vetor pRK*lacZ*290. F e R = Orientação dos oligonucleotídeos que se referem *forward* e *reverse*, respectivamente.

Fonte: Valencia, EY (2012).

3.6.2 Conjugação de *Caulobacter crescentus* e *Escherichia coli*.

Após a clonagem de cada promotor no vetor pRK*lacZ*290, o plasmídeo foi inserido por eletroporação na linhagem doadora *E. coli* S17-1 (como descrito no item 3.5.3), sensível a ácido nalidíxico e portadora de *oriT* (Simon *et al.*, 1983), que transfere por conjugação o plasmídeo à linhagem receptora NA1000 de *C. crescentus*. As duas linhagens foram misturadas em placa contendo meio PYE e incubadas por 16-18 horas a 30 °C, para permitir a conjugação. Posteriormente, a seleção foi feita em placas PYE ágar contendo ácido nalidíxico (20 µg/mL) e tetraciclina (1 µg/mL), condição na qual só devem crescer a linhagem NA1000 (resistentes a ácido nalidíxico) levando o plasmídeo pRK*lacZ*290 (contendo o promotor em estudo), com marca de resistência a tetraciclina. As placas foram incubadas a 30 °C durante 3 dias.

3.6.3 Análise da atividade transcricional dos promotores em estudo

Para medir a atividade transcricional (repressão ou ativação) dos promotores em estudo, utilizamos o ensaio de atividade do gene repórter *lacZ*, segundo o método descrito por Miller (1972). No ensaio de atividade da enzima β -galactosidase, a amostra é incubada por 5 minutos com 800 μ L de tampão Z ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 60 mM/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 40 mM/KCl 100 mM/ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mM/ β -mercaptoetanol 50 mM), e 100 μ L de clorofórmio, agitada e incubada a 30 °C para romper as células e liberar as proteínas. Posteriormente foram adicionados 200 μ L do substrato ONPG (O-nitrofenil- β -D-galactosídeo, 4 mg/mL) e os tubos foram incubados por 5 minutos. A reação enzimática foi interrompida pela adição de 400 μ L de carbonato de cálcio (Na_2CO_3 1M), e então as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 12000 x g e a fase aquosa foi retirada para determinar a absorbância a 420 nm. As unidades de atividade β -galactosidase foram calculadas da seguinte forma:

$$\text{Unidades} = 1000 \times [A_{420} / T \times V \times A_{600}],$$

Onde T= minutos, e V= volume de cultura em mL.

Os ensaios foram realizados em triplicata.

a- Na presença de cátions divalentes e dicromato de potássio.

Após de 16 horas de incubação com rotação constante de 250 rpm em meio PYE ou meio mínimo M2-Glicose, culturas de cada linhagem (NA1000p1640*lacZ*, NA1000p2720*lacZ*, NA1000p2721*lacZ* e NA1000p2388*lacZ*), foram diluídas em novo meio de cultura para uma $\text{DO}_{600}=0,1$ e incubadas a 30 °C até atingir $\text{DO}_{600}= 0,5$ ou 0,6. Cada cultura foi dividida em duas alíquotas, uma para adicionar o metal em estudo (10 μ M ou 25 μ M CdCl_2 ; 50 μ M ou 100 μ M ZnCl_2 ; 50 μ M, 100 μ M, 150, 175 μ M ou 200 μ M CoCl_2 ; 27 μ M $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$; 50 μ M ou 100 μ M NiCl_2) e a outra como controle sem adicionar metal. Para os ensaios de atividade β -galactosidase, foram retiradas alíquotas de 100 μ L de cada amostra após 1, 2 e 3 horas de início da condição de estresse ou em 2, 4, 6, 24 e 48 horas segundo a condição de estresse a ser testada. Os valores das concentrações dos metais em estudo foram previamente determinados em nosso laboratório (Braz, 2006).

b- Na presença de agente oxidante (peróxido de hidrogênio)

O procedimento foi igual ao descrito anteriormente. O agente oxidante (peróxido de hidrogênio) a uma concentração de 60 μ M (valor estabelecido por anteriores trabalhos em nosso laboratório) foi adicionado às culturas e após 5, 15 e 30 minutos e 1 hora do estresse,

alíquotas foram retiradas para o ensaio de atividade de β -galactosidase. Este análise foi realizada para a linhagem NA1000p1640*lacZ*.

c- Na presença dos antibióticos cefalexina (CFE) e cefotaxima (CTX)

O procedimento foi realizado como descrito inicialmente (item a) utilizando M2-glicose como meio de cultura e as concentrações de antibióticos β -lactâmicos foram: 25, 30, 35 e 40 $\mu\text{g/mL}$ de CFE e 25, 35 e 45 $\mu\text{g/mL}$ de CTX. Após 3 e 24 horas na presença dos antibióticos, alíquotas foram retiradas para o ensaio de atividade da enzima β -galactosidase. Utilizou-se a linhagem NA1000p1640*lacZ* para este ensaio.

3.6.4 Análise da atividade transcricional dos genes CC1638 e CC1640, através do teste de difusão a partir de discos contendo antibióticos

A análise pretende determinar a atividade transcricional (repressão ou ativação) dos genes em estudo, em resposta a antibióticos, e não deve ser considerado como um teste de sensibilidade ou resistência a agentes antimicrobianos.

Na análise, foi utilizado o meio PYE-ágar (placas de 35 mm de diâmetro) e como substrato 30 $\mu\text{g/mL}$ de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo (X-gal). Foram testados 21 discos de antibióticos da marca CEFAR (São Paulo, SP, Brasil): 300 UI polimixina B (Pol), 30 μg tetraciclina (TET), 10 UI penicilina (PEN), 10 μg estreptomicina (EST), 30 μg amicacina (AMI), 5 μg rifampicina (RIF), 10 μg ampicilina (AMP), 30 μg canamicina (CAN), 110 μg piperacilina + tazobactam (PPT), 30 μg cefepima (CPM), 30 μg cefazolina (CFZ), 30 μg ceftazidima (CAZ), 30 μg cefalexina (CFE), 5 μg levofloxacino (LVX), 30 μg doxiciclina (DOX), 30 μg cloranfenicol (CLO), 30 μg cefotaxima (CTX), 85 μg ticarcilina (TIC), 30 μg cefoxitina (CFO), 35 μg sulfametoxazol (SUT), 110 μg espectinomicina (EPT).

Para descartar atividade enzimática basal de β -galactosidase do gene *lacA*, plasmídeos contendo as fusões dos promotores dos genes CC1638 (p1638*lacZ*) e CC1640 (pblal*lacZ*) foram inseridos, por conjugação com a bactéria *E. coli* S-17, na linhagem mutante *lacA* (ΔCC1634) de *C. crescentus*. As culturas foram crescidas com rotação constante de 250 rpm a 30 °C em meio PYE líquido por 16 h, e o inóculo foi preparado pelo método turbidimétrico, com turvação equivalente a 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Foi utilizando um *swab* estéril e descartável com haste de plástico da marca ABSORVE (Jiangsu Medical Materials Co. Ltda, Brasil), o qual foi submergido na suspensão bacteriana e, retirando o excesso de inóculo através da compressão do *swab* nas paredes do tubo, semeamos a placa

uniformemente em estrias, por rotações a cada 60 graus. No centro da placa foram colocados os discos contendo antibiótico ou distribuindo 2 ou 3 discos separados por uma distância de 3 cm. Após 24, 48 e 72 horas de incubação a 30 °C a leitura foi realizada, e considerou-se o resultado positivo quando observamos um anel azul ao redor do halo de inibição formado, devido à expressão e atividade da enzima β -galactosidase.

3.7 Ensaio de RT-PCR

Análises por RT-PCR foram utilizadas para determinar se os genes CC1637 - CC1638, CC1638 - CC1639 e CC2720-CC2721 são co-transcritos. Os pares de oligonucleotídeos 9-10, 11-12 e 7-8 respectivamente (Tabela 3), localizados na região codificadora de cada gene, foram empregados nesta análise.

3.7.1 *Extração de RNA por método de Trizol*

O RNA total da linhagem parental NA1000 foi obtido a partir de 10 mL de cultura DO₆₀₀ 1.0 em meio PYE com rotação constante de 250 rpm a 30 °C, que em seguida foram centrifugadas por 5 minutos, 9000 x g a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células foram lisadas em 1 mL de reagente Trizol (Invitrogen). O lisado foi incubado por 10 minutos a 65 °C e em seguida foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio. A mistura foi homogeneizada invertendo os tubos por 20 segundos, incubada a temperatura ambiente por 5 minutos, e em seguida centrifugada por 15 minutos a 12000 x g. A fase aquosa foi coletada e o RNA precipitado com adição de 0,5 mL de isopropanol, e incubado a -70 °C por 1 hora. Os tubos foram centrifugados por 20 minutos a 4 °C a 12000 x g, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70%. O precipitado foi seco por 30 minutos a temperatura ambiente, solubilizado com água MiliQ tratada com DEPC (dietilpirocarbonato) e o RNA foi quantificado utilizando o aparelho Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, USA).

3.7.2 *Amplificação por RT-PCR*

Para eliminar qualquer contaminação com DNA, o RNA foi tratado com a enzima RQ1 RNase-Free DNase (DNase I. Promega), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Previamente, reações de PCR com 1 e 2 µg de RNA, utilizando a enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), foram realizadas, para garantir que não há amplificação devido a presença de DNA (controle negativo).

Na reação de RT-PCR foi utilizado o kit SuperScript™ One-Step RT-PCR com *Taq* DNA Platinum polimerase (Invitrogen). As reações foram feitas com 2 µg de RNA, 10 pmol de cada par de oligonucleotídeo 9-10 ou 11-12 ou 7-8 (Tabela 3), 12,5 µL de 2x *Reaction Mix* (tampão contendo 0.4 mM de cada dNTP e 2.4 mM MgSO₄), 1 U de Super™ III RT/Platinum Script, em um volume total de 25 µL. As condições de RT-PCR foram: 55 °C por 30 minutos, para síntese de cDNA, seguido de 95 °C por 4 minutos, 30 ciclos de 95 °C de 30 segundos, 60 °C (oligonucleotídeos 9-10 e 11-12) ou 55 °C (oligonucleotídeos 7-8) por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto. Após os 30 ciclos a reação permaneceu a 72 °C por 7 minutos e em seguida a temperatura foi mantida a 4 °C. Como controle positivo de cada reação, os RNAs foram substituídos por DNA genômico da linhagem NA1000. Os fragmentos das reações de RT-PCR e PCR (controles positivos e negativos) foram visualizados em gel de agarose 1%.

3.8 Análise por RT-PCR semi-quantitativo

Para analisar se os genes CC1230, CC1568 e CC2661 eram regulados pelo gene CC1640, realizamos análises através da técnica de RT-PCR semi-quantitativo. RNA total (células crescidas em meio PYE com adição do antibiótico CFE 35 µg/mL) da linhagem NA1000 e linhagem mutante NA1000ΔCC1640 foi obtido como previamente descrito no item 3.7.1.

3.8.1 Síntese de cDNA

RNA total, tratado com a enzima DNAase I, foi quantificado e utilizado na reação. Para síntese da primeira fita de cDNA foi utilizado o kit *Super Script™ first strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen, USA). A reação de 20 µL de volume final contendo: RNA (0,25 µg), *random hexamers primer* (2,5 ng/µL), dNTPs (0,5 mM) e água mili Q, foi incubada a 65 °C por 5 minutos e logo após resfriada em gelo por 1 minuto. Imediatamente um novo mix foi adicionado contendo 1X RT *buffer*, MgCl₂ (5 mM), DTT (5 mM), *RNase OUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor* (3 Unidades) e 10 Unidades de enzima Superscript III RT. A reação foi incubada sequencialmente a 25 °C por 10 minutos, 50 °C por 50 minutos e 85 °C por 5 minutos. No final a reação foi mantida em gelo por alguns minutos e foram adicionados 1µL de RNase H (2 U/µL), incubando-se a 37 °C por 20 minutos para remover o RNA. As preparações de cDNA obtidas foram quantificadas e estocadas a -20 °C até o uso.

3.8.2 Amplificação do cDNA

O cDNA (1,2 µg) foi utilizado como molde em uma reação de PCR com volume final de 25 µL utilizando o kit de *Taq* DNA polimerase (Fermentas, USA) e 5 % de DMSO. Os oligonucleotídeos específicos a serem utilizados hibridam dentro da região codificadora de cada gene em estudo, e foram testados inicialmente e as condições de PCR padronizadas utilizando como molde gDNA da linhagem NA1000.

As condições de PCR foram 94 °C por 5 minutos, seguido de 25 ou 30 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 54 °C por 45 segundos e 72 °C por 1 minuto, com um ciclo final de 72 °C por 5 minutos e manutenção a 4 °C. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1% utilizando TBE 1X como tampão de corrida. As amostras foram coradas com brometo de etídio (10 µg/mL), visualizadas em transiluminador de luz UV e fotografadas em sistema de foto documentação The MultiDoc-It™ Imaging System (UVP, Upland, California, USA). A imagem foi analisada com o programa ImageJ (Capon *et al.*, 2004) e os dados obtidos foram apresentados como gráficos utilizando o programa Excel, do pacote Microsoft Office (Microsoft, Redmon, Washington, USA).

3.9 Deleção dos genes em estudo e obtenção de linhagens mutantes

Para obtenção das linhagens mutantes Δ CC1634, Δ CC1637, Δ CC1638, Δ CC2724 e Δ CC2390, utilizamos os oligonucleotídeos descritos na Tabela 3 (do número 18 - 37, que apresentam sítios para enzimas de restrição). As duas regiões do genoma (a montante e a jusante) que flanqueiam o gene a ser deletado foram amplificadas por PCR utilizando Platinum *Pfx* DNA polimerase (Invitrogen) (Figura 5). Uma adenina terminal foi adicionada com *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e posteriormente os fragmentos foram clonados no vetor pGEM-T Easy (Promega) para ser seqüenciados. Após confirmação da seqüência, os fragmentos foram clonados no vetor pNPTS138. Todas as deleções foram realizadas em fase para não causar nenhum efeito polar nos demais genes.

O plasmídeo pNPTS138 (Tabela 4) foi clivado com enzimas de restrição para dirigir a clonagem dos dois fragmentos. O cassette de deleção foi construído (Figura 5), utilizando os sítios de restrição das enzimas *Bam*HI, *Eco*RI, *Mlu*I; *Hind*III, *Eco*RI, *Mlu*I; e *Hind*III, *Bam*HI, *Mlu*I, presentes nos oligonucleotídeos empregados na amplificação dos fragmentos para deleção dos genes CC1638, CC2724 e CC2390, respectivamente. Para os genes CC1634 e CC1637, foram utilizados sítios de restrição *Hind*III, *Pst*I, *Eco*RI. A montagem do cassette de deleção foi confirmada por digestão com enzimas de restrição e o plasmídeo resultante foi

inserido na linhagem parental NA1000 de *C. crescentus* por conjugação a partir de *E. coli* S17-1. Foram dois processos de seleção:

i- Após conjugação, ocorre a primeira recombinação homóloga (integração do pNPTS138 no genoma). Por ser a linhagem NA1000 sensível ao antibiótico canamicina, foram selecionadas colônias que apresentavam resistência ao antibiótico, sendo confirmadas por PCR.

ii- Apenas uma colônia resistente a canamicina foi selecionada para ser inoculada em meio PYE sem antibiótico por 48 h com rotação constante de 250 rpm a 30 °C. Aliquotas de 5, 10, 50 e 100 µl do inóculo foram retiradas e semeadas em meio PYE contendo 3% de sacarose na ausência de canamicina. O pNPTS138 carrega o gene *sacB*, que converte sacarose em um metabólito tóxico para a célula. Um segundo evento de recombinação ocorre ao acaso, no qual o plasmídeo pNPTS138 é removido do cromossomo, gerando células sensíveis a canamicina com o gene de interesse deletado ou células que reverteram à linhagem selvagem. As confirmações dos eventos da segunda recombinação homóloga foram feitos por PCR.

O duplo mutante Δ CC2724 Δ 2390 foi obtido por dupla recombinação homóloga na qual o plasmídeo Del2390-A/BpNPTS138, foi inserido por conjugação na linhagem Δ CC2724 e confirmado por PCR.

Figura 5 - Esquema de construção do cassete e deleção do gene alvo. É mostrada a clonagem dos flaqueadores para deleção do gene alvo, utilizando o vetor pNPTS138 e possíveis eventos de recombinação homóloga para obtenção do mutante. **A.** As regiões flaqueadoras à montante e à jusante do gene alvo foram clonadas no vetor pNPTS138. As letras a, b e c representam as enzimas utilizadas para direcionar a clonagem. **B.** Ao se introduzir o vetor pNPTS138 em *C. crescentus* NA1000, a homologia de sequência de DNA entre os flaqueadores clonados e sua correspondente região no cromossomo possibilitam sua recombinação, promovendo a integração do vetor no genoma. O cromossomo está representado pelas linhas em azul, os genes representados por retângulos com número, os retângulos em vermelho e em preto representam os flaqueadores do gene a ser deletado (no exemplo o gene 2), e a linha laranja representa o DNA plasmidial. Os símbolos em roxo (X) indicam as posições aproximadas em que recombinam os fragmentos flaqueadores.

3.10 Análises do fenótipo das linhagens mutantes pertencentes ao agrupamento gênico CC1637-CC1640

3.10.1 Ensaio de sensibilidade a agentes oxidantes por halo de inibição

Para a análise do fenótipo das linhagens mutantes, foram realizados testes de sensibilidade por halos de inibição gerados na presença de peróxido de hidrogênio (3%) ou tert-butil hidroperóxido (1%), tanto na fase de crescimento exponencial como na fase estacionária. O ensaio consiste em semear 500 μL de cultura a uma $\text{DO}_{600} = 0,5-0,6$ (fase exponencial) ou $\text{DO}_{600} = 1-1,5$ (fase estacionária) em placas de PYE ágar, deixar secar e colocar no centro da placa discos de papel filtro contendo 10 μL do agente oxidante. Os resultados são apresentados como a média de três leituras, incluído o desvio padrão, das medidas dos diâmetros dos halos em centímetros obtidos após 24 h de incubação a 30 °C.

3.10.2 Teste de sensibilidade a antimicrobianos

No teste de sensibilidade foram utilizados discos (6,35 mm) de antibiograma da marca CEFAR, sendo: **1- Penicilinas:** Piperacilina + tazobactam (PPT, 110 μg); **2- Cefalosporinas:** Ceftazidima (CAZ, 30 μg), cefalexina (CFE, 30 μg) e cefotaxima (CTX, 30 μg); **3- Aminoglicosídeos:** Amicacina (AMI, 30 μg); **4-Tetraciclinas:** Doxicilina (DOX, 30 μg) e tetraciclina (TET, 30 μg).

O inóculo foi preparado pelo método turbidimétrico, com turvação equivalente a 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Placas de PYE ágar foram semeadas com *C. crescentus*, deixando se secar, e no centro da placa foram colocados discos de antibióticos, incubando se a 30 °C por 24 horas. Os resultados são apresentados como a média de três leituras, incluído o desvio padrão, das medidas dos diâmetros dos halos em centímetros.

3.10.3 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

Para determinar a CMI da linhagem NA1000 e linhagem ΔCC1640 na presença do antibiótico cefotaxima (CTX), utilizamos fitas contendo 0,015-256 $\mu\text{g/mL}$ de CTX (M.I.C.EVALUATOR™ strip marca Oxoid- Basingstoke, Hampshire, Reino Unido), segundo o protocolo do fabricante, e para determinação da CMI na presença do antibiótico cefalexina (CFE) utilizamos as técnicas por macro diluições seriadas, a qual considera como CMI a menor concentração na qual não se observa crescimento. Para este ensaio, as células foram incubadas inicialmente em meio PYE por 18 horas a 30 °C com rotação constante a 250 rpm. A cultura foi então diluída em tubos de ensaio contendo PYE e ajustada com turvação

equivalente a 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), com diluições seriadas do antibiótico nas concentrações decrescentes de 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81 e 3,9 $\mu\text{g/mL}$; o volume total para cada tubo foi de 1 mL. Foi utilizado um tubo como controle contendo meio sem células e antibiótico. A leitura do teste foi realizada visualmente. Um segundo ensaio em diferentes concentrações (32, 31, 30, 29, 28, 27, 25, 24, 23, 22 $\mu\text{g/mL}$) do antibiótico CFE foi realizado para determinar a concentração CMI específica.

3.10.4 *Teste de viabilidade na presença de metais*

As linhagens mutantes foram cultivadas com rotação constante de 250 rpm por 16 horas a 30 °C em meio PYE e diluídas a uma DO_{600} de 0,1. Após 3 horas, o meio foi dividido em 3 alíquotas (i- controle sem adicionar o estresse, ii- com adição de 40 μM de cloreto de cádmio e iii- com adição de 100 μM de cloreto de zinco). Nos intervalos de 0, 7, 13 e 24 horas retiramos alíquotas de 1 mL para determinar DO_{600} e de 10 μL para fazer diluição seriada de $10^{-1} - 10^{-5}$ (se DO_{600} correspondentes eram menores que 0,7), $10^{-2} - 10^{-6}$ (se DO_{600} correspondentes eram maior que 0,7 e menor que 1), 10^{-3} ao 10^{-7} (se DO_{600} correspondente eram maior que 1). Foram semeados 10 μL da diluição em duplicata em placas contendo PYE ágar, as quais foram incubadas a 30 °C. Após 3 dias de crescimento foi realizada a contagem de colônias, e foi determinado o número de U.F.C. (Unidades formadoras de colônias) por mL

3.11 Análises do crescimento das linhagens mutantes ΔCC2724 e ΔCC2390 e duplo mutante $\Delta\text{CC2724}\Delta\text{2390}$ na presença de metais cádmio, zinco, cobalto e níquel

Análises de crescimento em placa foram realizadas utilizando meio PYE ágar adicionado de 25-50 μM de cloreto de cádmio ou 50-100 μM de cloreto de cobalto ou 50-100 μM de cloreto de níquel. Células da linhagem NA1000 e linhagens mutantes foram inoculadas em meio PYE e incubadas a 30 °C em rotação constante de 250 rpm. Após de 18 horas de crescimento, as culturas foram diluídas a uma DO_{600} de 0,1 e incubadas até atingir uma DO_{600} de 0,5, momento no qual foram semeadas nos meios contendo metais utilizando alça descartável calibrada de 10 μL e incubadas a 30 °C por 3 dias.

3.12 Complementação das linhagens mutantes ΔCC2724 e ΔCC2390

Para complementar as linhagens mutantes, utilizamos o vetor pNPT228XNE de 6000 pb. Este vetor possui um fragmento de DNA de 2,4 kb pertencente ao locus de xilose e gene de resistência a canamicina. O vetor foi digerido com enzimas de restrição *SpeI* ou

EcoRI/SpeI, para inserir a região codificadora do gene CC2724 (3243 pb) ou CC2390 (3132 pb), respectivamente, à jusante do promotor induzido por xilose. A clonagem e orientação do fragmento foram confirmadas por digestão utilizando enzimas de restrição localizadas dentro do vetor e da sequência interna do fragmento inserido. Após a confirmação do inserto, o plasmídeo foi inserido na linhagem mutante por conjugação. Após a conjugação, as culturas foram semeadas em placas contendo PYE canamicina-ácido nalidíxico e incubadas a 30 °C por 3 dias, crescendo somente a linhagem mutante contendo uma única cópia do plasmídeo inserido por recombinação homóloga por ter o gene de resistência a canamicina. Como *E. coli* não cresce na presença de ácido nalidíxico, foi obtida desta maneira a linhagem complementada livre de contaminação da bactéria *E. coli*. Para os ensaios de complementação utilizamos a linhagem NA1000 e linhagens Δ CC2724 ou Δ CC2390 contendo o vetor vazio como controle e foram adicionados 0,2 % de xilose nas placas para induzir a expressão dos genes.

3.13 Expressão e purificação do domínio peptidase da proteína BlaR

A sequência codificadora do domínio peptidase da proteína BlaR foi amplificada por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos (Tabela 3, oligonucleotídeos 13e 14) e clonada no vetor de expressão pPROEX-HTa (Invitrogen), que apresenta cauda de histidina N-terminal. A expressão da proteína recombinante foi realizada em *E. coli* DH5 α . Culturas foram inoculadas em meio LB/ampicilina (100 μ g/mL) por 16 horas com agitação constante de 250 rpm a 37 °C. Em seguida as culturas foram diluídas a uma DO₆₀₀= 0,1; quando a cultura atingiu uma DO₆₀₀= 0,5, a expressão da proteína foi induzida por adição de 0,5 mM de IPTG e incubação por 3 horas. O sedimento bacteriano foi obtido por centrifugação e a proteína foi purificada a partir de corpos de inclusão seguindo o método descrito por Burgess e Knuth (1996).

Uma nova construção foi realizada, na qual a sequência codificadora do domínio peptidase (amplificada por PCR, utilizando os oligonucleotídeos 13 e 15) foi inserida no vetor de expressão pET28a (Novagen) que tem cauda de histidina N-terminal. A proteína recombinante foi expressa em *E. coli* BL21DE3, nas seguintes condições: Uma cultura em meio LB/ampicilina (100 μ g/mL) foi incubada em rotação constante a 250 rpm a uma temperatura de 37 °C, até atingir DO₆₀₀= 0,5. Seguiu-se a indução da expressão da proteína recombinante pela adição de 0,3 mM de IPTG. Após 3 horas de indução a cultura foi centrifugada e congelada a -20 °C.

A presença da cauda de 6x-histidina na extremidade N-terminal da proteína facilitou o processo de purificação da proteína recombinante utilizando resina quelante (Ni-NTA agarose, Qiagen) que liga à cauda de histidina. A massa bacteriana obtida após indução foi rompida em tampão de lise (Tris-HCl 50 mM, pH 8,5/2-mercaptoetanol 5 mM/PMSF 1 mM), empregando-se a técnica de sonicação, com tempo de 3 minutos (Pulso de 15 segundos com intervalo de 10 segundos OFF). Após centrifugação do lisado, o precipitado e o sobrenadante foram analisados por SDS-PAGE 12%.

O sobrenadante foi incubado com resina (1 mL de resina para 250 mL de cultura) previamente equilibrada em tampão A (Tris-HCl 20 mM pH 8,5/KCl 100 mM/ 2-mercaptoetanol 5 mM/glicerol 10% /imidazol 20 mM), por 60 minutos com agitação constante em gelo. A suspensão foi centrifugada por 1 minuto e a resina foi transferida a novo tubo e lavada 4 vezes com tampão C (Tris-Cl 20 mM pH 8,5/KCl 100 mM/2-mercaptoetanol 5 mM/glicerol 10% /imidazol 50 mM). A proteína foi eluída em tampão C utilizando concentrações crescentes de imidazol. O sobrenadante obtido foi analisado por SDS-PAGE 12%.

O plasmídeo para expressão da proteína codificada pelo gene CC1640 (*BlaI*) foi construído anteriormente no laboratório e utilizado neste trabalho.

3.14 Ensaio de retardamento de mobilidade eletroforética em gel

3.14.1 *Ligação da proteína BlaI ao DNA*

Para determinar a interação funcional entre o putativo regulador de transcrição *BlaI* e a sequência promotora em estudo, utilizamos a técnica de mudança de mobilidade eletroforética (*electrophoretic mobility shift assay*, EMSA). A análise consiste em identificar a interação proteína-DNA, pelo retardamento observado na mobilidade eletroforética de uma sequência específica de DNA pré-incubada com a proteína em estudo em relação à mesma sequência de DNA livre.

Para esta análise, previamente amplificamos por PCR a sequência promotora em estudo (DNA). Foram montadas as seguintes reações com volume final de 15 µL:

- 1- Controle negativo: DNA (0,585 µg), tampão de ligação (Tris-HCl 10 mM pH 7,5/KCl 60 mM/ MgCl₂ 1 mM/ DTT 1 mM/BSA 100 mg/mL /glicerol 8%) e água MilliQ estéril.
- 2- Controle positivo: DNA (0,585 µg), tampão de ligação, proteína *BlaI* (35 ou 55 ng) e água MilliQ estéril.

As reações foram incubadas por 30 minutos a 30 °C. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel não desnaturante de poliacrilamida 5%, com tampão de corrida 0,5x Tris-

borato-EDTA (TBE) a 40 mA. O retardamento foi detectado corando o gel em solução de brometo de etídio (Förster-Fromme e Jendrosseck 2010).

3.14.2 Inibição da ligação da proteína *BlaI* ao DNA

Para determinar a possível atividade proteolítica do domínio peptidase da proteína *BlaR* sobre a proteína *BlaI*, foram realizados ensaios de EMSA com e sem a presença da proteína peptidase. A análise nos permitiu determinar se a atividade de peptidase, poderia inibir por proteólise a ligação da proteína reguladora *BlaI* ao DNA.

Para tanto, foram montadas as seguintes reações com volume final de 15 µL:

- 1- Controle negativo: DNA (0,585 µg), tampão de ligação e água MiliQ estéril.
- 2- Controle positivo: DNA (0,585 µg), tampão de ligação, proteína *BlaI* (55 ng), tampão de peptidase (Tris-HCl 40 mM pH 7,5/ NaCl 25 mM / ZnCl₂ 25 µM) e água MilliQ estéril.
- 3- Condição de inibição: foram pré-incubadas por 16 horas antes do ensaio a proteína *BlaI* (55 ng), proteína peptidase (15 ng) e tampão de peptidase. Após 16 horas foram adicionados o DNA (0,585 µg) e o tampão de ligação.

O tampão de peptidase (Sakoh et al., 2005) a concentração do DNA e proteína *BlaI* são as mesmas em todas as condições. As reações foram montadas e incubadas por 30 minutos a 30 °C. A corrida de eletroforese e a coloração do gel são as mesmas, como mencionadas anteriormente.

3.15 Análise computacional

A sequência de DNA de cada um dos genes em estudo foi obtida da base de dados do *Comprehensive Microbial Resource* (<http://cmr.jcvi.org>). Análises comparativas foram realizadas contra a base de dados do GenBank (NCBI, USA), utilizando o programa BLASTP e ALIGN. O alinhamento de sequência de proteínas foi realizado com o programa *ClustalX* (Thompson et al., 1997) e editado no programa *GenDoc* (Nicholas et al., 1997). Análises de promotores e identificação de sequências consenso foram realizadas utilizando a ferramenta *RSA-tools-genome-scale DNA-pattern*, disponível no site *Regulatory Sequence Analysis Tools* (<http://rsat.ulb.ac.be/>), com os seguintes parâmetros: localizar a sequência consenso, com variação de uma base, na região de -400 a +1 a montante do ATG iniciador do gene, na orientação *forward e reverse* da região de DNA.

Os produtos de RT-PCR foram quantificados por densitometria utilizando o programa ImageJ (disponível em <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) e histogramas foram obtidos utilizando o programa Microsoft Office Excel 2007.

Análise computacional de predição de ilhas genômicas, utilizamos a ferramenta *IslandViewer* disponível na internet (<http://www.pathogenomics.sfu.ca/islandviewer/query.php>).

3.16 Análise estatística

Os resultados nos testes de sensibilidade de agentes oxidantes, antibióticos e ensaios de atividade de β -galactosidase foram avaliados por análise estatística, utilizando o TESTET que retorna a probabilidade associada ao teste t de Student do programa Microsoft Office Excel 2007.

4 RESULTADOS – Parte 1 – Parte 2

Os microorganismos de vida livre estão expostos às mudanças do seu habitat causados por fatores bióticos, abióticos ou antropogênicos, o que motiva um constante processo de adaptação para manter sua sobrevivência. Desde o início da vida os seres vivos têm se desenvolvido na presença de metais, e isto é demonstrado pela diversidade de metais divalentes ou de transição presentes na estrutura de diversas proteínas e no centro ativo de muitas enzimas. Assim, os microorganismos têm desenvolvido uma sofisticada e dedicada maquinaria genética e metabólica para adquirir, utilizar, neutralizar, transportar, detoxificar e administrar, a concentração intra e extracelular dos diversos tipos de íons de metais presentes no seu meio ambiente. O desenvolvimento e contaminação do meio ambiente com antibióticos a partir da década de 1940 tem constituído um novo mecanismo de pressão seletiva, que dá origem à aparição de cepas bacterianas resistentes a estes produtos. Diversos trabalhos tem mostrado que os microorganismos podem utilizar os mesmos mecanismos para resistir à pressão seletiva exercida pelos metais e pelos antibióticos.

Nessa constante adaptação, a bactéria de vida livre *C. crescentus* adquiriu genes que permitem resistência a metais e antibióticos. Nosso laboratório tem identificado genes envolvidos na resistência e homeostase de metais em *C. crescentus* (Braz e Marques, 2005; Braz, 2006; Da Silva et al., 2009), e o presente trabalho pretende caracterizar alguns destes genes e os mecanismos que regulam sua expressão em resposta a diversas condições de estresse.

Para atingir nossos objetivos, utilizamos duas estratégias: (i) deleção de genes, e (ii) análises de expressão, sendo os resultados obtidos apresentados em duas partes:

- I- Caracterização do agrupamento composto pelos genes CC1637-CC1638-CC1639-CC1640, e
- II- Análise comparativa dos dois sistemas de efluxo da família RND codificados pelos genes CC2720-CC2722-CC2724 e CC2388-CC2389-CC2390.

Parte 1

Caracterização do agrupamento
composto pelos genes CC1637- CC1640

4.1 Caracterização do agrupamento gênico CC1637 – CC1640

Trabalho anterior de nosso grupo identificou linhagens mutantes, obtidas pela inserção do transposon Tn5, que apresentavam sensibilidade a zinco e cádmio (Braz e Marques, 2005) dentre estas, duas linhagens tinham o Tn5 inserido nos genes CC1636 e CC1640, respectivamente.

A Figura 6 mostra um esquema da representação linear e localização no genoma de *C. crescentus*, do agrupamento gênico em estudo.

Figura 6 - Representação linear de parte do genoma de *Caulobacter crescentus* CB15\ O agrupamento de genes em estudo e a direção de transcrição são mostrados por setas. Os números na parte superior das setas indicam o numero de pares de bases da região que separa dois genes consecutivos. A cor dos genes indica sua categoria funcional: Preto= proteínas hipotéticas, rosa= prováveis oxidoreductases, azul= provável proteína BlaI, verde=provável proteína BlaR1, a seta vermelha representa a coordenada no cromossomo, como mostrado no “The Institute for Genomic Research” (TIGR, www.tigr.org).

Fonte: Modificado de “The Institute for Genomic Research” (TIGR, www.tigr.org).

A análise computacional comparativa destes genes com os bancos de dados de sequências de DNA (TIGR, USA) mostrou que o gene:

- **CC1637**, codifica uma proteína hipotética de 109 aminoácidos. Esta putativa proteína contém uma pequena região hidrofóbica e um putativo domínio TAT (*Twin-arginine translocation*) no N-terminal (Prosit 51318). O domínio TAT sinaliza a exportação da proteína enoveladas através da membrana.
- **CC1638**, codifica uma provável proteína oxidoreductase de 509 aminoácidos. Esta proteína apresenta domínio com similaridade à família de proteínas GMC oxidoreductases. As proteínas

glicose-metanol-colina (GMC) oxidorreductases são flavoproteínas oxidorreductases, que catalisam a reação de oxido-redução (redox) na qual um grupo CH-OH age como doador de hidrogênio ou elétrons e reduz o aceptor de hidrogênio ou elétrons (IPR000172).

- **CC1639**, codifica uma proteína de 491 aminoácidos que contém um domínio metaloprotease M56 BlaR1 (PF05569 Peptidase-M56), e um domínio de repetições de ankirina (PF12796, Ank_2), separados por uma região transmembrana.

- **CC1640**, codifica uma proteína de 144 aminoácidos que apresenta um domínio com similaridade ao domínio funcional da família de reguladores de transcrição BlaI (InterPro: IPR005650; <http://pfam.sanger.ac.uk>). Este gene no cromossomo de *C. crescentus* está orientado de forma divergente ao gene CC1641 (proteína hipotética com 192 aminoácidos), sendo separados por uma região intergênica de 168 pares de bases.

Análises computacionais mostraram que: (i) as proteínas codificadas pelos genes CC1639 e CC1640 pertencem à família de proteínas Bla, que em outras bactérias estão envolvidas na resposta a antibióticos β -lactâmicos; (ii) o gene CC1638 codifica uma flavoproteína oxido-reductase da família GMC, que poderia estar envolvida em resposta a agentes oxidantes, por possuir um cofator FAD que poderia ceder ou ganhar elétrons. Estes análises mostram o potencial envolvimento dos genes deste cluster na resposta a metais e antibióticos, e assim o presente trabalho pretende realizar o estudo deste agrupamento gênico em resposta à presença de metais cádmio e zinco, de agentes oxidantes e de antibióticos β -lactâmicos.

4.1.1 Obtenção de linhagens mutantes

Uma forma de determinar a função dos genes é através da sua deleção, e subsequente análise do seu efeito no fenótipo do mutante obtido. Para atingir este objetivo, utilizamos um cassete de deleção inserido no vetor pNPTS138, que por dupla recombinação homologa nós permitiu obter linhagens mutantes em *C. crescentus* NA1000 para os genes CC1637 (Δ CC1637) e CC1638 (Δ CC1638). Com fins de análise da atividade de enzima β -galactosidase em placa, foi necessário realizar a deleção do gene *lacA* (Δ CC1634), para descartar atividade enzimática basal de β -galactosidase de *C. crescentus*.

A Figura 5 (ver Materiais e Métodos) mostra o processo de construção do cassete de deleção, e a dupla recombinação homóloga, que resulta na deleção do gene alvo e a perda do vetor pNPTS138.

As linhagens mutantes Δ CC1639 e Δ CC1640 haviam sido construídas anteriormente no laboratório e foram cedidas para este trabalho. A Figura 7 mostra a confirmação por PCR da deleção de cada gene alvo.

A deleção de cada gene foi realizada da seguinte forma:

- Para Δ CC1637: fragmentos de DNA flanqueadores do gene alvo foram obtidos por PCR utilizando o par de oligonucleotídeos del1637-1/del1637-2 (a) e del1637-3/del1637-4 (b), que amplificam fragmentos de 1226 e 953 pb, respectivamente, que foram ligados no vetor pNPTS138. A primeira recombinação homóloga foi confirmada pela resistência ao antibiótico canamicina e pela amplificação por PCR, que originou um fragmento de 2592 pb e outro de 2179 pb (utilizando os oligonucleotídeos del1637-1/del1637-4). Após a segunda recombinação homóloga o produto de PCR foi de 2179 pb, confirmando a deleção.
- Para Δ CC1638: fragmentos de DNA flanqueadores do gene alvo foram obtidos por PCR utilizando o par de oligonucleotídeos del1638-1/del1638-2 (a) e del38-3/del384 (b), que amplificam fragmentos de 894 e 863 pb, respectivamente, que foram ligados no vetor pNPTS138. A primeira recombinação homóloga foi confirmada pela resistência ao antibiótico canamicina e pela amplificação por PCR, que originou um fragmento de 1757 pb e outro de 3430 pb (utilizando os oligonucleotídeos del1638-1/del1638-4). Após a segunda recombinação homóloga o produto de PCR foi de 1757 pb, confirmando a deleção.
- Para Δ CC1634: fragmentos de DNA flanqueadores do gene alvo foram obtidos por PCR utilizando o par de oligonucleotídeos del1634-1/del1634-2 (a) e del1634-3/del1634-4 (b), que amplificam fragmentos de 945 e 1005 pb, que foram ligados no vetor pNPTS138. A primeira recombinação homóloga foi confirmada pela resistência ao antibiótico canamicina e pela amplificação por PCR, que originou um fragmento de 3668 pb e outro de 1950 pb (utilizando os oligonucleotídeos del1634-1/del1636-4). Após a segunda recombinação homóloga o produto de PCR foi de 1950 pb, confirmando a deleção.

Figura 7 - Confirmação por PCR da deleção dos genes Δ CC1637 (A), Δ CC1638 (B) e Δ CC1634 (C)\ A reação de PCR foi feita utilizando oligonucleotídeos específicos para cada mutante. Eletroforese em gel de agarose 1%. M: Marcador de massa molecular 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen).

Fonte: Valencia, EY (2012).

4.1.2 Análises dos fenótipos das linhagens mutantes

Com a finalidade de determinar o efeito da deleção dos genes, nas linhagens mutantes obtidas, foi avaliada sua resposta a diversas condições de estresse. O fenótipo das linhagens mutantes foi determinado através de testes de sensibilidade pela medida dos halos de inibição de crescimento gerados na presença de peróxido de hidrogênio (3%), tert-butil hidroperóxido (1%) e antibióticos β -lactâmicos. Também foram realizados ensaios de viabilidade por contagem de UFC (Unidades Formadoras de Colônia), na presença de metais.

4.1.2.1 Na presença de peróxido de hidrogênio

O agente oxidante peróxido de hidrogênio foi utilizado em uma concentração de 3%, para todos os mutantes (Δ CC1637, Δ CC1638, Δ CC1639 e Δ CC1640), assim como para a linhagem parental NA1000. Os resultados (Tabela 5) mostram que tanto na fase de crescimento logarítmica ou estacionária, os mutantes não apresentaram sensibilidade alterada a este agente

oxidante, sendo os tamanhos dos halos estatisticamente equivalentes ao de controle (3 cm de diâmetro na fase logarítmica e estacionária).

Tabela 5 - Análise de sensibilidade a peróxido de hidrogênio

Linhagem <i>C. crescentus</i>	Média da fase logarítmica*	Média da fase estacionária*
NA1000	3,0 +/- 0,1	3,0 +/- 0,1
Δ CC1637	3,0 +/- 0,1	3,3 +/- 0,2
Δ CC1638	2,6 +/- 0,3	3,0 +/- 0,0
Δ CC1639	2,8 +/- 0,1	2,7 +/- 0,1
Δ CC1640	3,0 +/- 0,4	2,8 +/- 0,3

*Média do diâmetro dos halos e desvio padrão apresentados em centímetros. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

Fonte: Valencia, EY (2012).

4.1.2.2 Na presença de tert-butil hidroperóxido

Na análise foi utilizado 1% do agente oxidante orgânico tert-butil hidroperóxido (um mimético de peróxido orgânico celular, indutor de estresse oxidativo) para todos os mutantes (Δ CC1637, Δ CC1638, Δ CC1639, Δ CC1640) e para a linhagem controle NA1000. Os resultados mostram que na fase logarítmica os mutantes não apresentaram sensibilidade alterada, porém, na fase estacionária de crescimento os mutantes Δ CC1637 e Δ CC1638 foram mais sensíveis (diferença estatisticamente significativa), mostrando um diâmetro maior (de 2,3 e 2 cm, respectivamente) em relação ao controle que apresenta um diâmetro de 1,7 cm (Tabela 6).

Tabela 6 - Análise de sensibilidade a tert-butil hidroperóxido

Linhagem <i>C. crescentus</i>	Média da fase logarítmica*	Média da fase estacionária*
NA1000	2,0 +/- 0,1	1,7 +/- 0,1
Δ CC1637	2,0 +/- 0,1	2,3 +/- 0,2
Δ CC1638	2,0 +/- 0,0	2,0 +/- 0,1
Δ CC1639	1,9 +/- 0,1	1,5 +/- 0,0
Δ CC1640	1,8 +/- 0,2	1,4 +/- 0,0

*Média do diâmetro dos halos e desvio padrão apresentados em centímetros. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

Fonte: Valencia, EY (2012).

4.1.2.3 Na presença de metais cádmio e zinco

A análise do padrão de resistência na presença de CdCl_2 (40 μM) e ZnCl_2 (100 μM), das linhagem NA1000 e linhagens mutantes Δ CC1637, Δ CC1638, Δ CC1639 e Δ CC1640 foram determinadas a partir de contagem de UFC provenientes de diluições seriadas (10^{-1} - 10^{-7}), retiradas das alíquotas das culturas no intervalo de 0, 7, 13 e 25 horas após de adicionar o agente. A sobrevivência dos microorganismos foi calculada pelo número de UFC por mL da cultura em relação ao tempo inicial.

A Figura 8 mostra as curvas de sobrevivência da linhagem NA1000 e linhagens mutantes. A linhagem Δ CC1638, é a única que apresentou uma queda de viabilidade no ponto de 7 horas após adicionar os metais, em ambas as condições testadas, e após este período a viabilidade foi recuperada. As demais linhagens mutantes, na presença de cloreto de zinco, apresentaram o mesmo perfil de viabilidade, não mostrando diferença significativa em relação ao controle (sem adição de metal). Já a linhagem NA1000 apresentou maior viabilidade do que sem adição do metal. Na presença de cloreto de cádmio, observamos uma queda da viabilidade celular entre 7 e 14 horas de cultura, na linhagem NA1000 e em todos os mutantes. Após este período a viabilidade é recuperada e atinge um valor similar ao seu controle sem adição de metal, com a exceção da linhagem Δ CC1640 que não mostrou recuperação após 14 horas.

Figura 8 – Sobrevivência na ausência e presença de metais Cd^{2+} (40 μM) e Zn^{2+} (100 μM) da linhagem NA1000 (A) e linhagens mutantes ΔCC1637 (B), $\text{N}\Delta\text{CC1638}$ (C), ΔCC1639 (D) ΔCC1640 (E)

Fonte: Valencia, EY (2012).

4.1.2.4 Na presença de antibióticos

Culturas da linhagem NA1000 e das linhagens mutantes foram analisadas na presença de diferentes discos de antibióticos em meio PYE ágar, com a finalidade de determinar se há uma diferença significativa no diâmetro do halo de inibição de crescimento entre as linhagens. Na análise foi utilizado o meio PYE, já que a linhagem *C. crescentus* NA1000 não cresce no meio Mueller Hinton, um meio de cultura padronizado para ensaio de antibióticos (dados não mostrados). Os resultados mostram que o mutante ΔCC1640 apresentou sensibilidade maior (estatisticamente significativa) quando comparado com a linhagem NA1000, na presença dos antibióticos CTX e PPT (Tabela 7).

Tabela 7 - Análise de sensibilidade a antibióticos das linhagens mutantes

Linhagem→ **Antibiótico↓	NA1000 * (Control)	ΔCC1637 *	ΔCC1638 *	ΔCC1639 *	ΔCC1640 *
CTX 30 µg	2,1 +/- 0,2	2,1 +/- 0,1	2,1 +/- 0,2	2,3 +/- 0,3	2,9 +/- 0,3
TET 30 µg	3,7 +/- 0,6	3,8 +/- 0,3	4,0 +/- 0,5	3,8 +/- 0,3	3,9 +/- 0,4
CFE 30 µg	2,1 +/- 0,3	2,2 +/- 0,2	2,0 +/- 0,1	2,1 +/- 0,1	2,3 +/- 0,2
DOX 30 µg	4,1 +/- 0,2	3,8 +/- 0,3	4,0 +/- 0,4	3,5 +/- 0,1	3,6 +/- 0,0
CAZ 30 µg	1,6 +/- 0,2	1,6 +/- 0,2	1,8 +/- 0,3	1,7 +/- 0,1	1,6 +/- 0,1
PPT 110 µg	1,0 +/- 0,2	1,1 +/- 0,1	1,0 +/- 0,2	1,1 +/- 0,1	1,4 +/- 0,1
AMI 30 µg	2,4 +/- 0,1	2,5 +/- 0,0	2,6 +/- 0,2	2,4 +/- 0,3	2,5 +/- 0,1

*Média do diâmetro dos halos e desvio padrão apresentados em centímetros.** CTX = cefotaxima, TET = tetraciclina, CFE = Cefalexina, DOX= Doxicilina, CAZ = ceftazidima, PPT = piperacilina + tazobactam, AMI = Amicacina.

Fonte: Valencia, EY (2012).

Foi determinada a concentração mínima inibitória (CMI) da linhagem NA1000 e da linhagem ΔCC1640, com o antibiótico CTX (Figura 9) através do ensaio Etest, e na presença do antibiótico CFE foi determinada por macrodiluições seriadas, como descritas em material e métodos. Os resultados indicam, que a linhagem mutante ΔCC1640 apresenta maior sensibilidade aos antibióticos CTX com CMI de 8 µg e CFE com CMI de 20 µg se comparada com a linhagem NA1000 que apresentou um CMI de 16 µg e 28 µg, para CTX e CFE respectivamente (Tabela 8). Os resultados para CTX foram confirmados pelo ensaio de Etest (Figura 9).

Tabela 8 - Crescimento mínimo inibitório (CMI) da linhagem NA1000 e Δ CC1640

Linhagem	CTX	CFE
NA1000	16 μ g	28 μ g
Δ CC1640	8 μ g	20 μ g

Fonte: Valencia, EY (2012).

Figura 9 - Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) da linhagem mutante Δ CC1640 (A) e linhagem NA1000 (B), na presença do antibiótico cefotaxima (CTX). No ensaio foi utilizado meio PYE ágar e a concentração de turvação foram ajustadas a 0,5 Mc Farland.

Fonte: Valencia, EY (2012).

4.1.3 Análise da organização transcricional do agrupamento gênico CC1637-CC1640

O perfil de expressão de um gene é determinado e controlado pelo seu promotor, e a expressão dirigida por um promotor pode ser analisada utilizando-se um gene repórter; neste caso, empregamos o gene repórter *lacZ* do vetor pRK*lacZ*290. A análise da sequência de DNA mostrou que os genes CC1637 e CC1638 estão separados por 2 pb, e por esse motivo nossa primeira consideração foi que estes genes poderiam estar sob o controle da região intergênica de 173 pb (putativo promotor do gene CC1638) localizada entre os genes CC1638 e CC1639 (Figura 6). Esta região intergênica foi amplificada e inserida no vetor pRK*lacZ*290, e a Figura 10 mostra a confirmação por PCR da clonagem do promotor do gene CC1638 no vetor, obtendo o plasmídeo p1638*lacZ*.

Figura 10 - Confirmação da clonagem do promotor do gene CC1638\ Foram utilizados oligonucleotídeos específicos do vetor, o qual sem inserto, gera um produto de 150 pb e com inserto um produto de 513 pb, contendo o promotor do gene CC1638 (363 pb), linha 1. Eletroforese em gel de agarose 1%, M: marcador de massa molecular 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen, USA).

Fonte: Valencia, EY (2012).

A atividade do putativo promotor do gene CC1638 foi determinada pela medida da atividade β -galactosidase, segundo o método descrito por Miller (1972). O plasmídeo p1638*lacZ*, foi inserido por conjugação na linhagem parental NA1000 utilizando a bactéria doadora *E. coli* S17-1, para realizar o ensaio de atividade β -galactosidase *in vivo*.

Neste ensaio se utilizaram culturas na fase exponencial e estacionária em meio PYE/tetraciclina (1 μ g/mL). O promotor do gene CC1638 (p1638*lacZ*) gerou atividade de 291 (Exp) e 161 (Est) Unidades Miller, respectivamente (Figura 11). O vetor pRK*lacZ*290 sem inserto foi utilizado como controle negativo para este ensaio e mostrou uma atividade menor que 200 Unidades Miller tanto na fase exponencial como estacionária. Os resultados mostram que esta região a montante do gene CC1638 tem atividade transcricional muito baixa e que poderia não conter um promotor

Figura 11 - Análise da expressão dirigida pelo promotor do gene CC1638\ A expressão foi determinada pela medida da atividade de β -galactosidase da linhagem NA1000 carregando o vetor p1638lacZ. A linhagem *C. crescentus* NA1000 levando o vetor sem inserto, foi utilizada como controle negativo. Exp: fase de crescimento exponencial e Est: fase de crescimento estacionária.

Fonte: Valencia, EY (2012).

O resultado anterior nos leva a pensar que possivelmente a região intergênica entre os genes CC1638 e CC1639 não constitui um promotor, e assim decidimos determinar através da técnica de RT-PCR se os genes CC1637-CC1638 e CC1638-CC1639, eram co-transcritos. Um estudo anterior em nosso laboratório já tinha demonstrado que o gene CC1639 e CC1640 eram co-transcritos (Braz, 2006).

A localização dos oligonucleotídeos utilizados e o RNA para este ensaio é mostrada na Figura 12. A Figura 13 mostra a análise por eletroforese do RT-PCR, no qual a amplificação foi realizada utilizando os oligonucleotídeos cod1637-1/cod1638-1 (que amplificam um fragmento de 304 pb) e oligonucleotídeos cod1638-2/cod1639-1 (que amplificam um fragmento de 340 pb). Os produtos de RT-PCR confirmam a co-transcrição dos genes, sugerindo que os genes CC1637-CC1638-CC1639-CC1640, constituem um operon. Entretanto, as bandas de amplificação entre os genes CC1637-CC1638 foram bem mais fortes que entre os genes CC1638-CC1639, indicando que possivelmente há algum outro tipo de regulação exclusiva dos genes CC1637 e CC1638.

Figura 12 - Localização dos oligonucleotídeos utilizados na análise por RT-PCR\ Representação linear de parte do genoma de *Caulobacter crescentus*, com asteriscos é indicada a localização dos oligonucleotídeos utilizados na análise. À direita eletroforese em gel de agarose, mostrando o RNA utilizado no ensaio de RT-PCR.

Fonte: Valencia, EY (2012).

Figura 13 - Determinação da co-transcrição dos genes em estudo\ Eletroforeses em gel de agarose 1% dos produtos: RT-PCR linha 1 e 2 utilizando os oligonucleotídeos cod1637-1/cod1638-1 (304 pb) e cod1638-2/cod1639-1 (340 pb) respectivamente; produto de PCR: linha 3 e 4- Controle negativo usando como molde 1 μ g e 2 μ g de RNA respectivamente e oligonucleotídeos cod1638-2/cod1639-1. Linha 5- Controle positivo usando 1 μ g de gDNA e os oligonucleotídeos cod1638-2/cod1639-1 (340 pb). M: Marcador de massa molecular 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen).

Fonte: Valencia, EY (2012).

4.1.4 Análise do padrão de expressão do operon CC1637-CC1640

O plasmídeo p1640*lacZ* foi construído anteriormente em nosso laboratório, pela amplificação da região de 307 pb a montante do gene CC1640 que contém a região promotora de 168 pb, e foi inserida no vetor pRK*lacZ*290, sendo cedido para este estudo pela Dra. Vânia Braz.

4.1.4.1 Análises do padrão de expressão na presença de metais e peróxido de hidrogênio

O plasmídeo p1640*lacZ* foi inserido na linhagem NA1000, por conjugação utilizando a bactéria doadora *E. coli* S17-1. A atividade do promotor do gene CC1640, que controla a expressão do operon CC1637-CC1640, foi determinada pela medida da atividade β -galactosidase, segundo o método descrito por Miller (1972).

Para análises do padrão de expressão do promotor na presença de metais utilizamos culturas em meio M2-glicose, incubadas a 30 °C com rotação constante (250 rpm). Ao atingir uma $DO_{600} = 0,5$ foram ou não adicionados os agentes e o ensaio foi realizado em vários tempos. Na presença de $CdCl_2$ (25 μM) e $ZnCl_2$ (100 μM), os ensaios demonstraram que o gene *lacZ* não é induzido na presença destes metais após 3 horas de indução, quando comparado com a amostra controle (sem estresse) (Figura 14A). Como os resultados foram não significativos, optamos por utilizar uma concentração menor de $CdCl_2$ (6 μM), já que em *C. crescentus* observa-se indução de alguns genes nessa condição (Hu *et al.*, 2005). Em essa nova condição o gene também não apresentou indução significativa em relação ao controle (Figura 14B). Uma concentração de 27 μM de dicromato de potássio foi utilizada no estudo, considerando que Hu *et al* (2005), reportou que o gene CC1640 é induzido nesta condição. A Figura 14C mostra que o gene *lacZ* não foi induzido nesta condição em todos os tempos testados.

Na análise do padrão de expressão na presença de peróxido de hidrogênio, utilizamos meio de cultura PYE, as culturas foram incubadas a 30 °C até atingir $DO_{600} = 0,5$, e foram adicionados 60 μM de peróxido de hidrogênio, tendo como controle negativo uma cultura sem adição de estresse. Os tempos testados foram de 0, 5, 15, 30 e 60 minutos. Os resultados mostraram que o gene não é induzido na presença de peróxido de hidrogênio em nenhum dos tempos testados, já que não apresentaram níveis de expressão maior em relação ao controle (Figura 14D).

A análise do padrão de expressão do operon CC1637-CC1640 e do fenótipo das linhagens mutantes, na presença de metais Cd^{2+} , Zn^{2+} e peróxido de hidrogênio indicam que

estes genes não estão envolvidos na resposta a estes agentes, exceto para a linhagem Δ CC1640 que apresentou uma pequena queda de viabilidade na presença de cádmio.

Figura 14 - Análises do padrão de expressão do operon CC1637-CC1640 ($p1640lacZ$). Na ausência e presença de metais Cd^{2+} , Zn^{2+} , $K_2Cr_2O_7$ e H_2O_2 . A expressão foi determinada pela medida de atividade de β -galactosidase da linhagem NA1000 carregando o vetor $p1640lacZ$.

Fonte: Valencia, EY (2012).

4.1.4.2 Análises do padrão de expressão na presença de antibióticos

Os resultados anteriores mostraram que o mutante Δ CC1640 apresentou sensibilidade na presença dos antibióticos CTX e PPT (Tabela 7). Com a finalidade de determinar se o promotor do gene CC1640 é induzido na presença de diferentes antibióticos (21 antibióticos em disco foram testados, ver materiais e métodos) foram realizadas análises de atividade β -galactosidase em placa, utilizando para este ensaio o promotor do gene CC1638 como controle negativo. Os resultados considerados positivos no ensaio inicial foram confirmados através da atividade de β -galactosidase em meio líquido M2-Glicose.

Os plasmídeos contendo os promotores dos genes CC1638 (p1638*lacZ*) e CC1640 (p1640*lacZ*) foram inseridos na linhagem mutante *lacA* (Δ CC1634) para eliminar a atividade enzimática basal de LacA. Assim como a enzima LacZ, LacA quebra o substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo (X-gal) em galactose e 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindole, e este último produto é oxidado produzindo uma cor azul.

As culturas foram semeadas em placas com meio PYE ágar, contendo 30 μ g/mL de X-gal. O inóculo foi ajustado a 0,5 escala de McFarland e 1, 2 ou 3 discos de antibióticos foram distribuídos nas placas. Os resultados mostraram que a linhagem Δ CC1634 contendo o plasmídeo p1640*lacZ*, formou um anel azul na presença dos antibióticos CTX (30 μ g) e CFE (30 μ g), após 24, 48 e 72 horas de incubação, o que não foi observado na presença dos demais antibióticos testados, inclusive em PPT (110 μ g) (Figura 15). Na análise da linhagem Δ CC1634 contendo o plasmídeo p1638*lacZ*, não se observou a formação do anel azul na presença de nenhum dos antibióticos testados, nem expressão basal (cor azul) após de 72 horas, indicando que a região intergênica de 173 pb a montante do gene CC1638, não contém um promotor induzível nestas condições.

Figura 15 - Análise do padrão de expressão dos genes CC1640 e CC1638 em meio sólido utilizando a linhagem Δ CC1634\ (A) Indução do promotor do gene CC1640 (p1640*lacZ*) após 24, 48 e 72 horas de incubação, formando um anel azul somente na presença dos antibióticos CFE e CTX, e não na presença dos demais antibióticos testados, por exemplo, na presença do antibiótico RIF. (B) Análise do promotor do gene CC1638 (p1638*lacZ*) mostrando que não ocorreu indução na presença dos antibióticos testados. CTX= 30 μ g cefoxatima, CFE=30 μ g cefalexima, RIF= 5 μ g rifampicina, AMI= 30 μ g amicacina, TIC=85 μ g ticarcilina, CFO= 30 μ g cefoxitina, CAZ= 30 μ g ceftazidina, LVX= 5 μ g levofloxacino. A expressão foi determinada pela atividade

Fonte: Valencia, EY (2012).

Para confirmar os resultados anteriores e determinar a atividade do promotor pertencente ao gene CC1640 (p1640*lacZ*) inserido agora na linhagem NA1000 selvagem, utilizamos os mesmos antibióticos CTX e CFE que deram indução em análises em meio sólido. Nesta análise as culturas foram incubadas a 30 °C em meio M2-glicose até atingir $DO_{600} = 0,5$, momento no qual foram adicionados os antibióticos mencionados anteriormente. Os resultados

mostraram que após 3 horas de adição do antibiótico, se observa indução do gene, porém, a maior indução foi obtida após 24 horas. Na presença de CFE a indução foi 1,3; 1,4 e 1,9 vezes maior nas concentrações de 30, 35 e 40 µg, respectivamente. Na presença de CTX a indução foi de 1,3 e 1,4 vezes maior nas concentrações de 35 e 45 µg, respectivamente (Figura 16).

Figura 16 - Análise do padrão de expressão do gene CC1640 utilizando meio M2-Glicose\ A expressão foi determinada pela medida de atividade de β -galactosidase da linhagem NA1000 carregando o vetor p1640lacZ, na presença de antibióticos cefalexina (CFE) e cefotaxima (CTX). Os asteriscos acima das barras indicam que a diferença é estatisticamente significativa.

Fonte: Valencia, EY (2012).

4.1.5 Análise do padrão de expressão do operon CC1637-CC1640 na linhagem mutante Δ CC1640

A análise computacional mostrou que o gene CC1640 codifica uma proteína com similaridade a proteína repressora da família de reguladores de transcrição BlaI. Considerando esta informação, pretendemos analisar se o gene CC1640 (BlaI), regula a sua própria expressão. Para tanto, o promotor do gene CC1640 (p1640lacZ), foi inserido na linhagem mutante Δ CC1640 e na linhagem NA1000 selvagem (controle) por conjugação e ensaios de atividade β -galactosidase foram realizados.

Os ensaios de atividade de β -galactosidase foram realizados tanto na fase de crescimento exponencial como na fase estacionária. Os resultados (Figura 17) mostraram que tanto na fase de crescimento exponencial como estacionária, há uma expressão 3 vezes maior em Δ CC1640 que na linhagem controle, sugerindo que o gene CC1640 codifique uma proteína

com função repressora de sua própria transcrição. Também se observa que o gene é induzido na fase estacionária na linhagem NA1000 selvagem, mas os valores alcançados não são equivalentes à desrepressão observada na linhagem Δ CC1640.

Figura 17 - Análise de expressão do operon CC1637-CC1640 na linhagem mutante Δ CC1640 e NA1000\ A expressão foi determinada pela medida de atividade β -galactosidase de ambas as linhagens por carregar o vetor p1640lacZ. EXP: fase exponencial e EST: fase estacionária. Os asteriscos acima das barras indicam que a diferença é estatisticamente significativa.

Fonte: Valencia, EY (2012).

4.1.6 Determinação da ligação da proteína codificada pelo gene CC1640 (BlaI) a seu promotor

O gene CC1639 codifica uma proteína com domínio C-terminal sensor que apresenta cinco repetições de ankirina, como mostra a análise *in silico* utilizando a ferramenta *REP Search your protein for a collection of repeat-V1* (Tabela 9), que não estão presentes em proteínas da família BlaR relacionadas a regulação de antibióticos β -lactâmicos que apresentam domínio sensor com domínio de ligação β -lactâmicos, porém, apresenta um domínio N-terminal citoplasmático metaloprotease (BlaR) ao igual ao das proteínas da família BlaR. O alinhamento da proteína codificada pelo gene CC1639 mostrou 17% e 26% de identidade com a proteína BlaR e MecR de *Staphylococcus aureus*.

Tabela 9 - Domínios de ankirina identificados na proteína codificada pelo gene CC1639

Repetições	Início	Fim	Fragmento	score	e-value
ANK	328	357	HLGRPLYDAVDRKDLQTVRE LIALGANPNY	2000	1.32077404568776e-09
ANK	361	390	GDGSPLIEAARNGQADVVR LLAAGADPNL	2530	4.94541851914221e-10
ANK	394	423	GDGNPLIQASRVGRDIVQAL VARGADVES	2440	1.26898491714655e-13
ANK	427	456	GDETPLIGAALQGELAVVKYL VERGADVNR	2600	5.07512183833825e-07
ANK	464	491	EMRSPLGMARKNGHASVVNY LKSRGARD	1910	3.9560299480712e-10

Fonte: Valencia, EY (2012).

A análise da proteína codificada pelo gene CC1639 (BlaR), utilizando o programa TMHMM Server v.2.0, mostra que ela apresenta quatro domínios transmembrana (TM1, TM2, TM3 e TM4) e três alças. Na alça três citoplasmática se localiza o motivo HEXXH, cujos resíduos de histidina são essenciais para ligar o íon zinco e o resíduo de ácido glutâmico é uma base catalítica, com função de autocatálise intramolecular (domínio citoplasmático metalopeptidase). Análises de similaridade de blastp (NCBI) da sequência da proteína codificada pelo gene CC1639, identificou duas proteínas de alphaproteobacterias: *Oceanicaulis alexandrii* HTCC2633 (Acesso ZP_00957314) e *Maricaulis maris* MCS10 (Acesso YP_757111), que apresentam 30% de identidade com a proteína CC1639. O alinhamento de aminoácidos das 3 proteínas, utilizando o programa clustal X, mostrou que estas proteínas também apresentam os domínios peptidase e ankirina (Figura 18).

Figura 18 - Alinhamento da sequência de proteínas codificadas pelos genes peptidase M56, BlaR1 de *Maricaulis maris* MCS10, BlaR de *C. crescentus* e proteína relacionada a ankirina de *Oceanicaulis sp* HTCC2633\ Caixa em azul mostra o domínio metaloprotease conservado (HEXXH), aminoácidos conservados são marcados num fundo cinza ou azul claro, e os aminoácidos sublinhados mostram as repetições de ankirina, sendo 4 repetições para BlaR1 de *Maricaulis maris* MCS10 (Acesso, YP757111), 5 repetições para BlaR de *C. crescentus* (CC1639) e 6 repetições para a proteína relacionada a ankirina de *Oceanicaulis sp* HTCC2633 (Acesso, ZP_00957314).

```

          *          20          *          40
YP 757111 : MALDTLLLAALAAIVAAATALAGGVMAVDRLLPARLVRRHDLALAALI
CC 1639   : -MVSDILLFVGEANLALAAVLLVLALRRPVRKVFG-ARNAYALWLV
ZP_0095731 : -MISALFQAALFVLIGSTVFALATLVLHRIAPQTRIRERHDLALALLY

          60          *          80          *          1
YP 757111 : PLVFFLALRAAPDLSAD-VQAGVAGFSSAQSAEATSHAARPTTSTGPV
CC 1639   : SILALLIPARTIVLPAPSTVSSTAAISPSPSSAPSSVTAPKSP-----
ZP_0095731 : PAIFVIALMPASGKPAEGLSVSPGAVAPVFPVISPETLAALPAR----E

          *          120          *          140
YP 757111 : LTAPETVWSGVWPVLGRILLVWLTGTAVMAVRIARDLVALDRMRLAA
CC 1639   : APLPAIPVGEITLGLWLIVAFGGLILQVERQRRFVRSLGALS-----
ZP_0095731 : MQDQALALPHLLTGLGFVLVFAWMIGLVWAGLALGRDLWNLN--RITT

          160          *          180          *          2
YP 757111 : VACPASLRLSADLPLAVSAAVTTPVLAGYRQPQILLPTGFT---FDHA
CC_1639   : -----RTGEDRLLRAEKPGVGPAVIGAVAPCVVLPADFDRQYTPEE
ZP_0095731 : TPVTTDLALSRRVALRQSRDVLSPMVAGFVRPVLIPEDFR---FDEA

          *          220          *          240
YP 757111 : PVLHEIAHARRGDAWTVLALRILQVALWWVLPILPLMTLLERNRETL
CC 1639   : LILAHERNHLAVGDAQINAVVTGLQCLFWFNPFVHLGAATLRIDQEIA
ZP_0095731 : AVLHEIAHIRRHDALTGLAQRLIACVFWWAPGVHHLNRHVRSMREAL

          260          *          280          *          3
YP 757111 : REAARITGQSRDLALALIDAASDHTRHASLALAA-APSRSSLAHRVAR
CC 1639   : AAVLARHPKTRRAYGEAMLKTQLAACAPPLGCHWPASANKQLKERFTM
ZP_0095731 : EAAARTQGKPLVLAHALDAARKAVLARPLTLAAQAPRKSELFRVNA

```

continua

continuação

```

                                *           320           *           340
YP_757111 : ATSDLNRKDS PMRFALLLPALSATAVLTPQFG EARAMEGRDARPSPM
CC_1639   : HHQTDRRRHLAGAVAVAVLGLSTAAAAWATQPART-----
ZP_0095731 : QVRTGSLQRSF LNMMLALPVLLVLAIVLTPRVGALDLVESR-----
                                                    I

                                360           *           380           *           4
YP_757111 : LDDALDLGRLIYQAARRGQAGRVGDLLAGGANPDVRFRGDGTALIAAI
CC_1639   : -----VQQTPEEARAVARHLGR-----PLYDAV
ZP_0095731 : -----LIQAVREGDIALLESRLERGADVNRIPWPTDGTALIEAS
                                                    I           II

                                *           420           *           440
YP_757111 : GDAATVAALLGAGASPD LGIDGDNPMIAAAVSGRDDLVQQLLAAGAD
CC_1639   : KDLQTVRELIALGANPNYIARGDGSPLIEAARNQADVVRALLAAGAD
ZP_0095731 : SDPAMVALLLEAGADPD LVTRQSGTALIAAARAGSLEVVDLLEAGAQ
                                                    II           III

                                460           *           480           *           5
YP_757111 : AEQRGDGNALIAASGRGHVDTVDLLIAAGADPNGYVFHDETPMVNAAQ
CC_1639   : LAVRGDGNPLIQASRVGRLDIVQALVARGADVESFVPGDETPLIGAAL
ZP_0095731 : LAAPQNGSPLINAARGGHLEVISRL LISGADPNGYVPSDETPLINAA
                                                    IV           V

                                *           520           *           540
YP_757111 : HLDVIEHLAAVGADLSLTVRARDRRGREIYRSPLSEARRTGQDHVVAW
CC_1639   : ELAVVKYLVERGADVNRAVEANPGE----MRSPGLMARKNGHASVVNY
ZP_0095731 : QIGAAQLVMAGADLSLTVPAASGDIGGPYRSPLSEAVRHEQTAMTDW
                                                    V           VI

                                560
YP_757111 : ARGAEHRPPSE- : 556
CC_1639   : SRGARD----- : 491
ZP_0095731 : ERGAGHHPPETN : 533

```

Fonte: Valencia, EY (2012).

O domínio citoplasmático metalopeptidase corresponde ao de uma enzima metaloprotease, a qual poderia por proteólise clivar e inibir a capacidade de ligação da proteína reguladora dimérica codificada pelo gene CC1640 (BlaI) ao DNA. Os resultados do item anterior mostram a potencial atividade reguladora da proteína codificada pelo gene CC1640 (BlaI) e para determinar se a proteína se liga ao promotor do operon CC1637-CC1640 realizamos ensaios de mudança da mobilidade eletroforética. Para determinar se BlaR afeta a

ligação do BlaI ao promotor foi realizado o ensaio de inibição de ligação de BlaI ao DNA na presença do domínio metaloprotease de BlaR purificado.

4.1.6.1 Expressão e purificação das proteínas codificadas pelos genes CC1639 (BlaR) e CC1640 (BlaI)

No laboratório foi previamente clonado a região codificadora do gene CC1640 no vetor pPROEX-HTa e cedido para este estudo pela Dra. Vânia Braz. A proteína foi expressa em forma solúvel em *E. coli* DH5 α , após 3 horas de indução com 0,5 mM de IPTG e purificada em resina quelante Ni-NTA. Na Figura 19 podemos observar a expressão (A) e purificação (B) da proteína recombinante com massa molecular aproximado de 19 kD.

Figura 19 - Expressão e purificação da proteína BlaI codificada pelo gene CC1640\ (A) Linha1- Extrato proteico de cultura não induzida, linha 2- Extrato proteico de cultura induzida, linha 3- sobrenadante após sonicação, e linha 4- precipitado após sonicação. (B) purificação da proteína utilizando resina Ni-NTA (Qiagen), Linha 1, 2, 3 e 4 eluição com 100, 200, 300 e 500 mM de imidazol respectivamente. M: Marcador de massa molecular *Dual color protein standard* (Bio-Rad).

Fonte: Valencia, EY (2012).

A região codificadora do domínio peptidase citoplasmático da proteína BlaR de 507 pb, foi clonada no vetor pGEM-T Easy e subclonada no vetor de expressão pPROEX-HTa. A clonagem em ambos os vetores foi confirmada por análise de restrição (Figura 20)

Figura 20 - Confirmação da clonagem do domínio peptidase da proteína BlaR\ Eletroforese em gel de agarose 1%, dos produtos de restrição com enzimas *EcoRI* e *XhoI*. Fragmento de 507 pb codificando o domínio peptidase liberado do vetor pGEM-T Easy (A) e do vetor pPROEX-HTa (B). M= Marcador de massa molecular 1 kb plus ladder (Invitrogen, USA).

Fonte: Valencia, EY (2012).

Para produção da proteína foi utilizada a bactéria *E. coli* linhagens DH5 α ou BL21. A expressão da proteína foi induzida por 4 horas adicionando 0,5 mM de IPTG. O domínio peptidase não é expresso como proteína solúvel e só foi possível obter a proteína utilizando o método de purificação a partir de corpos de inclusão descrito por Marshak *et al.* (1996), apresentando a proteína purificada com massa molecular aproximado de 21,7 kD (Figura 21).

Figura 21 - Expressão e purificação do domínio peptidase da proteína BlaR, a partir de corpos de inclusão\ Linha 1- Extrato proteico da cultura não induzida, linha 2- Extrato proteico da cultura induzida por 4 horas, linha 3 e 4 – Proteína purificada obtida a partir de corpos de inclusão. M: Marcador de massa molecular unstained Protein Ladder (Fermentas). Eletroforese em SDS-PAGE 12%.

Fonte: Valencia, EY (2012).

Após verificar que o domínio peptidase era expresso em corpos de inclusão, quando clonado no vetor pPROEX-HTa, decidimos realizar a clonagem no vetor de expressão pET28a. Este vetor tem um melhor sistema de regulação de expressão, que utilizando uma concentração menor de IPTG, nos permitiu obter uma maior quantidade de proteína recombinante solúvel, devido a que o IPTG induz a expressão da T7 RNA polimerase da célula hospedeira *E. coli* a qual regula o promotor T7 do vetor que dirige a expressão da proteína recombinante), utilizando os oligonucleotídeos 13 e 15 (Tabela 3). O plasmídeo foi introduzido na bactéria *E. coli* BL21 DE-3 para expressão da proteína. Após 3 horas de indução com 0,3 mM de IPTG, foi obtida uma proteína cerca de 20% solúvel, a qual foi purificada por cromatografia de afinidade utilizando resina quelante Ni-NTA. Na figura 22 podemos observar a expressão e purificação da proteína recombinante com massa molecular aproximado de 21,7 kD.

Figura 22 - Expressão e purificação do domínio peptidase da proteína BlaR\ (A) Linha 1- Extrato proteico da cultura não induzida, linha 2- Extrato proteico da cultura induzida por 3 horas; (B) Linha 1 e 2 proteína purificada através de resina de níquel. M: Marcador de massa molecular unstained Protein Ladder (Fermentas). Eletroforese em SDS-PAGE 12%.

Fonte: Valencia, EY (2012).

4.1.6.2 Ensaio de mudança de mobilidade eletroforética

Para verificar se a proteína repressora (BlaI) liga-se à região promotora do operon CC1637-CC1640 realizamos um ensaio de mudança de mobilidade eletroforética. Este ensaio é baseado na observação de que os complexos proteína-DNA migram através de um gel de poliacrilamida não desnaturante, mais lentamente que o fragmento de DNA livre.

Para este ensaio utilizamos 35 e 55 ng de proteína purificada BlaI com 0,5 µg de DNA (DNA que contém a região promotora do operon CC1637- CC1640 ou DNA controle que contém a região intergênica dos genes CC1638-CC1639 com 307 e 363 pb, respectivamente). O resultado mostrado na Figura 23 revela o sucesso deste ensaio, na qual as linhas 2 e 3 mostram que a proteína BlaI liga se a seu próprio promotor e não à outra região não específica de DNA, linha 4 e 5.

Figura 23 - Análise de interação da proteína recombinante BlaI ao DNA do promotor do gene CC1640, pela mudança de mobilidade eletroforética\ Eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante 5%, linha 1 – Controle negativo, DNA sem adição da proteína BlaI, linha 2- DNA com 35 ng de proteína BlaI, linha 3 – DNA com 55 ng de proteína BlaI, linhas 4 e 5 - ensaio sem e com 55 ng da proteína BlaI, respectivamente, incubada com uma região de DNA não específica (363 pb). O gel foi corado com brometo de etídio.

Fonte: Valencia, EY (2012).

Com o intuito de determinar se a proteína com domínio peptidase codificada pelo gene CC1639 (BlaR), inibe a ligação do putativo fator de transcrição (proteína BlaI) ao seu promotor, se realizou a análise de inibição de mudança da mobilidade eletroforética, como mostrado na Figura 24. Observamos que na linha 3, a mudança de mobilidade eletroforética foi inibida, quando a proteína BlaI foi pré-incubada com a peptidase.

Figura 24 - Análise de inibição da interação da proteína reguladora BlaI com o promotor na presença da proteína com domínio peptidase (BlaR), pela inibição de mudança da mobilidade eletroforética\ Linha 1- controle negativo, linha 2- controle positivo, linha 3- proteína peptidase incubada por 16 horas com a proteína BlaI, antes da análise. Eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante 5%, corado com brometo de etídio.

Fonte: Valencia, EY (2012).

4.1.7 Identificação de putativos genes regulados pela proteína BlaI

A fim de avaliar a similaridade da proteína BlaI de *C. crescentus* (CC1640), através de alinhamentos completos com proteínas de diferentes organismos, foi utilizado o programa *Align*, do pacote de programas BLAST (NCBI-USA). Na análise comparativa foram obtidos valores de 30% de similaridade a proteína MecI de *Staphylococcus aureus* (CAA45143) e 31% de similaridade com as proteínas BlaI de *Staphylococcus aureus* (AAQ84125) e Rv1846c (BlaI) de *Mycobacterium tuberculosis* (NP_216362). A similaridade das seqüências das proteínas é mostrada através do alinhamento múltiplo, feito com o programa Clustal X e editado no programa GeneDoc (Figura 25).

Figura 25 - Alinhamento da sequência de aminoácidos de proteínas BlaI (CC1640) de *C. crescentus*, BlaI-Sa de *Staphylococcus aureus*, MecI-Sa de *Staphylococcus aureus* e Rv1846c de *Mycobacterium tuberculosis*. Aminoácidos idênticos são marcados num fundo amarelo, no fundo cinza ou azul claro são marcados os aminoácidos conservados. A seta vermelha indica o sítio de clivagem (entre os aminoácidos asparagina-N e fenilalanina-F) na forma dimérica da proteína BlaI, pela peptidase BlaR.

Fonte: Valencia, EY (2012).

Considerando que a proteína repressora BlaI de *Staphylococcus aureus* e a proteína BlaI de *Mycobacterium tuberculosis* se ligam à sequência consenso **TACANNTGTA** (Safo *et al.*, 2005) e **TACG/TAC<5>GTA/CGTA** (Sala *et al.*, 2009), respectivamente, foi realizada uma análise da sequência de DNA da região promotora do operon CC1637-CC1640, que nos permitiu identificar uma putativa sequência consenso **TTACGNNCGTAA**, na qual poderia se ligar a proteína BlaI (CC1640). A Figura 26 mostra a localização de dois consensos **TTACGNNCGTAA**, em relação à região -10 e -35 do promotor predito do gene CC1640.

- **CC2661**, regulador transcricional da família GntR, de 238 aminoácidos.
- **CC2895**, proteína hipotética de 180 aminoácidos.
- **CC3354**, proteína H de 121 aminoácidos que faz parte do sistema que cliva glicina.
- **CC3647**, proteína hipotética de 32 aminoácidos.
- **CC1641**, proteína hipotética, de 192 aminoácidos. Gene divergente ao CC1640, os sítios identificados são os mesmos deste gene.

Tabela 10 - Genes apresentando a putativa sequência de ligação da proteína BlaI

Gene	Acesso ^a	Proteína ^b	Início ^c	Fim ^c	Consenso identificado	Score
CC1098	AAK23082	Hipotética	-64	-53	TTGCGAACGTAA	0,92
CC1457	AAK23438	FlmG	-85	-74	TTGCGACCGTAA	0,92
CC1458	AAK23439	FlbT	-129	-118	TTACGGTCGCAA	0,92
CC1509	AAK23488	<i>2-keto-4-pentenoate hydratase</i>	-225	-214	TTACATCCGTAA	0,92
CC1510	AAK23489	Putativo regulador transcricional da família BlaI.	-19	-8	TTACGGATGTAA	0,92
CC2661	AAK24628	Putativo regulador transcricional da família GntR	-273	-262	TTAGGGTCGTAA	0,92
CC2895	AAK24859	Hipotética	-77	-66	TTACGATTGTAA	0,92
CC3354	AAK25316	Putativa proteína H	-40	-29	TTACGTCCGCAA	0,92
CC3647	AAK25609	Hipotética	-129	-118	TTACGCGCGTCA	0,92
CC1639	AAK23617	Proteína relacionada ankirina	-397	386	GTTACTGCGTAA	1.00
CC1641	AAK23619	Proteína hipotética	-115	-104	TTACGCACGTAA	1.00
CC1641	AAK23619	Proteína hipotética	-82	-71	TTACGCACGTAA	1.00

^a Banco de dados GenBank (NCBI, USA). ^b Identificação da proteína no GenBank. ^c Em relação ao ATG.

Fonte: Valencia, EY (2012).

Análise computacional similar ao anterior foi realizada, utilizando o consenso **TACGNNCGTA** (apresentando uma base a menos a cada lado, em relação ao consenso da pesquisa anterior) e os mesmos parâmetros descritos anteriormente, a pesquisa identificou

vários outros genes que poderiam ser putativamente regulados pela a proteína repressora BlaI. Dentre eles, temos dois que poderiam ser de interesse para este trabalho:

- **CC1568**, proteína hipotética conservada (AAK23547) de 436 aminoácidos. O gene codifica uma putativa proteína pertencente a superfamília transpeptidase com serina conservada (*Conserved Domains and Protein Classification* cl01009) e apresenta multidomínio de β -lactamase classe C (*Clusters of Orthologous Groups of proteins*, COG1680).
- **CC1230**, proteína de efluxo Bcr-CflA de resistência a drogas de 405 aminoácidos (Acesso AAK23212).

4.1.8 Análises semi quantitativa da expressão dos genes CC1230, CC1568 e CC2661

De acordo ao resultado anterior decidimos realizar análise de expressão relativa dos genes que tinham envolvimento com resposta a antibiótico (CC1230, CC1568 e CC2661). Nesta análise utilizamos a técnica de RT-PCR semi quantitativa para medir a expressão destes genes na linhagem NA1000 e na linhagem mutante Δ CC1640. Neste ensaio foi necessário adicionar o antibiótico cefalexina (CFE) 35 ug/mL no meio de cultura para induzir a expressão destes genes. Para determinar a expressão relativa destes genes por RT-PCR foi necessário aumentar o número de ciclos de 25 (dados não mostrados) para 30 ciclos porque os genes são pouco expressos.

A Figura 27 mostra o resultado da quantificação de expressão relativa do gene CC1568. Observou-se uma queda de 80% da expressão deste gene na linhagem mutante Δ CC1640 quando comparada com a linhagem selvagem NA1000 (100%).

A Figura 28 mostra o resultado da quantificação de expressão relativa dos genes CC1230 e CC2661. Foi observado que na linhagem mutante Δ CC1640 houve uma queda de 70% da expressão relativa no gene CC1230 e um aumento de 2 vezes na expressão relativa do gene CC2661, quando comparada com a linhagem selvagem NA1000 (100%). O gene CspD foi utilizado como controle para esta análise, sendo que a expressão deste gene não se altera, tanto na linhagem NA1000 como a linhagem mutante Δ CC1640.

Figura 27 - Análise por RT-PCR semi quantitativo para determinar a expressão relativa do gene CC1568\ (A) Produtos de RT-PCR semi quantitativo da expressão relativa dos genes em estudo, os valores quantificados são mostrados no gráfico B. (B) Histograma representando a quantificação de intensidade de cada banda do produto de RT-PCR, análises utilizando o programa imageJ. O gene *cspD*, foi utilizado como controle. Eletroforese dos produtos de RT-PCR em gel de agarose 1%. M: marcador de massa molecular 1 kb DNA ladder plus (Fermentas, USA).

Figura 28 - Análise por RT-PCR semi quantitativo para determinar a expressão relativa dos genes CC1230 e CC2661\ (A) Produtos de RT-PCR semi quantitativo da expressão relativa dos genes em estudo, os valores quantificados são mostrados no gráfico B. (B) Histograma representando a quantificação de intensidade de cada banda do produto de RT-PCR, análises utilizando o programa imageJ. O gene CspD, foi utilizado como controle. Eletroforese dos produtos de RT-PCR em gel de agarose 1%. M: marcador de massa molecular 1 kb DNA ladder plus (Fermentas, USA).

Fonte: Valencia, EY (2012).

Parte 2

Comparação de dois agrupamentos de
genes pertencentes a família RND

4. 2 Comparação de dois sistemas de efluxo da família RND

Braz e Marques (2005) caracterizaram o primeiro sistema de efluxo da família RND de *C. crescentus* (constituído pelos genes CC2720, CC2722 e CC2724), mediante a inserção do transposon Tn5lacZ, determinando a participação na homeostase a os metais cádmio e zinco. Análise computacional do genoma de *C. crescentus* identificou outro sistema de efluxo da família RND constituídos pelos genes CC2388, CC2389 e CC2390 que codificam proteínas do subgrupo HME-RND (Nies, 2003). Proteínas pertencentes a este subgrupo podem conferir resistência a cádmio, zinco e cobalto (subgrupo HME1-RND) ou níquel e cobalto (subgrupo HME2-RND).

Considerando que estamos estudando os mecanismos de resposta a metais em *C. crescentus*, nesta segunda parte do trabalho apresentamos a análise comparativa destes dois sistemas de efluxo da família RND a fim de estabelecer seu papel, em resposta aos metais cádmio, zinco, níquel e cobalto.

Assim, os resultados apresentados neste trabalho complementam e ampliam nosso conhecimento dos mecanismos moleculares em resposta a metais de *C. crescentus*, que por ser uma bactéria oligotrófica está exposta a diferentes tipos de ambientes aquáticos (água marinha e água doce). Os mecanismos de resposta a metais podem ser de especial interesse para uma potencial aplicação biotecnológica especialmente para detecção de metais no meio ambiente (biosensor).

4.2.1 Análise comparativa dos genes em estudo

A Figura 29 mostra um esquema da localização no genoma de *C. crescentus*, do agrupamento de genes CC2720 - CC2725, em estudo.

Figura 29 - Representação linear de parte do genoma de *Caulobacter crescentus* e localização dos genes CC2720-CC2725\ A direção de transcrição é mostrada por setas. A cor dos genes indica sua categoria funcional: Preto e branco = proteínas hipotéticas, azul= proteínas que fazem parte do sistema RND. Vermelho= coordenadas do cromossomo, como mostrado no “The Institute for Genomic Research” (TIGR, www.tigr.org).

Fonte: “The Institute for Genomic Research” (TIGR, www.tigr.org).

A análise computacional comparativa dos genes com o banco de dados (TIGR, USA) mostrou que o gene:

- **CC2720**, codifica uma proteína hipotética de 127 aminoácidos;
- **CC2721**, codifica um fator de membrana externa para efluxo ou transporte, pertencente à família OMF (PF02321), com 412 aminoácidos;
- **CC2722**, codifica uma proteína de membrana para efluxo de metal, pertencente à família RND, subunidade MFP (TIGR01730), com 411 aminoácidos.
- **CC2723**, codifica uma proteína hipotética de 159 aminoácidos;
- **CC2724**, codifica uma proteína de efluxo a metal da família RND (TIGR00914), com 1080 aminoácidos.
- **CC2725**, codifica uma proteína hipotética de 113 aminoácidos. Localizado na mesma orientação de transcrição, está o gene CC2726, que codifica uma proteína ATPase CadA, separados por 405 pares de bases.

A Figura 30 mostra um esquema da localização no genoma de *C. crescentus*, do agrupamento de genes CC2388 - CC2390.

Figura 30 - Representação linear de parte do genoma de *Caulobacter crescentus* contendo os genes CC2388-CC2390. A direção de transcrição é mostrada por setas. Vermelho= coordenadas do cromossomo, como mostrado no “The Institute for Genomic Research” (TIGR, www.tigr.org).

Fonte: “The Institute for Genomic Research” (TIGR, www.tigr.org).

A análise computacional, comparativa dos genes alvos deste estudo com o banco de dados (TIGR, USA) mostrou que o gene:

- **CC2388**, codifica uma proteína de efluxo de membrana externa (Acesso PF02321) OMP, com 421 aminoácidos.
- **CC2389**, codifica uma proteína de efluxo RND, subunidade MFP (Acesso TIGR01730) de 420 aminoácidos.
- **CC2390**, codifica uma proteína de efluxo a metais pesados da família CzcA (Acesso TIGR00914) de 1043 aminoácidos.

A análise computacional do genoma de *C. crescentus*, identificou 6 genes páralogos ao gene CC2724, dos quais:

- 3 genes (CC3120, CC0807 e CC1204), fazem parte da família de proteínas AcrB/AcrD/AcrF;
- 2 genes (CC3197 e CC1788) fazem parte de um sistema de efluxo RND que transporta moléculas hidrofóbicas e hidrofílicas (HAE1), e;
- O gene CC2390 que codifica uma putativa proteína CzcA, que faz parte de um sistema de efluxo a metais pesados.

O alinhamento comparativo das sequências de aminoácidos das proteínas parálogas ao gene CC2724, mostrou que a proteína codificada pelo gene CC2390 tem 56% de identidade com a proteína CC2724. No alinhamento são identificados os motivos - DFG-DGA-VEN - (Figura 30) pertencentes a proteínas do subgrupo HME-RND, que conferem resistência a metal cádmio/ zinco/cobalto (HME1-RND) ou níquel/cobalto (HME2-RND) (Nies, 2003).

Apenas com base nesta assinatura não é possível distinguir quais são os íons transportados, sendo necessários experimentos fisiológicos para esta definição. Também foi identificada a assinatura AVG-DDA-VEN na sequência da proteína codificada pelo gene CC1204 que corresponde ao motivo em resposta a níquel, que não é alvo deste trabalho. No anexo 1A mostramos o alinhamento dos aminoácidos codificados pelos genes CC2724, CC2390 e das proteínas CnrA, CzcA, NccA de *Ralstonia metallidurans* que fazem parte de sistema de efluxo da família RND em resposta a metais. No anexo B mostramos uma tabela que contém a porcentagem de identidade destes genes.

Figura 31 - Alinhamento parcial da sequência de aminoácidos dos genes parálogos ao gene CC2724\ Caixas em vermelho identificam a assinatura de proteínas que conferem resistência a metais cádmio, zinco, cobalto e níquel. Linha azul identificam a assinatura de proteína que confere resistência a níquel. O alinhamento foi obtido com o programa Align, do pacote de programas Blast (NCBI).

	460	*	480	*	500	
CC_1204	: VLA <u>VGLVDDA</u> IVV <u>VENI</u> QRRVDD-GEPPL-----VAAERGTRQVF					: 432
CC_0807	: VLAIGLLVDDAIVVVENVERVMSEEGLSPK-----EATRKSMEIT					: 440
CC_2724	: AL <u>DFGLIV</u> <u>DGAVII</u> <u>VEN</u> SLRRLAERQHQEGRLTSSERLHETREAAREMI					: 473
CC_2390	: AL <u>DFGLIV</u> <u>DGAVII</u> <u>VEN</u> CLRRLGEAQHRYGRLLSRDERFALVAGATSEVI					: 449
CC_3197	: TLVIGILVDDAVVEIENIEKRVARGQRPFQ-----AAMEGADAIG					: 444
CC_3120	: VLSLGLLVDDSIIVITENIARRIREGEERTE-----AAVNGARQIG					: 430
CC_1788	: ILSLGLLVDDAIIIIETIVVKMEEGKDRIS-----AATYAWGHTA					: 433

Fonte: Valencia, EY (2012).

4.2.2 Análise da expressão dos genes CC2720, CC2721 e CC2388

Para determinar o padrão de expressão dos genes CC2720, CC2721 e CC2388, utilizamos o gene repórter *lacZ* do vetor pRK*lacZ*290, a montante do qual foi inserida a putativa região promotora do gene CC2720 ou CC2721. Considerando que existe uma região intergênica de 200 pb entre os genes CC2719 e CC2720 e outra de 57 pb com o gene CC2720 e CC2721, analisamos estas duas regiões para determinar qual destas possui atividade de promotor e controla a expressão do agrupamento de genes CC2720-CC2725.

Foram amplificados fragmentos de 454 pb e de 430 pb que contem as regiões intergênicas de 200 pb (a montante do gene CC2720) e 57 pb (a montante do gene CC2721), respectivamente. Estes fragmentos foram clonados no vetor pGEM T-Easy, sequenciados e subclonados no vetor pRK*lacZ*290. A Figura 32 mostra a clonagem dos promotores no vetor pRK*lacZ*290. O plasmídeo p2388*lacZ* foi construído anteriormente em nosso laboratório e cedido para este trabalho.

Figura 32 - Confirmação da clonagem do promotor dos genes CC2720 e CC2721 no plasmídeo pRKlacZ290\ (A) Produto de PCR utilizando oligonucleotídeos específicos do vetor, linha 1 e 2- amplificação do promotor do gene CC2720 (454 pb do promotor mais 150 pb do vetor), linha 3- amplificação do vetor sem inserto (150 pb). (B) Produto de PCR, linha 1 e 2- amplificação do promotor do gene CC2721 (430 pb) utilizando oligonucleotídeos específicos do promotor, e linha 3 e 4 amplificação utilizando um oligonucleotídeo específico do promotor (*Forward*) e oligonucleotídeo (*Reverse*) do vetor amplificando um produto de 480 pb (430 pb de promotor mais 50 pb do vetor). Eletroforeses em gel de agarose 1%. M: marcador de massa molecular 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen).

Fonte: Valencia, EY (2012).

Os plasmídeos contendo as regiões promotoras foram inseridos por conjugação na linhagem NA1000, utilizando a bactéria *E. coli* S17-1. Ensaio de atividade da enzima β -galactosidase, mostraram que o possível promotor do gene CC2720 possui uma atividade de 407 e 770 Unidades Miller na fase exponencial e estacionária, respectivamente, enquanto que o possível promotor do gene CC2721 mostrou baixa atividade, com 79 e 137 Unidades Miller na fase exponencial e estacionária, respectivamente (Figura 33). Considerando os valores obtidos, assumimos que a região intergênica entre os genes CC2720 e CC2721 não possui um promotor, e que não poderia estar regulando a expressão dos genes pertencentes a este sistema RND (CC2721, CC2722 e CC2724), já que possui atividade equivalente a atividade de β -galactosidase do vetor pRKlacZ290 sem inserto (Figura 11).

A análise do promotor pertencente ao gene CC2388 através de ensaio de β -galactosidase mostrou uma atividade de 164 e 418 U Miller na fase exponencial e estacionária, respectivamente. Assim, os resultados mostram que os genes CC2720 e CC2388 são induzidos na fase estacionária.

Figura 33 - Análise do padrão de expressão dos genes CC2720, CC2721 e CC2388 na linhagem *C. crescentus* NA1000\ LOG: fase de crescimento exponencial e EST: fase de crescimento estacionária. A expressão foi determinada pela medida de atividade de β -galactosidase da linhagem NA1000 carregando o vetor p2720lacZ, p2721lacZ, p2388lacZ, respectivamente. Os asteriscos acima das barras indicam que a diferença é estatisticamente significativa.

Fonte: Valencia, EY (2012).

4.2.3 Análise da co-transcrição entre os genes CC2720-CC2721

Considerando o resultado anteriormente obtido, que mostrou apenas um promotor a montante de gene CC2720, decidimos determinar se os genes CC2720-CC2721 eram co-transcritos e, para isso, utilizamos a técnica de RT-PCR. Para esta análise utilizamos oligonucleotídeos internos localizados entre os dois genes (oligonucleotídeos 7 e 8, Tabela 3). A Figura 34 mostra o resultado obtido, onde verificamos que o gene CC2720 é co-transcrito com o gene CC2721 que amplificam um fragmento de 430 pb. Este resultado confirma que os genes CC2720 a CC2724 provavelmente constituem um operon, já que não há espaçamento entre os genes CC2721 a CC2724. Da mesma forma, o espaçamento entre os genes CC2388 a CC2390 sugere que também sejam co-transcritos.

Figura 34 - Determinação da co-transcrição dos genes CC2720-CC2721\ Produtos de RT-PCR, linha 1 amplificação com oligonucleotídeos 7 e 8 (430 pb). Produto de PCR, linha 2 e 3- Controle positivo (usando como molde 1 µg de gDNA) e controle negativo (usando como molde 1 µg de RNA), respectivamente. Eletroforese em gel de agarose 1%. M: Marcador de massa molecular 1 kb DNA ladder plus (Fermentas). Na parte superior é mostrada uma representação esquemática do cluster CC2720-CC2725, mostrando a região amplificada por RT-PCR.

Fonte: Valencia, EY (2012).

4.2.4 Análise do padrão de expressão dos genes CC2720 e CC2388 na presença de metais cádmio, zinco, cobalto e níquel

As atividades dos promotores dos genes CC2720 e CC2388 foram determinadas pela medida da atividade da enzima β -galactosidase.

Culturas de *C. crescentus* foram incubadas em meio PYE a 30 °C até uma $DO_{600}= 0,5$ e a seguir foram distribuídas em frascos, com ou sem adição do estresse (metais Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} e Co^{2+} em diferentes concentrações). A atividade de β -galactosidase foi determinada após 0, 2, 4, 6, 24 e 48 horas da adição dos metais.

A Figura 35A, mostra o padrão de expressão da fusão p2720lacZ, na presença de metais Cd^{2+} e Ni^{2+} . Na presença de cádmio, observamos um aumento de expressão estatisticamente significativo quando comparada com o controle (sem adição de metal), 1,6 vezes após 6 horas (10µM), 2,6 e 2,7 vezes após 24 horas (na concentração de 10µM e 25

μM , respectivamente) e 2,9 vezes após 48 horas ($10 \mu\text{M}$). Na presença de níquel, observamos uma indução menor, sendo 1,2 vezes após 6 horas ($50 \mu\text{M}$), 1,3 e 1,5 vezes após 6 e 24 horas ($100 \mu\text{M}$), respectivamente.

A Figura 35B, mostra o padrão de expressão da fusão *p2388lacZ*, na presença dos metais Cd^{2+} e Ni^{2+} . Na presença de cádmio não se observa indução significativa em todas as condições testadas, em relação ao controle. Na presença de níquel, a indução é estatisticamente significativa em todos os tempos e concentrações testadas, sendo a melhor indução na concentração de $100 \mu\text{M}$, que corresponde a uma indução de 2; 1,71; 3,3 e 2,83 vezes maior, quando comparada com o controle (sem adição de metal), após 4, 6, 24 e 48 horas de indução, respectivamente.

A Figura 36A, mostra o padrão de expressão da linhagem NA1000 contendo o plasmídeo *p2720lacZ*, na presença dos metais Zn^{2+} e Co^{2+} . Na presença de zinco, observamos um aumento de expressão estatisticamente significativo quando comparada com o controle (sem adição de metal), de 1,4 vezes nas duas concentrações testadas após 6 horas (50 e $100 \mu\text{M}$) e indução de 1,7 vezes após 24 horas na concentração de $100 \mu\text{M}$, não observando indução de expressão nas duas concentrações testadas após 48 horas. Na presença de cobalto, observamos um aumento de expressão quando comparada com o controle (sem adição de metal), após das 6 horas, sendo a maior indução na concentração de $175 \mu\text{M}$, com 2,3 e 2,1 vezes, após 24 e 48 horas, respectivamente.

A Figura 36B, mostra o padrão de expressão da linhagem NA1000 contendo o plasmídeo *p2388lacZ*, na presença dos metais Zn^{2+} e Co^{2+} . Na presença de zinco, observamos um aumento de expressão de 1,5 vezes, quando comparado com o controle (sem adição de metal), após 24 e 48 horas nas duas concentrações testadas. Na presença de cobalto o promotor é induzido com valores estatisticamente significativos em relação ao controle (sem adição do metal), em todas as concentrações testadas. Após duas horas observamos um aumento da indução de 1,9 vezes com 50 e $100 \mu\text{M}$, em 4 horas atinge indução de 2 vezes na concentração de $100 \mu\text{M}$, em 6 horas todas as concentrações testadas alcançam 1,5 vezes. Em 24 horas a indução é 2,2; 2,7 e 2,3 vezes nas concentrações de 50 , 100 e $200 \mu\text{M}$ respectivamente, já em 48 horas a indução é de 1,7 vezes em todas as concentrações testadas.

Os resultados mostram que os genes CC2720-CC2722-CC2724 e CC2388-CC2389-CC2390, codificam dois sistemas de efluxo da família RND com diferentes resposta a metais. O sistema de efluxo constituído pelos genes CC2388-CC2390, não é induzido na presença de cádmio e sim na presença de níquel e cobalto, sugerindo que poderia pertencer ao subgrupo da família HME2-RND. O sistema CC2720-CC2725 é altamente induzido na presença de

cádmio, moderadamente induzido na presença de zinco e cobalto e pouco induzido na presença de níquel, sugerindo que poderia pertencer ao subgrupo da família HME1-RND.

Figura 35 - Análise do padrão de expressão dos genes CC2720 e CC2388, na ausência e presença de metais cádmio e níquel\ Ensaios na ausência e presença de metais: cloreto de cádmio 10 e 25 μM e cloreto de níquel 50 e 100 μM , utilizando meio PYE e linhagem sem ação, como controle. Os asteriscos acima das barras indicam que a diferença é estatisticamente significativa. A expressão foi determinada pela medida de atividade de β -galactosidase da linhagem NA1000 carregando o vetor p2720*lacZ* (A) e P2388*lacZ* (B) respectivamente.

Fonte: Valencia, EY (2012).

Figura 36 - Análise do padrão de expressão dos genes CC2720 e CC2388, na ausência e presença de metais zinco e cobalto/ Análise do padrão de expressão dos gene CC2720 (A) e CC2388 (B), na ausência e presença de metais: cloreto de zinco 50 e 100 μM e cloreto de Cobalto 50 - 200 μM , utilizando meio PYE, e linhagem sem adição como controle. Os asteriscos acima das barras indicam que a diferença é estatisticamente significativa. A expressão foi determinada pela medida de atividade de β -galactosidase da linhagem NA1000 carregando o vetor p2720*lacZ* (A) e P2388*lacZ* (B) respectivamente.

Fonte: Valencia, EY (2012).

4.2.5 Obtenção de linhagens mutantes

Para este estudo realizamos a deleção dos genes CC2724, CC2390 e duplo mutante CC2724/CC2390, porque são genes chaves que expressam proteínas de membrana interna com motivos de reconhecimento a metal. As deleções foram efetuadas utilizando o vetor pNPTS138, onde foram clonados os fragmentos para deleção dos genes CC2390 e CC2724 . O vetor construído foi inserido na linhagem NA1000 para conseguir a deleção dos genes CC2724 e CC2390 ou na linhagem Δ CC2724 para obtenção do duplo mutante. A deleção de cada gene foi realizada da seguinte forma:

Linhagem Δ CC2724: fragmentos de DNA flanqueadores do gene alvo foram obtidos por PCR utilizando o par de oligonucleotídeos del2724-1/del2724-2 (a) e del2724-3/del2724-4 (b), que amplificam fragmentos de 785 e 752 pb, respectivamente, que foram ligados no vetor pNPTS138 (Figura 37). A primeira recombinação homóloga foi confirmada pela resistência ao antibiótico canamicina. Após a segunda recombinação homóloga o produto de PCR foi de 792 pb utilizando os oligonucleotídeos del27242F/del2724-4, confirmando a deleção (Figura 38).

Linhagem Δ CC2390: fragmentos de DNA flanqueadores do gene alvo foram obtidos por PCR utilizando o par de oligonucleotídeos del2390-1/del2390-2 (a) e del2390-3/del23904 (b), que amplificam fragmentos de 870 e 654 pb, respectivamente, que foram ligados no vetor pNPTS138 (Figura 37). A primeira recombinação homóloga foi confirmada pela resistência ao antibiótico canamicina. Após a segunda recombinação homóloga o produto de PCR foi de 704 pb, utilizando os oligonucleotídeos del23902F/del2390-4 confirmando a deleção (Figura 38)

Linhagem Δ CC2724 Δ CC2390: utilizamos a linhagem mutante Δ CC2724 como parental e realizamos o mesmo procedimento como mencionado anteriormente para deleção do gene CC2390.

Figura 37 - Confirmação da clonagem dos fragmentos flanqueadores para deleção dos genes CC2390 (A) e CC2724 (B), no vetor pNPTS138/ Em (A): linha 1- Digestão do vetor com enzimas de restrição *Hind*III e *Bam*HI confirmando o fragmento de 870 pb, flankador A; linha 2- Digestão do vetor com enzimas de restrição *Hind*III e *Mlu*I, confirmando o fragmento de 1524 pb contendo a soma dos fragmentos A (870 pb) e B (654 pb). Em (B): linha 1- Digestão do vetor com enzimas de restrição *Hind*III e *Mlu*I, confirmando o fragmento de 1537 pb contendo a soma dos fragmentos A (752 pb) e B (785 pb). Eletroforese em gel de agarose 1%. M: marcador de massa molecular 1 Kb plus DNA ladder (Invitrogen).

Fonte: Valencia, EY (2012).

Figura 38 - Confirmação por PCR da deleção dos genes e obtenção das linhagens mutantes Δ CC2724 (A), Δ CC2390 (B) e Δ CC2724 Δ CC2390 (C). A reação de PCR foi feita utilizando oligonucleotídeos específicos para cada mutante. Eletroforese em gel de agarose 1%. M: Marcador de massa molecular 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen).

Fonte: Valencia, EY (2012).

4.2.6 Análises do fenótipo das linhagens mutantes Δ CC2724 e Δ CC2390

A tolerância das linhagens mutantes a metais foi determinada através de testes utilizando cloreto de cádmio (50 μ M), cloreto de cobalto (50 e 100 μ M), e cloreto de níquel (50 e 100 μ M). A linhagem controle NA1000 e linhagens mutantes Δ CC2724 e Δ CC2390, foram incubadas a 30 °C até atingir uma $DO_{600}=0,5$, e a seguir foram semeadas com alça calibrada (10 μ L) em placas contendo meio PYE ágar e a concentração do metal a ser testada.

A Figura 39 mostra o resultado desta análise, mostrando que na presença de cloreto de cádmio, na concentração de 50 μ M a linhagem NA1000 cresce e as linhagens mutantes não crescem. Na presença de cloreto de cobalto, na concentração de 50 μ M se observou crescimento das 3 linhagens testadas, e na concentração de 100 μ M, foi observado que a linhagem Δ CC2390 não cresce, mostrando sensibilidade a essa concentração. Na presença de

cloreto de níquel se observou crescimento das 3 linhagens testadas na concentração de 50 μM , e na concentração de 100 μM a linhagem mutante ΔCC2390 cresce menos, mostrando pouca sensibilidade a essa concentração.

A Figura 40 mostra o resultado de uma segunda análise de crescimento na presença de cloreto de zinco (50-150 μM) e cloreto de níquel (50-100 μM) das linhagens NA1000, ΔCC2724 , ΔCC2390 e do duplo mutante $\Delta\text{CC2724}\Delta\text{CC2390}$. Neste ensaio as células foram semeadas (10 μL) quando atingiram uma $\text{OD}_{600}=0,3$. Na presença de cloreto de zinco e níquel na concentração de 50 μM todas as linhagens testadas cresceram (Figura 40 A). Na presença de cloreto de Zinco 150 μM a linhagem NA1000 apresentou crescimento enquanto que as demais linhagens não cresceram. Já na presença de cloreto de níquel 100 μM a linhagem NA1000 e ΔCC2724 apresentou crescimento, enquanto que a linhagem ΔCC2390 e duplo mutante $\Delta\text{CC2724}\Delta\text{CC2390}$ não cresceram, mostrando sensibilidade a essa concentração (Figura 40 B).

Figura 39 - Crescimento das linhagens mutantes Δ CC2724, Δ CC2390 e linhagem NA1000 na presença dos metais cádmio, cobalto e níquel/ As culturas foram incubadas a 30 °C por 72 horas em meio PYE-ágar contendo 50 μ M de cloreto de cádmio, 50-100 μ M de cloreto de cobalto e 50-100 μ M de cloreto de níquel.

Fonte: Valencia, EY (2012).

Figura 40 - Crescimento das linhagens mutantes Δ CC2724, Δ CC2390, Δ CC2724 Δ CC2390 e linhagem NA1000 na presença dos metais zinco e níquel/ As culturas foram incubadas a 30 °C por 72 horas em meio PYE- ágar contendo 50-150 μ M de cloreto de zinco e 50 - 100 μ M de cloreto de níquel.

Fonte: Valencia, EY (2012).

4.2.7 Complementação das linhagens mutantes Δ CC2724 e Δ CC2390

Para complementar as linhagens mutantes empregamos o vetor pNPT228XNE (ver Materiais e Métodos), que apresenta promotor induzível por xilose e na presença deste açúcar o gene sob seu controle é expresso. A Figura 41 mostra a obtenção dos plasmídeos comp2724pNPT228XNE e comp2390pNPT228XNE, que contêm a região codificadora de cada gene clonada na orientação correta. Na confirmação da clonagem utilizamos enzimas de restrição específicas do vetor e sequência interna do fragmento inserido sendo *EcoRI* e *EcoRI/EcoRV* respectivamente, originando um produto de 6388, 973 e 1882 pb para o

plasmídeo comp2724pNPT228XNE e de 8333 e 799 pb para o plasmídeo comp2390pNPT228XNE.

Figura 41 - Confirmação da construção dos plasmídeos comp2724pNPT228XNE (A) e comp2390pNPT228XNE (B)/ Na análise foram utilizadas enzimas de restrição específicas do vetor e do fragmento clonado. (A) O plasmídeo comp2724pNPT228XNE foi digerido com a enzima *EcoRI* originando 3 fragmentos. (B) O plasmídeo comp2390pNPT228XNE, foi digerido com as enzimas *EcoRI*/*EcoRV* originando 2 fragmentos. Eletroforese em gel de agarose 1%, M: marcador de massa molecular 1 kb DNA ladder plus (Fermentas).

Fonte: Valencia, EY (2012).

Os plasmídeos construídos foram inseridos na linhagem mutante respectiva, Δ CC2724 (plasmídeo comp2724pNPT228XNE) ou Δ CC2390 (plasmídeo comp2390pNPT228XNE) por conjugação, utilizando a bactéria *E. coli* S17-1.

As linhagens mutantes e complementadas dos genes CC2724, CC2390, e linhagem controle NA1000, foram semeadas (10 μ L) em meio PYE ágar canamicina na presença de xilose 0,2%, com adição do metal a ser testado. Foi necessário inserir o plasmídeo pNPT228XNE na linhagem NA1000 e linhagens mutantes para poder comparar o crescimento na presença de canamicina e obter os resultados apresentados. Os resultados (Figura 42)

mostraram que na presença de cloreto de cádmio (35 μM) e cloreto de cobalto (50 μM), as linhagens complementadas se desenvolveram igual à linhagem NA1000 controle, enquanto que as linhagens mutantes originais apresentaram menor crescimento. Também observamos que a presença de xilose influencia dando um maior crescimento, se comparamos com os ensaios anteriores. Na presença de níquel (100 μM) os mutantes simples ΔCC2390 e ΔCC2724 sem plasmídeo pNPT228XNE, haviam apresentado menor crescimento quando comparados com a linhagem NA1000. Entretanto neste ensaio apresentaram um crescimento somente um pouco menor que a linhagem controle. Na presença de zinco 100 μM todas as linhagens testadas cresceram.

No andamento deste trabalho também realizamos análises de sensibilidade na presença de 21 discos de antibióticos (ver Materiais e Métodos) das linhagens mutantes ΔCC2724 e ΔCC2390 . Não foram verificadas diferenças significativas em relação ao controle. A razão pela qual foi realizado este teste se fundamenta em que, estes sistemas por serem bombas de efluxo de cátions divalentes, poderiam também funcionar como um mecanismo de defesa aos antibióticos.

Figura 42 - Análise de complementação das linhagens mutantes Δ CC2724 e Δ CC2390 utilizando os plasmídeos Comp2724-pNPT228XNE e Comp2390-pNPT228XNE/ Linhagens foram crescidas em meio PYE ágar a 30 °C por 72 horas contendo 35 μ M de cloreto de cádmio, 50 μ M de cloreto de cobalto, 100 μ M de cloreto de níquel e 100 μ M de cloreto de zinco com adição de canamicina e xilose 0,2 %. As linhagens NA1000, Δ CC2724 e Δ CC2390 contém o plasmídeo pNPT228XNE vazio que confere resistência na presença do antibiótico canamicina imprescindível para este ensaio.

Fonte: Valencia, EY (2012).

5 DISCUSSÃO

Todas as células sentem e reagem a mudanças em seu meio ambiente. Microorganismos de vida livre, em particular, se deparam com flutuações nas concentrações de nutrientes, no pH, na temperatura e na osmolaridade externa, assim como, podem sofrer exposições à radiação ultravioleta e a uma grande diversidade de substâncias e compostos potencialmente tóxicos (Chen *et al.*, 2003), como íons de metais, antibióticos e xenobióticos (Perron *et al.*, 2004). Respostas apropriadas a tais estresses ambientais devem, portanto, ser induzidas para a sua sobrevivência e contínua proliferação. A caracterização minuciosa das repostas gerais e específicas, dos mecanismos envolvidos na percepção desses estresses, assim como vias de transdução de sinal que a transmitem dentro das células, e as modificações compensatórias daí resultantes em termos de expressão gênica e de modificações fisiológicas, são essenciais para um maior entendimento de como as células são capazes de se adaptar e sobreviver mesmo sob condições ambientais fora das ideais (Chen *et al.*, 2003).

O sequenciamento do genoma de numerosos seres vivos (“Genomes OnLine Database”, <http://wit.integratedgenomics.com/GOLD/>), marcou o advento da era genômica, e tornou possível a análise estrutural, comparativa e funcional dos genes de um organismo. Os dados obtidos têm resultado, por exemplo, na identificação de genes de resistência a metais e antibióticos presentes em plasmídeos bacterianos. No entanto, após o sequenciamento do genoma de muitas bactérias, genes cromossomais homólogos de resistência a metal foram identificados (Nies, 2003) e nos últimos anos foi evidenciada a existência de elementos e mecanismos genéticos de co-resistência a metais e antibióticos nestes microorganismos (Baker-Austin *et al.*, 2006).

A bactéria oligotrófica de vida livre *Caulobacter crescentus* pode ser encontrada em meios pobres em nutrientes, água e/ou sedimentos contaminados, para o qual desenvolveu um estilo de vida que permite sua sobrevivência neste tipo de ambiente. Análise do genoma de *Caulobacter* identifica um grande número de genes envolvidos em transdução de sinal, utilização de fontes diluídas de carbono, quimiotaxia e mobilidade, mostrando que esta bactéria está geneticamente equipada para crescer em condições extremas (Nierman *et al.*, 2001). Por outro lado, boa parte das putativas ORFs identificadas corresponde a proteínas de função desconhecida ou hipotética, sendo necessária a sua caracterização genética que nos permita entender o sucesso evolutivo, de adaptação e desenvolvimento deste organismo.

No presente trabalho, descrevemos a caracterização e análise de três agrupamentos de genes envolvidos na resposta a antibióticos (CC1637-CC1640) e metais (CC2720-CC2725 e CC2388-CC2390) da bactéria *Caulobacter crescentus*.

Nosso laboratório estuda a resposta a estresse de *C. crescentus* e através de análise por mutagênese aleatória utilizando o transposon miniTn5Km2*lacZ*, foram identificadas linhagens mutantes sensíveis a cádmio, contendo inserções nos genes CC1640, CC2720, CC2722 e CC2724 (Braz e Marques, 2005). O trabalho de Hu *et al.*, (2005), através da análise global de expressão gênica utilizando microarranjos de DNA, identificou em *C. crescentus* genes induzidos na presença dos metais cromo, cádmio, selênio e urânio. Em ambos os trabalhos, foram identificados genes que codificam proteínas hipotéticas, proteínas de sistemas de efluxo de cádmio e zinco, proteínas envolvidas com transdução de sinal e proteínas envolvidas em regulação. Dentre estes genes, o gene CC1640 mostrou expressão 2,6 vezes induzida na presença de dicromato, o gene CC1638 expressão 9 vezes induzida na presença de urânio, e os genes CC2721, CC2722, CC2723, CC2724 e CC2725 expressão induzida na presença de cádmio (21,3 vezes, 36 vezes, 20 vezes, 22,8 vezes e 8 vezes respectivamente).

A análise do genoma de *C. crescentus* mostra os genes CC1638 e CC1640 dispostos na mesma orientação dos genes CC1637 e CC1639, constituindo com eles o agrupamento de genes CC1637-CC1640, o qual poderia estar envolvido na resposta a metais. Porém, na análise do promotor deste operon, observamos que ele não é induzido na presença de metais cádmio, zinco ou em condição de estresse com peróxido de hidrogênio, e que a viabilidade das linhagens mutantes deste operon foi diminuída na presença de cádmio, mas não de zinco. Braz e Marques (2005) determinaram que o mutante CC1640::Tn5 era muito sensível a cádmio e moderadamente a zinco, mas este dado poderia dever-se ao fato da inserção do Tn5 ter efeito polar, já que este gene é co-transcrito junto com os genes CC1637, CC1638 e CC1639.

Hu *et al* (2005) mostrou, por análises de microarranjos de DNA, que na presença de 27 μ M de dicromato de potássio o gene CC1640 era induzido 2,6 vezes. Entretanto, em nossos experimentos o promotor deste gene não apresentou indução nesta condição. Apesar da sensibilidade da análise de microarranjos de DNA, vários métodos (*northern blot*, RT-PCR quantitativo, deleção do gene, entre outros) devem ser empregados para confirmar os resultados obtidos. Isto se deve a que os dados resultantes da análise por microarranjos de DNA provêm da análise de intensidade de fluorescência de milhares de pontos (genes) que são propensos a erros por sinais de baixa/alta intensidade, que poderiam determinar a errônea proporção de expressão de um gene (Asyali H, *et al* 2004).

Na análise do fenótipo na presença de peróxido de hidrogênio, as linhagens mutantes não mostraram sensibilidade o que é compatível com os resultados obtidos na análise da expressão do operon. Porém, na presença de 1% tert-butil hidroperóxido (t-BOOH), um

agente oxidante que é permeável à membrana celular, os mutantes Δ CC1637 e Δ CC1638 são sensíveis na fase estacionária. O hidroperóxido orgânico t-BOOH, pode dar origem a radicais livres, que dão início ao processo de peroxidação de lipídeos, afetando a integridade celular. Peroxidação de lipídeos é iniciada por EROs (espécies reativas de oxigênio) afetando ácidos graxos insaturados e é propagada por diversas reações que envolvem lipídeos, radicais peróxidos e lipídeos hidroperóxidos. Peroxidação dos fosfolipídios da membrana celular e acumulação de peróxidos de lipídeos alteram a fluidez da membrana celular, afetando sua estrutura e função (Sohn *et al.*, 2007). O gene CC1637 codifica uma proteína hipotética com domínio TAT envolvido na translocação da proteína ao periplasma e o gene CC1638 uma proteína oxidoredutase da família GMC com domínio hidrofóbico. Estas putativas características nos permitem supor que estas proteínas estariam ancoradas na membrana celular e poderiam atuar na proteção dos lipídeos contra a peroxidação, já que se trata de uma oxidoredutase que tem domínio de ligação a NAD e FAD.

Análises computacionais mostraram que o gene CC1639 codifica uma proteína com domínio peptidase_ M56 ((PF05569) e domínio de repetições de ankirina, separados por uma região transmembrana, com identidade de cerca de 17% e 26% com a proteína BlaR e MecR, respectivamente, de *Staphylococcus aureus*. Esta baixa identidade se deve ao fato de que as proteínas BlaR e MecR de *S. aureus* apresentam domínio peptidase e domínio sensor transpeptidase, cuja função está relacionada a resistência a antibióticos β -lactâmicos (Golemi-Kotra *et al.*, 2003). Porém, a proteína pertencente ao gene CC1639 não apresenta o domínio sensor transpeptidase e sim um domínio sensor com 5 repetições de ankirina. As repetições de ankirina são motivos de repetições de 2-20 aminoácidos encontradas em proteínas (fatores de transcrição, diferenciação celular, proteínas estruturais, etc) de eucariontes, bactérias patogênicas ou simbióticas assim como vírus, arqueas e eubactérias de vida livre. Estas repetições atuam facilitando a interação proteína-proteína e muitas bactérias patogênicas empregam diversos sistemas de secreção liberando proteínas com repetições de ankirina no interior de células eucariontes, onde mimetizam ou manipulam varias funções do hospedeiro (Al-Khodori *et al.*, 2010). A função do domínio de ankirina, não foi determinada neste estudo, porém, como *C. crescentus* não é uma bactéria patogênica, acreditamos que este domínio se ligue a uma proteína ou metabólito, ativando sua função catalítica. A proteína pertencente ao gene CC1637 poderia ser um mediador desta interação com o antibiótico, por ser periplasmática.

Análises utilizando o programa TMHMM mostraram que a proteína codificada pelo gene CC1639 apresenta quatro domínios transmembrana e três alças, com um motivo

HEXXH na alça três citoplasmática. Nas bactérias estudadas que apresentam esse domínio, são essenciais os resíduos de histidina para ligar o íon zinco e o resíduo de ácido glutâmico atua como uma base catalítica, com função de autocatálise intramolecular como apresentam as proteínas BlaR de *Staphylococcus* (Zhang et al., 2001; Wilke, et al., 2004). Foi descrito em *Bacillus licheniformis*, que na ausência do antibiótico, a segunda alça interage com o domínio sensor C-terminal (alça L2/BlaR-CTD) e na presença do antibiótico se ativa a separação da interação da alça L2/BlaR-CTD, originando o movimento das hélices transmembrana que se traduz em informação ao citoplasma. Isto ativa o domínio metalopeptidase de BlaR (Hanique et al., 2004) o qual, por proteólise, inativa o dímero da proteína repressora BlaI/MecI ligado no DNA.

O gene CC1640 codifica uma proteína com domínio similar ao domínio funcional da família de reguladores de transcrição BlaI (InterPro: IPR005650; <http://pfam.sanger.ac.uk>). Análises comparativas da proteína BlaI (CC1640) mostram identidade de 30% e 31% com a proteína MecI e BlaI de *S. aureus*, respectivamente, e 31% de identidade com a proteína codificada pelo gene Rv1846c (BlaI) de *Mycobacterium tuberculosis*. BlaI e MecI são proteínas repressoras homodiméricas que controlam negativamente a expressão dos genes envolvidos na resistência a antibióticos β -lactâmicos em *S. aureus* (Safo et al., 2005; Llarrull et al., 2010) e *B. licheniformis* (Filée et al., 2002). Na presença de antibióticos β -lactâmicos a proteína BlaI/MecI é inativada por proteólise (realizada pelo domínio metalopeptidase da proteína BlaR) que separa o domínio N-terminal de ligação ao DNA do domínio C-terminal. Este é responsável pela dimerização, originando um repressor truncado com baixa afinidade que se desliga do DNA, liberando a expressão do gene estrutural para resistência a antibióticos β -lactâmicos (Clarke et al., 2001; Hanique et al., 2004; Vreuls et al., 2004; Wilke et al., 2004; Safo et al., 2005; Cha et al., 2007; Boudet et al., 2007).

A análise do operon CC1637-CC1640 mostrou que este não é induzido na presença de metais (atingindo um dos objetivos do estudo), porém, este operon codifica duas putativas proteínas BlaR (CC1639) e BlaI (CC1640) que poderiam indicar seu envolvimento na resposta a antibióticos. Assim decidimos realizar a análise da expressão de mutantes deste operon na presença de antibióticos. Os dados obtidos mostram que a linhagem mutante Δ CC1640 foi mais sensível na presença de cefotaxima e piperacilina, antibióticos β -lactâmicos que atuam na parede celular e são substratos da enzima cefalosporinase (AmpC) (Jacoby, 2009). Os ensaios de crescimento mínimo inibitório (CMI) mostraram que o mutante Δ CC1640 foi mais sensível aos antibióticos cefotaxima e cefalexina, comparado com a linhagem NA1000 controle. Além disso, análise de atividade β -galactosidase em meio sólido

e em meio líquido, resultaram em uma indução do gene CC1640, confirmando que o operon é induzido na presença dos antibióticos cefotaxima e cefalexina. Mostramos assim que este operon responde a antibióticos β -lactâmicos da classe das cefalosporinas. Estes resultados nos levam a supor que o gene CC1640 (BlaI) seria o repressor de um gene que codifica uma proteína que reprime a expressão de genes que codificam enzimas β -lactamases ainda não identificadas, já que na ausência da proteína BlaI a célula fica mais sensível a estes antibióticos.

Para determinar se o putativo fator de transcrição BlaI regula a expressão do seu operon, foram realizados ensaios de atividade β -galactosidase. Foi observada uma indução de 3 vezes no nível de expressão na linhagem Δ CC1640, indicando que o gene CC1640 é autoregulado negativamente. O ensaio de alteração de mobilidade eletroforética, confirmou que o regulador BlaI se liga especificamente ao seu próprio promotor, como outras proteínas da família BlaI estudadas de *S. aureus* (Safo et al., 2005; Llarrull et al., 2010) e *B. lincheniformis* (Filée et al., 2003). Estes dados confirmam resultados obtidos previamente em nosso laboratório (Vânia S. Braz, resultados não publicados).

Para determinar se ocorria inibição da interação da proteína reguladora BlaI ao promotor de CC1640 na presença do domínio peptidase de BlaR, foi realizada análise de inibição de mudança da mobilidade eletroforética. A análise mostrou que na presença do domínio peptidase o regulador de transcrição BlaI não se liga ao DNA (região promotora do gene CC1640 de 307 pb). O experimento inicial mostrou que, assim como BlaR de *S. aureus*, o domínio catalítico de BlaR de *C. crescentus* também inibe a ligação da proteína BlaI ao seu promotor. Entretanto, mais estudos devem ser realizados para confirmar, se isso ocorre devido a proteólise de BlaI.

Em *S. aureus* (Safo et al., 2005) e *B. lincheniformis* (Filée et al., 2003) a proteína BlaI se liga ao DNA na sequência consenso repetida invertida TACANNTGTA, porém em *Mycobacterium tuberculosis* a proteína codificada pelo gene Rv1846c (BlaI) se liga na sequência consenso TACG/TAC<5>GTA/CGTA (Sala et al., 2009). Neste organismo o repressor BlaI regula a expressão de seu próprio gene e de outros, como uma proteína hipotética pertencente à família thioesterase, que se encontra divergente a proteína BlaI; proteína β -lactamase classe A (BlaC); fator sigma ECF da RNA polimerase; sistema transportador ABC de antibióticos; ATP sintase.

A organização dos genes no locus do gene Rv1846c (BlaI) mostra-se diferente quando comparada a do locus *blaI/blaR/blaZ* ou *mecI/mecR/mecA* de *S. aureus* (Wilke et al., 2004; Safo et al., 2005) e *B. lincheniformis* (Duval et al., 2003), respectivamente. Nestes, os 3 genes

formam um operon no qual os dois primeiros genes (*blaI/blaR* ou *mecI/mecR*) encontram-se em orientação divergente ao gene *blaZ* ou *mecA*. No entanto, em *M. tuberculosis* os genes Rv1846c (*BlaI*) e Rv1845 (putativo *BlaR*) formam um operon bicistronico e não está divergente ao gene *blaZ* (resistente a penicilina) ou *mecA* (resistente a meticilina) (Sala et al., 2009). Da mesma forma, a organização de genes no operon CC1637-CC1640, mostra que o gene CC1640 (*BlaI*) e o gene CC1639 (*BlaR*) não estão divergentes ao gene *blaZ* e sim ao gene CC1641 que codifica uma putativa 2'-5'-RNA ligase.

A análise da sequência de DNA do promotor do operon CC1640, identificou duas vezes a sequência repetida invertida TTACGNNCGTAA (localizadas entre -12 a -21 e -45 a -54), a qual poderia ser o putativo sítio de ligação da proteína *BlaI* (CC1640). Análise *in silico* identificaram a sequência repetida invertida TTACGNNCGTAA em 13 genes de *C. crescentus*, os quais poderiam ser também regulados pelo repressor *BlaI*.

Para confirmar esta hipótese, validamos a expressão dos genes relacionados à resposta a antibióticos entre os quais temos: gene CC1568, que codifica uma proteína β -lactamase classe C; gene CC1230, que codifica uma proteína de efluxo Bcr-CflA de resistência a drogas; e gene CC2661, que codifica um regulador transcricional da família GntR.

Em *C. crescentus* foram identificados genes que codificam enzimas β -lactamases classe B, que hidrolisam carbapenos (Simm et al., 2001; Docquier et al., 2002; Docquier et al., 2010), porém, genes para enzimas β -lactamases classe C ainda não foram reportados. No entanto, a análise computacional do gene CC1568 mostra que codifica uma proteína pertencente a superfamília transpeptidase com serina conservada (*Conserved Domains and Protein Classification* nº cl01009. NCBI, USA), a qual é importante para inativar antibióticos β -lactâmicos, e apresenta multidomínio de β -lactamase classe C (*Clusters of Orthologous Groups of proteins*, COG1680. NCBI, USA). Análise de expressão relativa do gene CC1568 mostrou uma redução de expressão na ausência do gene CC1640, devido a uma possível regulação indireta para este gene. A hipótese seria que o repressor *BlaI* inibe a expressão de um repressor do gene CC1568 e na ausência de *BlaI*, o repressor do gene CC1568 estaria sendo expresso. No estudo de expressão relativa foi necessária a indução de expressão dos genes utilizando o antibiótico cefalexina, assim como acontece com β -lactamases classe C de bactérias gram negativas (Drawz e Bonomo, 2010).

O gene CC1230 codifica uma proteína Bcr-CflA de efluxo de resistência a drogas da superfamília MFS (*Major facilitator superfamily*). Em *Vibrio cholerae* foi identificada a proteína EmrD3, que apresenta similaridade com a proteína Bcr-CflA, a qual confere resistência a múltiplas drogas, como linezolid, rifampicina, tetrafenilfosfonio, eritromicina,

cloranfenicol, trimetropin, minociclina e brometo de etidio (Smith et al., 2009). A análise de expressão relativa do gene CC1230 mostra uma redução de expressão na ausência do gene CC1640, devido a uma possível regulação indireta para este gene, como proposto acima.

O gene CC2661 codifica uma putativa proteína reguladora da família GntR. O gene *gntR* codifica um fator de transcrição que regula negativamente a via de metabolismo de gluconato nas bactérias *E. coli* (Zwaig et al., 1973) e *B. subtilis* (Fujita et al., 1986). A proteína reguladora GntR se caracteriza por apresentar um domínio HTH que se liga ao DNA e um domínio C-terminal de ligação efetora, e se divide em 4 subfamílias devido a diferenças no domínio C-terminal: MocR, YtrA, FadR e HutC. Estas subfamílias de fatores de transcrição estão envolvidas em diferentes processos como, metabolismo de L-arabinose, glicolato, piruvato, lactato, malonato, gluconato, ácidos graxos, L-asparagina, degradação de compostos aromáticos, utilização de histidina, esporulação, virulência, atividade fosfotransferase, entre outras (Rigali et al., 2002; Vindal et al., 2007).

O estudo do gene NorG de *Staphylococcus aureus* mostrou que codifica uma proteína reguladora transcricional da família GntR e subfamília FadR. Esta proteína se liga especificamente aos promotores dos genes que codificam bombas de efluxo multidrogas *norA*, *norB*, *norC* e *abcA*. A super expressão de NorG incrementa a transcrição de *norB* que aumenta a resistência a quinolonas; em contraste, a deleção de NorG não produz mudança na transcrição de *norA*, *norB* e *norC* e aumenta os níveis de transcrição de *abcA*. Isto causa aumento na resistência a β -lactâmicos como: meticilina, cefotaxima, penicilina G e nafcilina (Truong-Bolduc e Hooper., 2007). Assim podemos afirmar que a proteína NorG age como ativador ou repressor da transcrição.

Os dados obtidos neste trabalho mostram que a expressão relativa da transcrição do gene CC2661 é aumentada na ausência do gene CC1640, sugerindo que BlaI age como um repressor do gene CC2661. Analogamente ao descrito para a proteína GntR, podemos levantar a hipóteses que possivelmente a transcrição do gene CC2661 aumenta a resistência aos antibióticos cefotaxima e cefalexina ao ativar os genes de efluxo e de resistência a antibióticos β -lactâmicos em *C. crescentus*, porém mais estudos devem ser realizados para entender melhor este mecanismo de regulação.

Nós últimos anos é evidente que o processo de resistência a drogas é cada vez mais rápido e estimulado pela presença de diversos antibióticos comerciais e auto prescrição indevida, que selecionam nos microorganismos mutações espontâneas e/ou convergentes nos genes de resistência a estas drogas. *C. crescentus*, assim como outros organismos que se desenvolvem na água ou solo, devem evoluir e adaptar seu metabolismo como um mecanismo

de resposta celular a diferentes condições ambientais. A utilização de uma variedade de antibióticos para combater microrganismos patogênicos, tem induzido o surgimento de cepas resistentes que quando presentes no meio ambiente podem transferir por diversos mecanismos genéticos sua habilidade de resistência. *C. crescentus* não é considerado um microorganismo patogênico, porém se desenvolve em um habitat susceptível a contaminação por antibióticos e outros produtos, motivo pelo qual pode ter mantido mecanismos de defesa ou resposta que permitam garantir sua sobrevivência. Outro dado importante a mencionar é que a proteína codificada pelo gene CC1639 apresenta 2 domínios um citoplasmático endopeptidase e um domínio sensor de ankrina, estes domínios também estão presentes em proteínas pertencentes as alfaproteobactérias *Maricaulis maris* MCS10 e *Oceanicaulis* sp. HTCC2633. Sugerindo que estas proteínas são conservadas, porém, sua função ainda não esta bem determinada.

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que, na presença dos antibióticos β -lactâmicos testados, *C. crescentus* é capaz de sobreviver e empregar mecanismos de defesa. O regulador de transcrição codificado pelo gene CC1640 é provavelmente clivado pela proteína BlaR (CC1639) em resposta a presença destes antibióticos. Isto causa a desrepressão deste operon e causa alteração na expressão de genes envolvidos na resposta a antibióticos dentre outras funções metabólicas.

Os microorganismos apresentam diversos mecanismos de defesa em resposta a condições de estresse, outros mecanismos de defesa além do anteriormente mostrado são constituídos pelos sistemas de bombas de efluxo da família RND.

A análise do domínio de ligação a metais no genoma de 63 organismos procariontes comparada com o genoma de *Ralstonia metallidurans*, identificou o motivo DFG-DGA-VEN como pertencente a proteínas dos subgrupos HME1-RND (por exemplo, nas proteínas CzcA, CztA, HelA) e HME2-RND (por exemplo, nas proteínas CnrA e NccA) que conferem resistência a zinco/ cobalto/ cádmio e níquel/cobalto, respectivamente (Nies, 2003). Neste trabalho a proteína codificada pelo gene CC2724 foi classificada como pertencente à família HME-2-RND, e a proteína do gene CC2390 como pertencente à família HME-1-RND, devido à similaridade de sequência de aminoácidos com as proteínas de *Ralstonia metallidurans* envolvidas na resposta a metais, presentes nos plasmídios pMOL28 (171 kb, que confere resistência a cobalto, cromo, mercúrio e níquel) e pMOL30 (234 kb, que confere resistência a prata, cadmio, cobalto, cobre, mercúrio, chumbo e zinco) (Monchy et al., 2007). Interessantemente Braz e Marques (2005) identificaram os genes CC2721, CC2722 e CC2724 como genes de resposta a cádmio, que é típico somente da família Czc e não de Cnr. As proteínas codificadas pelos genes CC2390 e CC2724 apresentam 56% de identidade, e o

motivo DFG-DGA-VEN as identifica apenas como pertencentes à família de proteínas RND. No entanto, os outros 5 genes parálogos ao gene CC2724, que não são alvo deste estudo, apresentaram outros motivos, a proteína codificada pelo gene CC1204 apresenta o motivo em reposta a níquel AVG-DDA-VEN (família HME5-RND) e as proteínas codificadas pelos demais genes apresentam motivos pertencentes a proteínas da família HAE-RND ou fazem parte da família de proteínas AcrB/AcrD/AcrF.

Outro fato importante que cabe mencionar, é que o cluster CC2720-CC2725, está localizado na extremidade de uma ilha genômica de 60 kb, identificada durante a anotação do genoma de *C. crescentus* (Nierman et al., 2001). Porém, a análise computacional de predição de ilhas genômicas, utilizando a ferramenta *IslandViewer*, localizou além do gene CC2720, o gene CC2388 dentro de uma outra ilha genômica. Isto indica que provavelmente estes dois sistemas de efluxo da família RND devem ter sido adquiridos por transferência genética horizontal.

Estes dados nos levaram a fazer o estudo de comparação dos dois operons codificando sistemas RND, CC2388-CC2390 e CC2720-CC2725, que apresentam o mesmo motivo de ligação a metais. Os dados obtidos mostraram que o operon CC2720-CC2725 é pouco induzido na presença de níquel e altamente induzido na presença de cádmio, e o operon CC2388-CC2390 não é induzido na presença de cádmio e é altamente induzido na presença de níquel. Além disso, ambos os operons foram induzidos na presença de cobalto e zinco.

Monchy et al. (2007) analisaram os plasmídios pMOL28 e pMOL30 que conferem resistência a metais em *R. metallidurans*, observando que o cluster de genes *cnr*, presente no pMOL28, foi induzido na presença de níquel, cobre e cádmio, e não está envolvido na resistência a cobre ou chumbo, mas apresenta alguma resistência a zinco e cádmio. No entanto, o cluster de genes *czc* presente no plasmídeo pMOL30 é principalmente induzido por cádmio e zinco, sendo o gene *czcA* induzido também por cobre. Os reguladores *czcDRSE* (que regulam o operon *czcABC*) são pouco induzidos na presença de níquel e chumbo, medianamente induzidos na presença de cobre e altamente induzidos por cádmio e zinco. No estudo de Nies (2003) os genes *ncc* foram classificados como pertencentes ao subgrupo da família HME2-RND. No plasmídeo pTOM9 da bactéria *Alcaligenes xilosoxidans* 31A foram identificados dois locos de genes que conferem resistência a metais: *nre* e *ncc* (*nccYXHCBA*) com resposta diferente a níquel, onde *nre* foi relacionado a baixo nível de resistência a níquel e *ncc* relacionado a alto nível de resistência a níquel, cobalto e cádmio (Schmidt e Schlegel, 1994).

Braz e Marques (2005) identificaram os genes CC2720, CC2722 e CC2724 através de inserção do transposon *Tn5lacZ* como sensíveis a cádmio. O fenótipo dos mutantes CC2720::*Tn5lacZ*, CC2722::*Tn5lacZ* e CC2724::*Tn5lacZ* foi sensível a cádmio e os dois primeiros mostraram também uma queda de viabilidade a zinco. Também realizaram ensaios de β -galactosidase empregando o gene *lacZ* do transposon *Tn5lacZ*, obtendo uma indução por cádmio de 1,4; 6,7 e 2,8 vezes em 48 horas (CC2720, CC2722 e CC2724, respectivamente) e a indução por zinco foi de 8 e 5 vezes em 24 horas (CC2722 e CC2724, respectivamente). Neste trabalho deletamos o gene CC2724 em fase de leitura sem causar efeito polar, e ensaios mostraram a sensibilidade do mutante a cádmio reforçando este dado. Os ensaios de padrão de expressão da fusão *p2720lacZ*, na presença de cádmio (2,9 vezes), foi maior que o correspondente ao CC2720::*Tn5lacZ* (1,4 vezes). Na presença de zinco *p2720lacZ* e CC2720::*Tn5lacZ*, em ambos os trabalhos, apresentaram pouca expressão e somente um aumento de expressão na fase estacionária 24 e 48 horas.

A análise do operon CC2720-CC2725 mostrou que: (i) apresenta alta indução na presença de cádmio 10 μ M (2,6 vezes em 24h), (ii) o mutante do gene CC2724 (que apresenta o motivo de ligação ao metal) é sensível a cádmio, e não alterou seu crescimento na presença de zinco, níquel e cobalto, somente em alta concentração de zinco é sensível, e (iii) Mostrou moderada indução na presença de zinco 100 μ M (1,7 vezes em 24 h) e cobalto 175 μ M (2,3 vezes em 24 h) e uma menor indução na presença do metal níquel 100 μ M (1,5 vezes em 24 h, mas não foi induzido em 48 h) Estes resultados caracterizam o operon CC2720-CC2725 como pertencente à subfamília HMR1-RND, já que não mostrou indução em menor tempo de exposição aos metais cobalto e níquel como acontece com o outro cluster de genes da família RND em estudo. Este operon não pode ser incluído como *ncr* porque é altamente expresso e sensível (linhagem mutante) a cádmio que não é característico do grupo de genes *ncr*.

A análise do operon CC2388-CC2390 mostrou que: (i) não é induzido na presença de cádmio, (ii) é altamente induzido na presença de níquel 100 μ M (3,3 vezes em 24 h) e cobalto 100 μ M (2,7 vezes em 24 horas), (iii) moderadamente induzido na presença de zinco 100 μ M (1,5 vezes em 24 e 48 h), mas não mostrou indução nas primeiras horas (2, 4 e 6 h) de exposição ao metal como acontece na presença dos metais níquel e cobalto, e (iv) o mutante do gene CC2390 (que apresenta o motivo de ligação ao metal) é sensível a cobalto, moderadamente sensível a níquel, e mostrou sensibilidade a cádmio e zinco somente quando exposto em altas concentrações (50 e 150 μ M respectivamente), mas não mostrou sensibilidade a cádmio e zinco em baixa concentração (25 e 100 μ M respectivamente). Estes

resultados caracterizam o operon CC2388-CC2390 como pertencente à subfamília HME2-RND.

A análise computacional comparativa dos operons CC2720-CC2725 e CC2388-CC2390, mostrou que a proteína codificada pelo gene CC2724 apresenta 11 domínios transmembrana (sendo o motivo que identifica a ligação ao metal localizado no TM3), enquanto que a proteína codificada pelo gene CC2390 apresenta 12 domínios transmembrana (sendo o motivo que identifica a ligação ao metal localizado no TM4). Em ambos operons, os genes regulatórios do sistema RNDs não são contíguos, como é comum nos genes *cnr* de *Leptospirillum ferriphilum* e *UBK03* e *Ralstonia sp* (*cnrABCY* e *cnrYXHCBA*); *czc* de *Ralstonia metallidurans* (*czcNICBADRS*) e *ncc* de *Alcaligenes xilosoxidans* 31A (*nccYXHCBA*) (Schmidt e Schlegel., 1994; Grosse et al 2004; Grass et al., 2000; Zhu et al, 2011).

A linhagem duplo mutante Δ CC2724 Δ CC2390 mostrou um menor crescimento na presença de níquel, igual ao mutante simples com sensibilidade ao metal respectivo (Δ CC2390). Já na resposta a zinco, o duplo mutante Δ CC2724 Δ CC2390 apresentou um menor crescimento em baixa concentração que não apresentaram os mutantes simples. Consideramos que outras concentrações de metais devem ser testadas para completar este estudo. A análise de complementação mostrou que ambos os mutantes foram complementados obtendo o crescimento normal da linhagem controle, confirmando que estes genes tem envolvimento em resposta a esses metais.

O cluster CC2720-CC2725 está localizado ao lado do gene CC2726 (uma putativa ATPase tipo P, ligada a membrana que expulsa metal para o periplasma) o qual é transcrito na mesma direção. Assim, podemos supor que este gene atua em conjunto com este sistema RND (CC2721, CC2722, CC2724). Um exemplo da ação conjunta destas proteínas ocorre em bactérias Gram negativas e consistem em dois eventos, um que atua no citoplasma e outro no espaço periplasmático; inicialmente as proteínas ATPase tipo P e CDF transportam seu substrato através da membrana interna para o periplasma, e em um segundo evento o sistema RND transporta o substrato através da membrana externa para fora da célula (Nies, 2003; Silver, 2005; Legatzki et al., 2003; Kim et al., 2011).

Uma das bactérias mais estudadas quanto a homeostase a zinco é *E. coli*, que apresenta uma regulação coordenada, onde os íons zinco são transportados por um sistema transportador tipo-ABC (*znuABC*) e uma permease (*zupT*). Para manter o equilíbrio intracelular, os íons de zinco se ligam ao sensor Zur, que na forma zinco-Zur ligam se ao promotor, inibindo a transcrição dos genes *znuABC*. O efluxo extracelular é mediado por uma

ATPase tipo-P (*zntA*) e um facilitador de difusão de cátions (*zitB*). *zntA* é regulado por ZntR, ao qual se liga o metal zinco e nesta conformação ativa a transcrição de *zntA*, facilitando desta maneira a expulsão do zinco intracelular (Cui et al., 2008). Em alta concentração de zinco, os íons são expelidos rapidamente por bombas de efluxo da família RND (*czcABC*), atuando em conjunto com um facilitador de difusão de cations (*czcD*) e ATPase tipo-P (Hantke, 2001).

Em *C. crescentus* foi descrito um regulador transicional tipo LysR (*zntR*) que se encontra divergente ao gene *cztA*, que codifica uma permease pertencente a família SbtA. A proteína ZntR reprime seu próprio promotor e ativa a expressão da permease (*cztA*) em baixas concentrações de zinco (Braz et al., 2010). Sabendo que existe a bomba de efluxo em *C. crescentus* em resposta a zinco *czcABC* (CC2721, CC2722 e CC2725) descrita neste trabalho e em Braz e Marques (2005), podemos supor que elas atuariam na regulação da homeostase principalmente em altas concentrações de zinco, para manutenção do equilíbrio intracelular.

Em *E. coli* a entrada de níquel é mediada por um sistema ABC transporte (*niKABCDE*) que é regulado pela proteína NikR. O excesso de níquel é removido por bombas de efluxo, que são reguladas negativamente pelo repressor RcnR, em altas concentrações de níquel o metal se liga ao represor desreprimindo ao promotor do gene *rcnA* (bomba de efluxo) desta maneira a transcrição da proteína RcnA permite a liberação do excesso de níquel (Iwig et al., 2006).

Outro estudo mostra que em *E. coli* existe uma proteína denominada RcnB que junto com a proteína RcnA, regulam o excesso de níquel e cobalto, e que em condições tóxicas para a célula a resposta é mediada por bombas de efluxo da família RND e superfamília MFS (Blériot et al, 2011). O mecanismo de resposta a metais níquel e cobalto em *C. crescentus* está sendo reportado neste trabalho.

A bactéria *Helicobacter pylori*, patógeno presente no estômago, apresenta um mecanismo de regulação coordenada de resposta a metais que utiliza uma bomba de efluxo Czn da família RND com estrutura similar a Czc de *Ralstonia sp*, denominada *CznABC*. Este mecanismo confere resistência a metais cádmio, zinco e níquel, e modula a atividade da enzima urease que dá resistência à acidez gástrica e ajuda na colonização da mucosa gástrica pela bactéria. Na presença de níquel a enzima urease encontra-se na forma ativa, entanto que, na presença de íons cádmio ou zinco esta enzima é inativada. Por esta razão, a bactéria precisa de uma acurada e rápida detoxificação através da expressão desta bomba de efluxo para poder sobreviver (Stahler et al., 2006).

C. crescentus esta sendo utilizado como modelo em estudos de bioremediação, por ser uma bactéria oligotrófica que sobrevive na presença de metais pesados como cádmio. A proteína recombinante JS4022/p723-6H com uma cauda de histidina foi ligada na superfície *S-layer* de *C. crescentus* para captura de íons cádmio em águas residuais (Xu et al., 2010), porém, o microorganismo sobrevive por pouco tempo. Uma abordagem seria aproveitar o conhecimento obtido neste estudo, para superexpressar estas proteínas que fazem parte de bombas de efluxo com resposta a cádmio, níquel e outros metais, o que ajudaria na sobrevivência do microorganismo por mais tempo durante o tratamento de águas residuais.

Como mostrado no presente trabalho, às bombas de efluxo CC2720-CC2725 ou CC2388-CC2390, apresentaram resposta a mais de um metal, o que seria uma vantagem para a sobrevivência da bactéria. Estes sistemas agem de forma coordenada para manter a homeostase celular, em conjunto com os sistemas ATPase tipo-P, facilitador de difusão de cátions e reguladores, que não foram alvo deste estudo.

6 CONCLUSÕES

I. Caracterização do cluster composto pelos genes CC1637-CC1640

No genoma de *C. crescentus* os genes do cluster CC1637-CC1640 estão localizados entre as coordenadas 1814769 e 1818776 e apresentam uma região intergênica de 2 pb e 173 pb entre os genes CC1637-CC1638 e CC1638-CC1639, respectivamente. Por meio de análise de RT-PCR e atividade do promotor, demonstrou-se que os genes podem ser co-transcritos e que a região de 168 pb à montante do gene CC1640 regula a expressão dos genes. Assim, este agrupamento de genes constitui um operon, que é regulado pelo promotor do gene CC1640.

Análise do padrão de expressão do operon CC1637-CC1640 na linhagem NA1000 mostrou que não é induzido na presença de metais (cádmio, zinco e dicromato de potássio) e agente oxidante (peróxido de hidrogênio), nas concentrações testadas e é induzido na presença dos antibióticos cefalexina e cefotaxima. A proteína codificada pelo gene CC1640 (BlaI) é uma proteína repressora que regula negativamente o promotor do seu operon.

A deleção dos genes do operon CC1637-CC1640, não afeta a viabilidade celular e as características de desenvolvimento de *C. crescentus*. As linhagens mutantes Δ CC1637 e Δ CC1638 apresentaram maior sensibilidade na presença de tert-butil hidroperóxido, sugerindo que estas proteínas poderiam ter uma função oxidoreductase que neutraliza o efeito do peróxido. A linhagem mutante Δ CC1640 apresentou maior sensibilidade aos antibióticos cefotaxima e piperacilina+tazobactam e o ensaio de MIC demonstrou que esta linhagem tem menor resistência aos antibióticos cefalexina e cefotaxima.

Através da técnica de retardamento da mobilidade eletroforética, mostrou-se que a proteína reguladora codificada pelo gene CC1640 (BlaI) se liga ao seu promotor e que o domínio peptidase da proteína codificada pelo gene CC1639 (BlaR), inibe esta ligação, sugerindo que este mecanismo de regulação transcricional é o mesmo conservado entre as proteínas da família BlaI.

A proteína BlaI poderia se ligar na putativa sequência consenso TTACGNNCGTAA identificada na região promotora do operon CC1637-CC1640. Análise computacional permitiu identificar este consenso na região promotora de outros genes, mostrando que a proteína BlaI poderia estar putativamente regulando a expressão de vários genes no genoma de *C. crescentus*. Análises de expressão relativa através da técnica de RT-PCR semi quantitativa confirmaram que a proteína BlaI de *C. crescentus*, além de regular seu próprio promotor, regula a expressão de outros genes, reduzindo a expressão dos genes CC1568 e CC1230, e aumentando a expressão do gene CC2660.

II. Análise comparativa de dois sistemas de efluxo da família RND compostos pelo cluster de genes CC2720-CC2725 e CC2388-CC2390

No genoma de *C. crescentus* os genes do cluster CC2720-CC2725 e CC2388-CC2390 estão localizados entre as coordenadas 2934411 – 2941581 e 2587684 – 259335, respectivamente. A análise do cluster CC2720-CC2725, que apresenta uma região intergênica de 200 pb e 57 pb entre os genes CC2719-CC2720 e CC2720-CC2721, respectivamente, demonstrou que os genes são co-transcritos e que a região de 454 pb à montante do gene CC2720 regula a expressão dos genes. Assim, este cluster de genes constitui um operon que é regulado pelo promotor do gene CC2720.

Análises da atividade promotora dos genes CC2388-CC2390 demonstrou que são transcritos a partir da região de 300 pb à montante do gene CC2388. Análises de expressão dos operons CC2720-CC2725 e CC2388-CC2390, mostraram que ambas são induzidas na presença de níquel, zinco e cobalto e só o operon CC2720-CC2725 é induzido na presença de cádmio.

A deleção dos genes CC2390, CC2724 e a dupla deleção CC2724-CC2390, não afetaram a viabilidade celular e as características de desenvolvimento de *C. crescentus*. A linhagem mutante Δ CC2390 é sensível na presença de cobalto e pouco sensível a níquel nas condições testadas, a linhagem Δ CC2724 é sensível a cádmio, e o duplo mutante Δ CC2724 Δ CC2390 aumenta a sensibilidade a zinco e níquel. Altas concentrações de zinco afetam a sensibilidade das linhagens mutantes Δ CC2724, Δ CC2390 e duplo mutante Δ CC2724 Δ CC2390. A complementação das linhagens mutantes Δ CC2724 e Δ CC2390 recupera a característica fenotípica inicial perdida devido à deleção do gene.

O presente trabalho mostra que os operons CC2720-CC2725 e CC2388-CC2390, codificam dois sistemas de efluxo da família RND com diferente resposta a metais. Sugerindo que o sistema de efluxo codificado pelos genes CC2388-CC2390 pertence ao subgrupo da família HME2-RND e o sistema de efluxo codificado pelos genes CC2720-CC2725 como pertence ao subgrupo da família HME1-RND.

REFERÊNCIAS*

- Abou-Shanab RA, van Berkum P, Angle JS. Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Chemosphere*. 2007 Jun;68(2):360-7.
- Al-Khodor S, Price CT, Kalia A, Abu Kwaik Y. Functional diversity of ankyrin repeats in microbial proteins. *Trends Microbiol*. 2010 Mar;18(3):132-9.
- Alley D. Não Publicado.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990 Oct 5;215(3):403-10.
- Alvarez-Martinez CE, Lourenco RF, Baldini RL, Laub MT, Gomes SL. The ECF sigma factor sigma(T) is involved in osmotic and oxidative stress responses in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol*. 2007 Dec;66(5):1240-55.
- Aminov RI. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environ Microbiol*. 2009 Dec;11(12):2970-88.
- Andreazza R, Okeke BC, Pieniz S, Bortolon L, Lambais MR, Camargo FA. Effects of Stimulation of Copper Bioleaching on Microbial Community in Vineyard Soil and Copper Mining Waste. *Biol Trace Elem Res*. 2011 Sep 27.
- Asyali MH, Shoukri MM, Demirkaya O, Khabar KS. Assessment of reliability of microarray data and estimation of signal thresholds using mixture modeling. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(8):2323-35.
- Ausbel FM, Brent R, Kingston R.E, Moore DD, Seidman JG, Smith JS.K . Short protocols in molecular biology. (Edi). New York : Waley; 1995. 900p
- Baker-Austin C, Wright MS, Stepanauskas R, McArthur JV. Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol*. 2006 Apr;14(4):176-82.
- Banjerdkij P, Vattanaviboon P, Mongkolsuk S. Exposure to cadmium elevates expression of genes in the OxyR and OhrR regulons and induces cross-resistance to peroxide killing treatment in *Xanthomonas campestris*. *Appl Environ Microbiol*. 2005 Apr;71(4):1843-9.
- Barton LL, Goulhen F, Bruschi M, Woodards NA, Plunkett RM, Rietmeijer FJ. The bacterial metallome: composition and stability with specific reference to the anaerobic bacterium *Desulfovibrio desulfuricans*. *Biometals*. 2007 Jun;20(3-4):291-302.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts Submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Bleriot C, Effantin G, Lagarde F, Mandrand-Berthelot MA, Rodrigue A. RcnB is a periplasmic protein essential for maintaining intracellular Ni and Co concentrations in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 2011 Aug;193(15):3785-93.

Boudet J, Duval V, Van Melckebeke H, Blackledge M, Amoroso A, Joris B, et al. Conformational and thermodynamic changes of the repressor/DNA operator complex upon monomerization shed new light on regulation mechanisms of bacterial resistance against beta-lactam antibiotics. Nucleic Acids Res. 2007;35(13):4384-95.

Braz VS. Caracterização de genes envolvidos na resposta a metais em *Caulobacter crescentus*. [tese (Doutorado em ciências Microbiologia)] São Paulo: Universidade de São Paulo; 2006.

Braz VS. Estudo de dois fatores de transcrição de *Caulobacter crescentus* envolvido na resposta a cádmio [Pós-doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2009.

Braz VS, da Silva Neto JF, Italiani VC, Marques MV. CztR, a LysR-type transcriptional regulator involved in zinc homeostasis and oxidative stress defense in *Caulobacter crescentus*. J Bacteriol. 2010 Oct;192(20):5480-8.

Braz VS, Marques MV. Genes involved in cadmium resistance in *Caulobacter crescentus*. FEMS Microbiol Lett. 2005 Oct 15;251(2):289-95.

Brotz-Oesterhelt H, Sass P. Postgenomic strategies in antibacterial drug discovery. Future Microbiol. 2010 Oct;5(10):1553-79.

Bruins MR, Kapil S, Oehme FW. Microbial resistance to metals in the environment. Ecotoxicol Environ Saf. 2000 Mar;45(3):198-207.

Busenlehner LS, Giedroc DP. Kinetics of metal binding by the toxic metal-sensing transcriptional repressor *Staphylococcus aureus* pI258 CadC. J Inorg Biochem. 2006 May;100(5-6):1024-34.

Busenlehner LS, Pennella MA, Giedroc DP. The SmtB/ArsR family of metalloregulatory transcriptional repressors: Structural insights into prokaryotic metal resistance. FEMS Microbiol Rev. 2003 Jun;27(2-3):131-43.

Canovas D, Cases I, de Lorenzo V. Heavy metal tolerance and metal homeostasis in *Pseudomonas putida* as revealed by complete genome analysis. Environ Microbiol. 2003 Dec;5(12):1242-56.

Capon F, Allen MH, Ameen M, Burden AD, Tillman D, Barker JN, et al. A synonymous SNP of the corneodesmosin gene leads to increased mRNA stability and demonstrates association with psoriasis across diverse ethnic groups. Hum Mol Genet. 2004 Oct 15;13(20):2361-8.

Cha J, Vakulenko SB, Mobashery S. Characterization of the beta-lactam antibiotic sensor domain of the MecR1 signal sensor/transducer protein from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Biochemistry. 2007 Jul 3;46(26):7822-31.

Chen D, Toone WM, Mata J, Lyne R, Burns G, Kivinen K, et al. Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol Biol Cell*. 2003 Jan;14(1):214-29.

Chen WP, Kuo TT. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Res*. 1993 May 11;21(9):2260.

Clarke SR, Dyke KG. The signal transducer (BlaRI) and the repressor (BlaI) of the *Staphylococcus aureus* beta-lactamase operon are inducible. *Microbiology*. 2001 Apr;147(Pt 4):803-10.

Coudron PE, Moland ES, Thomson KS. Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates at a veterans medical center. *J Clin Microbiol*. 2000 May;38(5):1791-6.

Cui J, Kaandorp JA, Lloyd CM. Simulating in vitro transcriptional response of zinc homeostasis system in *Escherichia coli*. *BMC Syst Biol*. 2008;2:89.

Curtis PD, Brun YV. Getting in the loop: regulation of development in *Caulobacter crescentus*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2010 Mar;74(1):13-41.

Da Silva Neto JF, Braz VS, Italiani VC, Marques MV. Fur controls iron homeostasis and oxidative stress defense in the oligotrophic alpha-proteobacterium *Caulobacter crescentus*. *Nucleic Acids Res*. 2009 Aug;37(14):4812-25.

De Angelis F, Lee JK, O'Connell JD, 3rd, Miercke LJ, Verschueren KH, Srinivasan V, et al. Metal-induced conformational changes in ZneB suggest an active role of membrane fusion proteins in efflux resistance systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jun 15;107(24):11038-43.

De Souza Santos E. Obtencao de mutantes dos genes CC3510 e CC1640 de *Caulobacter crescentus* [Iniciação Científica.]. 2005.

Deckert J. Cadmium toxicity in plants: is there any analogy to its carcinogenic effect in mammalian cells? *Biomaterials*. 2005 Oct;18(5):475-81.

Docquier JD, Benvenuti M, Calderone V, Stoczko M, Menciassi N, Rossolini GM, et al. High-resolution crystal structure of the subclass B3 metallo-beta-lactamase BJP-1: rational basis for substrate specificity and interaction with sulfonamides. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Oct;54(10):4343-51.

Docquier JD, Pantanella F, Giuliani F, Thaller MC, Amicosante G, Galleni M, et al. CAU-1, a subclass B3 metallo-beta-lactamase of low substrate affinity encoded by an ortholog present in the *Caulobacter crescentus* chromosome. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Jun;46(6):1823-30.

Drawz SM, Bonomo RA. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev*. 2010 Jan;23(1):160-201.

Duval V, Swinnen M, Lepage S, Brans A, Granier B, Franssen C, et al. The kinetic properties of the carboxy terminal domain of the *Bacillus licheniformis* 749/I BlaR penicillin-receptor shed a new light on the derepression of beta-lactamase synthesis. *Mol Microbiol*. 2003 Jun;48(6):1553-64.

- Ely B. Genetics of *Caulobacter crescentus*. Methods Enzymol. 1991;204:372-84.
- Evinger M, Agabian N. Envelope-associated nucleoid from *Caulobacter crescentus* stalked and swarmer cells. J Bacteriol. 1977 Oct;132(1):294-301.
- Ferianc P, Farewell A, Nystrom T. The cadmium-stress stimulon of *Escherichia coli* K-12. Microbiology. 1998 Apr;144 (Pt 4):1045-50.
- Fernandes R LW, Fontes M and Fontes L. Avaliação da concentração de metais pesados em áreas olerícolas no Estado de Minas Gerais. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental. 2007;11(1):12.
- Filee P, Benlafya K, Delmarcelle M, Moutzourelis G, Frere JM, Brans A, et al. The fate of the BlaI repressor during the induction of the *Bacillus licheniformis* BlaP beta-lactamase. Mol Microbiol. 2002 May;44(3):685-94.
- Fujita Y, Fujita T, Miwa Y, Nihashi J, Aratani Y. Organization and transcription of the gluconate operon, gnt, of *Bacillus subtilis*. J Biol Chem. 1986 Oct 15;261(29):13744-53.
- Giedroc DP, Arunkumar AI. Metal sensor proteins: nature's metalloregulated allosteric switches. Dalton Trans. 2007 Aug 7(29):3107-20.
- Gober JW, Shapiro L. A developmentally regulated *Caulobacter* flagellar promoter is activated by 3' enhancer and IHF binding elements. Mol Biol Cell. 1992 Aug;3(8):913-26.
- Golemi-Kotra D, Cha JY, Meroueh SO, Vakulenko SB, Mobashery S. Resistance to beta-lactam antibiotics and its mediation by the sensor domain of the transmembrane BlaR signaling pathway in *Staphylococcus aureus*. J Biol Chem. 2003 May 16;278(20):18419-25.
- Grass G, Grosse C, Nies DH. Regulation of the cnr cobalt and nickel resistance determinant from *Ralstonia sp.* strain CH34. J Bacteriol. 2000 Mar;182(5):1390-8.
- Grosse C, Anton A, Hoffmann T, Franke S, Schleuder G, Nies DH. Identification of a regulatory pathway that controls the heavy-metal resistance system Czc via promoter czcNp in *Ralstonia metallidurans*. Arch Microbiol. 2004 Oct;182(2-3):109-18.
- Guglierame P, Pasca MR, De Rossi E, Buroni S, Arrigo P, Manina G, et al. Efflux pump genes of the resistance-nodulation-division family in *Burkholderia cenocepacia* genome. BMC Microbiol. 2006;6:66.
- Haferburg G, Kothe E. Microbes and metals: interactions in the environment. J Basic Microbiol. 2007 Dec;47(6):453-67.
- Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J Mol Biol. 1983 Jun 5;166(4):557-80.
- Hanique S, Colombo ML, Goormaghtigh E, Soumilion P, Frere JM, Joris B. Evidence of an intramolecular interaction between the two domains of the BlaR1 penicillin receptor during the signal transduction. J Biol Chem. 2004 Apr 2;279(14):14264-72.
- Hantke K. Bacterial zinc transporters and regulators. Biometals. 2001 Sep-Dec;14(3-4):239-49.

- Hillson NJ, Hu P, Andersen GL, Shapiro L. *Caulobacter crescentus* as a whole-cell uranium biosensor. *Appl Environ Microbiol*. 2007 Dec;73(23):7615-21.
- Hsieh JL, Chen CY, Chang JS, Endo G, Huang CC. Overexpression of a single membrane component from the *Bacillus mer* operon enhanced mercury resistance in an *Escherichia coli* host. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2007 Jun;71(6):1494-9.
- Hu N, Zhao B. Key genes involved in heavy-metal resistance in *Pseudomonas putida* CD2. *FEMS Microbiol Lett*. 2007 Feb;267(1):17-22.
- Hu P, Brodie EL, Suzuki Y, McAdams HH, Andersen GL. Whole-genome transcriptional analysis of heavy metal stresses in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol*. 2005 Dec;187(24):8437-49.
- Ivask A, Francois M, Kahru A, Dubourguier HC, Virta M, Douay F. Recombinant luminescent bacterial sensors for the measurement of bioavailability of cadmium and lead in soils polluted by metal smelters. *Chemosphere*. 2004 Apr;55(2):147-56.
- Iwig JS, Rowe JL, Chivers PT. Nickel homeostasis in *Escherichia coli* - the *rcnR-rcnA* efflux pathway and its linkage to NikR function. *Mol Microbiol*. 2006 Oct;62(1):252-62.
- Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2009 Jan;22(1):161-82.
- Jenal U. Signal transduction mechanisms in *Caulobacter crescentus* development and cell cycle control. *FEMS Microbiol Rev*. 2000 Apr;24(2):177-91.
- Jenal U, Fuchs T. An essential protease involved in bacterial cell-cycle control. *EMBO J*. 1998 Oct 1;17(19):5658-69.
- Kaye KS, Engemann JJ, Fraimow HS, Abrutyn E. Pathogens resistant to antimicrobial agents: epidemiology, molecular mechanisms, and clinical management. *Infect Dis Clin North Am*. 2004 Sep;18(3):467-511.
- Kim EH, Nies DH, McEvoy MM, Rensing C. Switch or funnel: how RND-type transport systems control periplasmic metal homeostasis. *J Bacteriol*. 2011 May;193(10):2381-7.
- Laddaga RA, Bessen R, Silver S. Cadmium-resistant mutant of *Bacillus subtilis* 168 with reduced cadmium transport. *J Bacteriol*. 1985 Jun;162(3):1106-10.
- Laub MT, McAdams HH, Feldblyum T, Fraser CM, Shapiro L. Global analysis of the genetic network controlling a bacterial cell cycle. *Science*. 2000 Dec 15;290(5499):2144-8.
- Laub MT, Shapiro L, McAdams HH. Systems biology of *Caulobacter*. *Annu Rev Genet*. 2007;41:429-41.
- Legatzki A, Grass G, Anton A, Rensing C, Nies DH. Interplay of the Czc system and two P-type ATPases in conferring metal resistance to *Ralstonia metallidurans*. *J Bacteriol*. 2003 Aug;185(15):4354-61.
- Liu XF, Culotta VC. Post-translation control of Nramp metal transport in yeast. Role of metal ions and the BSD2 gene. *J Biol Chem*. 1999 Feb 19;274(8):4863-8.

- Llarrull LI, Prorok M, Mobashery S. Binding of the gene repressor BlaI to the bla operon in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry*. 2010 Sep 21;49(37):7975-7.
- Lourenço RF, Gomes SL. The transcriptional response to cadmium, organic hydroperoxide, singlet oxygen and UV-A mediated by the sigmaE-ChrR system in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol*. 2009 Jun;72(5):1159-70.
- Lourenço RF, Kohler C, Gomes SL. A two-component system, an anti-sigma factor and two paralogous ECF sigma factors are involved in the control of general stress response in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol*. 2011 Jun;80(6):1598-612.
- Lovley DR. Cleaning up with genomics: applying molecular biology to bioremediation. *Nat Rev Microbiol*. 2003 Oct;1(1):35-44.
- Ma Z, Jacobsen FE, Giedroc DP. Metal Transporters and Metal Sensors: How Coordination Chemistry Controls Bacterial Metal Homeostasis. *Chemical reviews*. 2009;109(10):38.
- Magnani D, Solioz M. Copper chaperone cycling and degradation in the regulation of the cop operon of *Enterococcus hirae*. *Biometals*. 2005 Aug;18(4):407-12.
- Majewska M, Kurek E, Rogalski J. Microbially mediated cadmium sorption/desorption processes in soil amended with sewage sludge. *Chemosphere*. 2007 Mar;67(4):724-30.
- Margolin W. Bacterial shape: concave coiled coils curve *Caulobacter*. *Curr Biol*. 2004 Mar 23;14(6):R242-4.
- Marshak DR, Kadonaga JT, Burgess RR, Knuth, M, Brennanm WA, Lin SH. Purification of a recombinant protein overproduced in *Escherichia coli*. In: *Strategies for protein purification and characterization*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1996. p205-74.
- Martinez RJ, Wang Y, Raimondo MA, Coombs JM, Barkay T, Sobecky PA. Horizontal gene transfer of PIB-type ATPases among bacteria isolated from radionuclide- and metal-contaminated subsurface soils. *Appl Environ Microbiol*. 2006 May;72(5):3111-8.
- Matagne A, Lamotte-Brasseur J, Frere JM. Catalytic properties of class A beta-lactamases: efficiency and diversity. *Biochem J*. 1998 Mar 1;330 (Pt 2):581-98.
- Miller JH. *Experiments in molecular genetics*. New York: Cold Spring Harbor, Laboratory Press; 1972. 466 p.
- Mitra A. Rising population and environmental degradation. *Yojana*. 1984 Oct 1-15;28(18):4-8.
- Mitra RS, Bernstein IA. Single-strand breakage in DNA of *Escherichia coli* exposed to Cd²⁺. *J Bacteriol*. 1978 Jan;133(1):75-80.
- Monchy S, Benotmane MA, Janssen P, Vallaeys T, Taghavi S, van der Lelie D, et al. Plasmids pMOL28 and pMOL30 of *Cupriavidus metallidurans* are specialized in the maximal viable response to heavy metals. *J Bacteriol*. 2007 Oct;189(20):7417-25.

- Montanini B, Blaudez D, Jeandroz S, Sanders D, Chalot M. Phylogenetic and functional analysis of the cation diffusion facilitator (CDF) family: improved signature and prediction of substrate specificity. *BMC Genomics*. 2007;8:107.
- Moore CM, Gaballa A, Hui M, Ye RW, Helmann JD. Genetic and physiological responses of *Bacillus subtilis* to metal ion stress. *Mol Microbiol*. 2005 Jul;57(1):27-40.
- Nakajima H, Kobayashi K, Kobayashi M, Asako H, Aono R. Overexpression of the *robA* gene increases organic solvent tolerance and multiple antibiotic and heavy metal ion resistance in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 1995 Jun;61(6):2302-7.
- Nathan P, Newton A. Identification of two new cell division genes that affect a high-molecular-weight penicillin-binding protein in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol*. 1988 May;170(5):2319-27.
- Nicholas KaN, HB. Gene Doc. A tool for editing and annotating multiple sequence alignments 1997; v 2.6.002.2002.
- Nierman WC, Feldblyum TV, Laub MT, Paulsen IT, Nelson KE, Eisen JA, et al. Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Mar 27;98(7):4136-41.
- Nies DH. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev*. 2003 Jun;27(2-3):313-39.
- Nzengue Y, Candeias SM, Sauvaigo S, Douki T, Favier A, Rachidi W, et al. The toxicity redox mechanisms of cadmium alone or together with copper and zinc homeostasis alteration: its redox biomarkers. *J Trace Elem Med Biol*. 2011 Jul;25(3):171-80.
- Patel J, Wilson G, McKay RM, Vincent R, Xu Z. Self-immobilization of recombinant *Caulobacter crescentus* and its application in removal of cadmium from water. *Appl Biochem Biotechnol*. 2010 Oct;162(4):1160-73.
- Pennella MA, Giedroc DP. Structural determinants of metal selectivity in prokaryotic metal-responsive transcriptional regulators. *Biometals*. 2005 Aug;18(4):413-28.
- Perron K, Caille O, Rossier C, Van Delden C, Dumas JL, Kohler T. CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*. 2004 Mar 5;279(10):8761-8.
- Poindexter JS. Biological properties and classification of the *Caulobacter* group. *Bacteriol Rev*. 1964 Sep;28:231-95.
- Portmann R, Poulsen KR, Wimmer R, Solioz M. CopY-like copper inducible repressors are putative 'winged helix' proteins. *Biometals*. 2006 Feb;19(1):61-70.
- Outten FW, Outten CE, Hale J, O'Halloran TV. Transcriptional activation of an *Escherichia coli* copper efflux regulon by the chromosomal MerR homologue, cueR. *J Biol Chem*. 2000 Oct 6;275(40):31024-9.
- Rensing C. Form and function in metal-dependent transcriptional regulation: dawn of the enlightenment. *J Bacteriol*. 2005 Jun;187(12):3909-12.

- Rigali S, Derouaux A, Giannotta F, Dusart J. Subdivision of the helix-turn-helix GntR family of bacterial regulators in the FadR, HutC, MocR, and YtrA subfamilies. *J Biol Chem*. 2002 Apr 12;277(15):12507-15.
- Rosen BP. Transport and detoxification systems for transition metals, heavy metals and metalloids in eukaryotic and prokaryotic microbes. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2002 Nov;133(3):689-93.
- Rossbach S, Kukuk ML, Wilson TL, Feng SF, Pearson MM, Fisher MA. Cadmium-regulated gene fusions in *Pseudomonas fluorescens*. *Environ Microbiol*. 2000 Aug;2(4):373-82.
- Ruiz N, Montero T, Hernandez-Borrell J, Vinas M. The role of *Serratia marcescens* porins in antibiotic resistance. *Microb Drug Resist*. 2003 Fall;9(3):257-64.
- Safo MK, Zhao Q, Ko TP, Musayev FN, Robinson H, Scarsdale N, et al. Crystal structures of the BlaI repressor from *Staphylococcus aureus* and its complex with DNA: insights into transcriptional regulation of the bla and mec operons. *J Bacteriol*. 2005 Mar;187(5):1833-44.
- Sakoh M, Ito K, Akiyama Y. Proteolytic activity of HtpX, a membrane-bound and stress-controlled protease from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 2005 Sep 30;280(39):33305-10.
- Sala C, Haouz A, Saul FA, Miras I, Rosenkrands I, Alzari PM, et al. Genome-wide regulon and crystal structure of BlaI (Rv1846c) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*. 2009 Mar;71(5):1102-16.
- Salverda ML, De Visser JA, Barlow M. Natural evolution of TEM-1 beta-lactamase: experimental reconstruction and clinical relevance. *FEMS Microbiol Rev*. 2010 Nov;34(6):1015-36.
- Sambrook J, Frisch E, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbour; 1989.
- Schirawski J, Hagens W, Fitzgerald GF, Van Sinderen D. Molecular characterization of cadmium resistance in *Streptococcus thermophilus* strain 4134: an example of lateral gene transfer. *Appl Environ Microbiol*. 2002 Nov;68(11):5508-16.
- Schmidt T, Schlegel HG. Combined nickel-cobalt-cadmium resistance encoded by the ncc locus of *Alcaligenes xylosoxidans* 31A. *J Bacteriol*. 1994 Nov;176(22):7045-54.
- Silveira ML, Ala GL. Biosolids and heavy metals in soils. *Scientia Agricola*. 2003;40(4):14.
- Silver S. Exploiting heavy metal resistance systems in bioremediation. *Res Microbiol*. 1994 Jan;145(1):61-7.
- Silver S. Bacterial resistances to toxic metal ions--a review. *Gene*. 1996a Nov 7;179(1):9-19.
- Silver S, Phung le T. A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2005 Dec;32(11-12):587-605.
- Silver S, Phung LT. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annu Rev Microbiol*. 1996b;50:753-89.

Simm AM, Higgins CS, Pullan ST, Avison MB, Niumsup P, Erdozain O, et al. A novel metallo-beta-lactamase, Mbl1b, produced by the environmental bacterium *Caulobacter crescentus*. FEBS Lett. 2001 Dec 14;509(3):350-4.

Simon R, Prieffer, U. and Puhler, A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. Nat Biotechnol. 1983;1:784:791.

Smith KP, Kumar S, Varela MF. Identification, cloning, and functional characterization of EmrD-3, a putative multidrug efflux pump of the major facilitator superfamily from *Vibrio cholerae* O395. Arch Microbiol. 2009 Dec;191(12):903-11.

Sohn JH, Han KL, Choo JH, Hwang JK. Macelignan protects HepG2 cells against tert-butylhydroperoxide-induced oxidative damage. Biofactors. 2007;29(1):1-10.

Stahler FN, Odenbreit S, Haas R, Wilrich J, Van Vliet AH, Kusters JG, et al. The novel *Helicobacter pylori* CznABC metal efflux pump is required for cadmium, zinc, and nickel resistance, urease modulation, and gastric colonization. Infect Immun. 2006 Jul;74(7):3845-52.

Sun Y, Xie Z, Li J, Xu J, Chen Z, Naidu R. Assessment of toxicity of heavy metal contaminated soils by the toxicity characteristic leaching procedure. Environ Geochem Health. 2006 Feb-Apr;28(1-2):73-8.

Tada Y, Inoue T. Use of oligotrophic bacteria for the biological monitoring of heavy metals. J Appl Microbiol. 2000 Jan;88(1):154-60.

Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. Am J Med. 2006 Jun;119(6 Suppl 1):S3-10; discussion S62-70.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 1997 Dec 15;25(24):4876-82.

Truong-Bolduc QC, Hooper DC. The transcriptional regulators NorG and MgrA modulate resistance to both quinolones and beta-lactams in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol. 2007 Apr;189(8):2996-3005.

Tully DB, Collins BJ, Overstreet JD, Smith CS, Dinse GE, Mumtaz MM, et al. Effects of arsenic, cadmium, chromium, and lead on gene expression regulated by a battery of 13 different promoters in recombinant HepG2 cells. Toxicol Appl Pharmacol. 2000 Oct 15;168(2):79-90.

Valls M, de Lorenzo V. Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. FEMS Microbiol Rev. 2002 Nov;26(4):327-38.

VanBogelen RA, Kelley PM, Neidhardt FC. Differential induction of heat shock, SOS, and oxidation stress regulons and accumulation of nucleotides in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 1987 Jan;169(1):26-32.

Vindal V, Suma K, Ranjan A. GntR family of regulators in *Mycobacterium smegmatis*: a sequence and structure based characterization. BMC Genomics. 2007;8:289.

- Von Rozycki T, Nies DH. *Cupriavidus metallidurans*: evolution of a metal-resistant bacterium. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2009 Aug;96(2):115-39.
- Vreuls C, Filee P, Van Melckebeke H, Aerts T, De Deyn P, Llabres G, et al. Guanidinium chloride denaturation of the dimeric *Bacillus licheniformis* BlaI repressor highlights an independent domain unfolding pathway. *Biochem J*. 2004 Nov 15;384(Pt 1):179-90.
- Wang A, Crowley DE. Global gene expression responses to cadmium toxicity in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2005 May;187(9):3259-66.
- Weiss AA, Silver S, Kinscherf TG. Cation transport alteration associated with plasmid-determined resistance to cadmium in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1978 Dec;14(6):856-65.
- Wilke MS, Hills TL, Zhang HZ, Chambers HF, Strynadka NC. Crystal structures of the Apo and penicillin-acylated forms of the BlaR1 beta-lactam sensor of *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*. 2004 Nov 5;279(45):47278-87.
- Wu CC, Gardarin A, Martel A, Mintz E, Guillain F, Catty P. The cadmium transport sites of CadA, the Cd²⁺-ATPase from *Listeria monocytogenes*. *J Biol Chem*. 2006 Oct 6;281(40):29533-41.
- Xu Z, Lei Y, Patel J. Bioremediation of soluble heavy metals with recombinant *Caulobacter crescentus*. *Bioeng Bugs*. 2010 May-Jun;1(3):207-12.
- Zhang HZ, Hackbarth CJ, Chansky KM, Chambers HF. A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to beta-lactams in staphylococci. *Science*. 2001 Mar 9;291(5510):1962-5.
- Zhao H, Eide D. The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Mar 19;93(6):2454-8.
- Zhu T, Tian J, Zhang S, Wu N, Fan Y. Identification of the transcriptional regulator NcrB in the nickel resistance determinant of *Leptospirillum ferriphilum* UBK03. *PLoS One*. 2011;6(2):e17367.
- Zwaig N, Nagel de Zwaig R, Isturiz T, Weckslar M. Regulatory mutations affecting the gluconate system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1973 May;114(2):469-73.

ANEXO A.1- Alinhamento da sequência de aminoácidos das proteínas codificada pelos genes CC2724 e CC2390 de *C. crescentus* e proteínas Cnr, NccA e Czc de *Ralstonia metallidurans*

```

          *           20           *           40           *
CzcA   : MFERIISFAIQCRWLVLAVFGMAGLGIFSYNRLFIDAVPEITNVQVQVN :
CC2390 : MLERIIAASIRLRWVVLALVALSAAVGIWSFQRLFIDATPEITNIQVQIN :
CnrA   : MIESIISGSRVRYRWLVLFITAVVAVIGAWQLNLLFIDVTPFITNKEQVQIN :
NccA   : MIGNVLISGSIHYRWLVLFITVIVIAAIGAWQLKLLFIDVTPFITNKEQVQIN :
CC2724 : MIGRIIDL SVRARWAVIAVVALVAALGVYNLIRLFIDAVPEITNKEQVQIN :

          60           *           80           *           100
CzcA   : TSAPGYSPLETEQRATYFIEVVMAGLPGLEQTRSLSRYGLSQVTVIFKDG :
CC2390 : TEAPGFSPLEAEQRVTFFVETAIAGLPGIQYTRSVSRYGLSQVTVVFKDG :
CnrA   : SVVPTMSFVEVEKRVTYFIETAIAGLNGVESTRSMNRNGFSQVTVIFKES :
NccA   : TVVPTLSFVEVEKRVTYFIETAIISGLNGVENTRSMNRNGFSQVTVIFKES :
CC2724 : TVVPALAPAEVEKLVTFVETAMSGIPGLESTRSISRNGFSQVTVIFQEK :

          *           120           *           140           *
CzcA   : TDVYFARQLVNCRIQEAEDNLPEGVVPAMGPISTGLGEIYIWTVEAEE-- :
CC2390 : TDIYFARQLVGERLQSARAQLPEGVNPENMGPISTGLGEIFMYTVEAKP-- :
CnrA   : ANLYFMRQQVSRERLAQARPNLPENVEPQMGFVSTGLGEVFHYSVEVQYPD :
NccA   : ANLYFMRQQVSRERLVQARPSLPAGAEPMQMGFVSTGLGEVFHYSVEVQYPD :
CC2724 : TDLYFARQQVSRERLTSVGKALPEGAQPAMGPISSGLGEVLMWTVAYDHFG :

          160           *           180           *           200
CzcA   : --GARKADGTAYTPTD-----LREIQDWVVRPQLR :
CC2390 : --GARPPDGKAWTPED-----LRTLQDWVIRPQLR :
CnrA   : GTGASIKDGEFGWQSDGSFLTERGERLDERVSRLAYLRTVQDWIIRPQLR :
NccA   : GKGAPIKDGAFGWQSDGSFLTERGERLDERVSKLAYLRTVQDWIIRPQLR :
CC2724 : GRGARVKDGAFGWQSDGAYLTITGERLTDTTAQAAYLREVQDWIIRPQMR :

          *           220           *           240           *
CzcA   : NVPGVIEINTIGGFNKQYLVAPSLERLASVGLTLTDVVNAINKNNINVGA :
CC2390 : NTPGVIEVNTIGGFERQYHVTPLPDRLSAYGLTMGDVVTALEKNNANVGA :
CnrA   : TTPGVADVDSLGGYVEKQFVVEPTTGKMAAYGVSYADLARAIEDTNISVGA :
NccA   : TTAGVADVDSLGGYVEKQFVVEPTAARMAAYGISYGDLAQAIEDANISVGA :
CC2724 : GVAGVAGVDSIGGYEKQFAVQPPPARMASYGVSFSQLAKAIEAANIAVGA :

          260           *           280           *           300
CzcA   : GYIERRGEQYLVRAPGQVASEDRIIRNIIVGTAQGQPIRIRIDIGDVEIGKE :
CC2390 : GYIERYGEQYLIRVPGQATGVEELKAVIVASRNGAPIRVADIADVGLGEE :
CnrA   : NFIRRSGESYLVRADARIKSADEISRAVIAQRQNVPTITVGQVARVEIGGE :
NccA   : NFMRRSGESYLVRADARIKSADEISRAVIAHRQNVPTITVGQVASVEIGGE :
CC2724 : NFMERGGEAYLVRADARVRNIDEIANATVATRAGMPIRVRELATLEVGGG :

```

```

          *           320           *           340           *
CzcA   : LRTGAATENGKEVVLGTVFMLIGENSRVSKAVDEKVASINRTMPEGVKI :
CC2390 : LRTGAATENGQEVVLGTVFMLVGENSRTVARATAARLEEAAKALPAGVTA :
CnrA   : LRSGAASRNGNETVVGSALMLVGENSRTVAQAVGTEKLEQISKTLPPGVVI :
NccA   : LRSGAASRNGQETVIGSALMLVGENSRTVAQDVGTEKLEQISKTLPPGVVI :
CC2724 : LRTGAASENGEEVVVGTVLMLTGENSRVAVAGASAERLKAI AKTLPPGVVRV :

```

```

          360           *           380           *           400
CzcA   : WTVDPTRLVDKAIATVFEKNLLEGAVLVIVILFLFLGNIRAAALITATIIP :
CC2390 : EPIYDPTNLVDRAIATVEKNLVEGAILVIVVLFLILGNIRAAALITA AVIP :
CnrA   : WPTLNRSQLVITATVETVARNLIEGALLVVAILFAILGNWRAATIAALVIP :
NccA   : WPTLNRSQLVITATVETVARNLVEGALLVVVILFLILGNWRAAVIAALVIP :
CC2724 : QITYDRSKLVNATIKTVEKNLVEGALLVIAVLFLVILGNFRAALITALVIP :

```

```

          *           420           *           440           *
CzcA   : LAMLFTFTGMVNYKISANLMSLGLDFGIIIDGAVVIVENCVRRLAH AQE :
CC2390 : LSMFLTIITGMVQSKVSGNLMSLGLDFGLIIVDGA VIIVENCLRLRLEAQH :
CnrA   : LSLLVSAIGMNQFHHISGNLMSLGLDFGLIIDGAVIIVENSLRRLAERQH :
NccA   : LSMLVSAIGMNQLGISGNLMSLGLDFGLIIDGAVIIVENTLRLRLAQRQH :
CC2724 : LSMLMTAIGMNRGLGVSGNLMSLGLDFGLIIVDGA VIIVENSLRRLAERQH :

```

```

          460           *           480           *           500
CzcA   : HHGRPITRSERFHEVFARAKEARRFLIFGQLIIMTVYLPFIFALTGVEGKM :
CC2390 : RYGRLLSRDERFALVAGATSEVIRPSLFGVLIITIVYVPFIFALTGVEGKM :
CnrA   : REGRLITLDERIQEVVQSSREMVRPTVYQQLVIFVWFLPCITFQGVGKM :
NccA   : QEGRLITLBERIDEVLLSSREMIRPTIYQQLVIFIVFLPCITFQGVGKM :
CC2724 : QEGRLITSSERIHETREAREMIAPTVYQQAIIILIVYAPLITFTGVEGKT :

```

```

          *           520           *           540           *
CzcA   : FHPMAFTVVLAILGAMIISVTFVPAAVAFIFIGERVAEKENRLMLWAKRRY :
CC2390 : FHPMAITVVIAITAALVISLTFVPAAVAFVFTGKVEEKENLIMRGARRLY :
CnrA   : FSPMVITLMLALASAFVISLTFVPAMVAVMLRKKVAETEVEVVI VATKESY :
NccA   : FSPMVMTLMLALASAFVISLTFVPAMLAVLLRKEVSEKEVEVVI VATRQWY :
CC2724 : FSPMAITVMLALAAAFVISLTFIPAMVALLIRGKVAEKEVALVRWAKVGY :

```

```

          560           *           580           *           600
CzcA   : EPLLESLANTAVVLTFAAVSIVLCVAIAARLGSEFIPNLNEGDIATQAL :
CC2390 : EPALETALRLRVAFVAGAVLLVAIAAFAASRMGSEFVFNLEEGDIAMHAL :
CnrA   : RPWLEHAVARPMPFIFAGIATVAVATVAFTFVGREFMPTLLEELNLNLSSV :
NccA   : RPWLERAVARPIPFVGAGLLVLALAAVAFVVGREFMPTLLEQNLNLSSV :
CC2724 : APLLRRAVARPWFVIAAATGLFVAMITFTFLGREFTPQLLEKDLAVQAL :

```

```

      *           620           *           640           *
CscA   : RIPGTSLSQSVEMQKT IETTLKAKFPEIERVFPARTGTAEIASDLMEFPNIS :
CC2390 : RIPGTSLSQAIAMQTALAKVKT-LPEVIRVVSKIGTAEVATDEMFEPNVA :
CnrA   : RIPSTSIDQSVAILDLPLERAVLS-LPEVQTVYSKAGTASLAADFMFPNAS :
NccA   : RIPSTSIDQSVAILDLPLERAVLS-LPEVKTIVYSKAGTASLAADFMFPNAS :
CC2724 : RIPSTSLQSLRMQRQIERTIAA-FPEVEFVYSKIGTAEVASDFMFPNAS :

      660           *           680           *           700
CscA   : DGYIMLKPEKDWPEPKKTHAELISAIQEEAGKIPGNMYEFSQPIQIRFNE :
CC2390 : DTFIMLKDRKDWPDPRKERAQLVAELEAVVAKVPGNMYEFTQPIQMRFNE :
CnrA   : DNYIILKPKSEWPEGVTITKEQVIERIREKTAPMVGNMYDVTQPIEMRFNE :
NccA   : DNYIILKPKSEWPDGVTTKEQVIERIREKTAPMVGNMYDVTQPIEMRFNE :
CC2724 : DSFIILKAQDEWPDSEKQSKAQLVDRMERKLEGLTGNVYEFSPQPIQMRFNE :

      *           720           *           740           *
CscA   : LISGVRSDVAVEIFGDDNNVLSETAKKVSAVLOGIPGAQEVKVEQTTGLP :
CC2390 : LLSGVRADVAVFVFGDDIDQLLAIGEQIGGVIEGVGAQDVGVVEQVTGLP :
CnrA   : LIGGVRSDVAVEVYGENIDELAATAQRIAAVLKRTPGATDVRVPLTSGFP :
NccA   : LIGGVRSDVAVEIYGENIDDLTATGQRIAAVLKRTPGATDVRVPLTSGFP :
CC2724 : LIAGVSGDVAVIEVYGGDILAAMTASADQIAGVLRGVGAADVVRVEQTSGFP :

      760           *           780           *           800
CscA   : MLTVKIDREKAARYGLNMSDVQLA VATGVGGRDSGTFFQGERRFEDIVVRL :
CC2390 : VLQITFDRAALARLGLNVDDVQSVVATAIGGTVTGQVFEGERRFEDVVVRL :
CnrA   : TFDIVFDRAAIARYGLTVKEVAITISTAMAGRPAGQIFDGERRFEDIVIRL :
NccA   : TFDIVFDRAAIARYGLTVKEVAITVSAAMAGRPAGQIFDGERRYDIVIRL :
CC2724 : TLDVSLDRDAIGRLGLTVEEVADITLAVAMGGRASGLVFPQGERRFEDVVRL :

      *           820           *           840           *
CscA   : PEAVRGEVEALRRLPIPIPKGVIA-RTTFIPLSEVATLEMAPGPNQISRE :
CC2390 : PEAVRGRIDDIGRLRIPIPGAIDQ-PRGFVPLQDVARIEMVIGPNQISRE :
CnrA   : PGEQRENLDVLGALFVMIPLSEGG-ARASVPLRQIVQFRFTQGLNEVSRD :
NccA   : PGNQRENLDVLGALFVMIPLAASDQ-ARVSVPLRQIVEFRFTQGLNEVSRD :
CC2724 : PEATRNDLDAIGALFVMIPHGASAGPRLSVPLRDVARFSPSEGLNQVSRD :

      860           *           880           *           900
CscA   : NGKRRIVISANVRGRDIGSFVPEAEAAIQSQVKIEAGYWMTWGGTFEQLQ :
CC2390 : DGKRRIVVTANVRGRDLGSFITEVQRKVGAQVELFTGYWITYGGAFEQLI :
CnrA   : NGKRRVYVEANVGRDLGSFVDIAAARIAKEVKLEPFGMYIEWGGQFQNLQ :
NccA   : NGKRRVYVEANVGRDLGSFVDIAAARIAARDVKLEPFGMYIEWGGQFQNLQ :
CC2724 : NGKRRVVVQANVRGNDLGSFVSEAQAKVSAQIELEAGSWVEWSGQFENLK :

```

```

          *          920          *          940          *
CzcA   : SATTRIQVVVPVALLLVFVLLFAMFNNIKDGLLVFTGIPFALTGGILALW :
CC2390 : SAAQRIQLVVPAAALLLIFGLLYALFRSVKDAAIVFSGVPLALTGGVAALL :
CnrA   : AATKRLAIIIVPLCFILIAATLYMAIGSAAALTATVITAVPLALAGGVFALL :
NccA   : AATKRLAMIVPACFVLIAAALYMAIGNAMLTATVITAVPLALAGGVFALL :
CC2724 : AAQSRISLVVPLCFLLIFALLYMALGGFAPALAVFSAIPLALAGGVFGLA :

          960          *          980          *          1000
CzcA   : IRGIPMSITAAVGFIALCGVAVINGLVMLSFIRSIREEGHSLDSAVRVGA :
CC2390 : LRGMPLISISAGVGFIALSGVAVINGVVMVSFIRTLRQQGTIVDHAIREGA :
CnrA   : LRGIPFSISAAVGFIAVSGVAVINGLVLISAIRKRLDDGMAPDAAVIEGA :
NccA   : LRGIPFSISAAVGFIAVSGVAVINGLVLISAIRKRLEDGVAPDAAVIDGA :
CC2724 : LRGIPFSVSAAVGFIALSGVAVINGLVMMTAIRQRLAQGLALEQAIIGA :

          *          1020          *          1040          *
CzcA   : LTRLRFVLMTAIVASLGFVPMATATGTGAEVQRPLATVVIGGILSSTALT :
CC2390 : LTRLRFVLMTAIVASLGFVPMATFNVGAGAEVQRPLATVVIGGIISSTLLT :
CnrA   : MERVRFVLMTAIVASLGFVPMATATGTGAEVQKPLATVVIGGLVITATVLT :
NccA   : MERVRFVLMTAIVASLGFVPMALATGTGAEVQKPLATVVIGGLITATVLT :
CC2724 : MERLRFVMMTGIVASLGFVPMALATETGAEVQRPLATVVIGGLITATALT :

          1060          *          1080
CzcA   : LLVLPVLYRLAHRKDEDAEDTREPVTQTHQPDQGBQPA : 1063
CC2390 : LQVLPALYRLAYSQARAVR----- : 1043
CnrA   : LFLVLPALCGIVLRRTAGRPEACAALAE----- : 1076
NccA   : LFLVLPALICGMVVRKRGAGVGRTELAE----- : 1076
CC2724 : LFLVLPALICRFVLRQAPKATPEPAAPPQEQA----- : 1080

```

Aminoácidos idênticos são marcados num fundo amarelo, no fundo cinza ou azul claro são marcados os aminoácidos conservados.

Fonte: Valencia, E.Y. (2012).

ANEXO A.2- Tabela. Análise comparativo (porcentagem de identidade) de proteínas de sistemas HME-RND de *R. metallidurans*^a e *C. crescentus*^b envolvidas na resistência a metais

Proteína (AA)	CC2390 (1043)	CC2724 (1080)	CzcA (1083)	CnrA (1076)	NccA (1076)
CC2390 (1043)	100	56	63	50	50
CC2724 (1080)	56	100	53	61	62
CzcA (1083)	63	53	100	48	47
CnrA (1076)	50	61	48	100	89
NccA (1076)	50	62	47	89	100

^a CzcA, CnrA e NccA

^b CC2724 e CC2390