

**Universidade de Lisboa**  
**Faculdade de Ciências**  
**Departamento de Biologia Animal**



**Análise genética e funcional do gene *rnr*, uma exoribonuclease de  
*Burkholderia cenocepacia*: implicações na resposta ao stresse  
térmico, na regulação do ciclo celular e na virulência**

**Pedro Rafael Da Costa Antas**

**Mestrado em Biologia Humana e Ambiente**

**2010**

**Universidade de Lisboa**  
**Faculdade de Ciências**  
**Departamento de Biologia Animal**



**Análise genética e funcional do gene *rrn*, uma exoribonuclease de  
*Burkholderia cenocepacia*: implicações na resposta ao stresse  
térmico, na regulação do ciclo celular e na virulência**

**Pedro Rafael Da Costa Antas**

Dissertação de Mestrado em Biologia Humana e Ambiente orientada por:

**Doutor Arsénio Fialho** – Instituto para a Biotecnologia e Bioengenharia (IBB)

**Doutora Deodália Dias** – Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

**2010**

A presente dissertação teve ainda a colaboração de:

**Doutora Cecilia Arraiano** – Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB)



# Índice

<b>1. Abreviaturas .....</b>	<b>iii</b>
<b>2. Sumário .....</b>	<b>iv</b>
<b>3. Abstract.....</b>	<b>v</b>
<b>4. Introdução .....</b>	<b>1</b>
4.1 Taxonomia de <i>Burkholderia</i> e o Complexo <i>Burkholderia cepacia</i> .....	2
4.1.1 Ecologia e diversidade no meio ambiente .....	4
4.1.2 <i>Burkholderia</i> como patogénico oportunista .....	5
4.1.3 Aspectos genéticos e epidemiológicos da Fibrose Quística .....	6
4.1.4 Patofisiologia da fibrose quística.....	6
4.1.5 Aquisição e transmissão de bactérias do género <i>Burkholderia</i> .....	8
4.2 Factores e Mecanismos de Patogenicidade .....	10
4.2.1 Lipopolissacarídeos.....	11
4.2.2 Pili e adesina 22KDa.....	11
4.2.3 Adesinas triméricas de autotransporte.....	12
4.2.4 Flagelo.....	13
4.2.5 Proteínas extracelulares .....	13
4.2.6 Siderofóros .....	14
4.2.7 Exopolissacarídeos.....	15
4.2.8 <i>Quorum sensing</i> .....	15
4.2.9 Biofilmes .....	16
4.2.10 Resistência a antibióticos .....	17
4.2.11 RNases como factores de virulência.....	18
4.3 Controlo da expressão genética e a resposta ao stresse .....	19

4.3.1	RNase R em resposta a múltiplas condições de stresse.....	20
4.3.2	Níveis da RNase R durante o crescimento.....	20
4.3.3	Níveis da RNase R em resposta ao choque por frio .....	21
4.4	Modelos para estudos de infecção .....	22
<b>5.</b>	<b>Resultados e Discussão .....</b>	<b>24</b>
<b>6.</b>	<b>Conclusões.....</b>	<b>48</b>
<b>7.</b>	<b>Materiais e Metodologias .....</b>	<b>51</b>
<b>8.</b>	<b>Agradecimentos.....</b>	<b>58</b>
<b>9.</b>	<b>Referências .....</b>	<b>59</b>

## 1. Abreviaturas

---

**Bcc** – Complexo *Burkholderia cepacia*, **BCESM** – Estirpe epidémica de *Burkholderia cepacia*, **cci** – ilha de *Burkholderia cenocepacia*, **c.f.u.**- unidades formadoras de colónias, **CFTR** – Regulador de condutância transmembranar de fibrose quística, **CGD** – doença granulomatosa, **DAPI** - 4',6-diamidino-2-fenillindole, **DNA** - ácido dexosiribonucleico, **dNTP** – desoxinucleósidos trifosfatados, **EPS** – exopolisacarídeos, **FQ**- fibrose quística, **LB** - *Luria-Bertani*, **LPS** – Lipopolisacarídeos, **PCR** – reacção em cadeia da polimerase, **pb**- pares de bases, **RNA**- ácido ribonucleico, **mRNA** – ácido ribonucleico mensageiro, **rRNA** – ácido ribonucleico ribossomal, **tRNA** – ácido ribonucleico transferência, **RT-PCR** - reacção em cadeia da polimerase em tempo real.

## 2. Sumário

---

Algumas espécies bacterianas pertencentes ao Complexo *Burkholderia cepacia* (Bcc) são patogénicos oportunistas de humanos com o sistema imunitário comprometido e em especial de pacientes com fibrose quística (FQ). O ambiente pulmonar destes doentes permite a estas bactérias uma colonização eficaz criando infecções capazes de conduzir à morte de pacientes. A variedade de potenciais factores e mecanismos de virulência destes organismos têm sido objecto de vários estudos. Neste trabalho avaliamos o papel da RNase R, uma exoribonuclease 3'-5', na virulência de *Burkholderia cenocepacia* K56-2, uma espécie pertencente à linhagem epidémica de Edimburgo-Toronto (ET)-12. Este microrganismo apresenta uma elevada capacidade de resposta a alterações das condições ambientais e a remodelação da sua expressão genética é um processo fundamental nesta resposta. Neste sentido o estudo da maquinaria de degradação do RNA e principalmente as RNases é fundamental. A RNase R não só tem vindo a ser implicada na virulência em vários organismos patogénicos para o Homem como também está descrita como uma importante proteína de resposta a stresse.

Neste trabalho é demonstrado um papel fundamental da RNase R para o funcionamento correcto do ciclo celular. A ausência desta proteína leva a septação incompleta das células e diminui a viabilidade celular neste microrganismo. Comprova-se ainda, *in vivo* no modelo *Galleria mellonella*, que a proteína RNase R é importante na virulência de *B.cenocepacia* e que a expressão deste gene aparece aumentada em stresses ambientais como por exemplo a resposta ao choque do frio.

Este estudo é o primeiro efectuado acerca do papel das RNases, em particular a RNase R, no metabolismo e virulência de *B. cenocepacia*. Demonstramos a importância desta proteína, principalmente na virulência e na divisão celular e por isso deverá ser de futuro uma proteína de eleição para estudos mais detalhados em *Burkholderia* e noutros organismos patogénicos.

**Palavras-Chave:** *Burkholderia cenocepacia*, fibrose quística, RNase R, virulência, ciclo celular

### 3. Abstract

---

Some of the members of *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) are opportunistic pathogens to immunocompromised patients, especially those with Cystic Fibrosis. The specific environment existent in the lungs of these patients allows an efficient bacterial colonization, giving rise to infections capable of leading to the death of the human host. The variety of potential factors and virulence mechanisms in these species have been highly explored. In this work, the role of RNase R, an exoribonuclease 3'-5', in the virulence of *Burkholderia cenocepacia* K56-2 belonging to the epidemic lineage Edinburgh-Toronto (ET-12) is assessed. This microorganism has a great ability to quickly adapt to environmental changes and the remodel of their genetic expression profiles is a fundamental step in this response. Therefore, the study of the cellular machinery for RNA degradation, with RNases at the top, is fundamental to understand these mechanisms. RNase R not only has already been associated with virulence in human pathogens but has also been described as an important protein in stress responses.

In this work, it is shown the role of RNase R for a proper progress of the bacteria cell cycle. The absence of this protein leads to an incomplete septation and a decrease in the cell viability in this microorganism. It is also shown, *in vivo* in the *Galleria mellonella* model, that RNase R is important to the virulence of *B. cenocepacia* K56-2 and also that the expression of the encoding gene is increased in response to environmental stress, as an example to the cold shock response.

This study is the first regarding RNases, particularly RNase R, and their influence in the metabolism and virulence of *B. cenocepacia*. It is demonstrated here the importance of this protein in the cell division and virulence factor and it should be seen as another selected target for future studies in *Burkholderia* and another pathogenic microorganisms.

**Keywords:** *Burkholderia cenocepacia*, Cystic Fibrosis, RNase R, virulence, cell cycle





## 4. Introdução

---

#### 4.1 Taxonomia de *Burkholderia* e o Complexo *Burkholderia cepacia*

O género *Burkholderia* refere-se a um grupo de bactérias *gram* negativas muito versátil que ocupa um elevado número de diferentes nichos ecológicos (Coenye & LiPuma, 2003). Desde que o interesse no estudo das bactérias do género *Burkholderia* aumentou, um elevado número de possíveis espécies foram isoladas e descritas. Actualmente, mais de 60 espécies e candidatos a espécies estão assinalados (LiPuma, 2010). O primeiro isolado de *Burkholderia* foi descrito pelo investigador Burkholder nos anos 40 como bactérias fitopatogénicas capazes de causar podridão dos bolbos de cebolas (Burkholder, 1950). Estes isolados, chamados de *cepacia*, foram incluídos no género *Pseudomonas* durante muitos anos devido às suas características fenotípicas (Burkholder, 1950). Em 1992, com o recurso à taxonomia molecular várias espécies do género *Pseudomonas* foram transferidas para um novo género, o género *Burkholderia* em que a *Burkholderia cepacia* foi considerada a espécie tipo (Yabuuchi *et al.*, 1992).

Um estudo em 1997, de base bioquímica, envolvendo a caracterização de bactérias *Burkholderia cepacia*, demonstrou que estas poderiam pertencer a, pelo menos, 5 espécies diferentes (Vandamme *et al.*, 1997). O termo *genomovar* foi então introduzido para denotar grupos de estirpes fenotipicamente semelhantes mas genotipicamente distintas. A espécie até então designada de *Burkholderia cepacia* consistia num conjunto de organismos próximos, embora geneticamente distintos que constituem o designado Complexo *Burkholderia cepacia* (Bcc). Bactérias pertencentes ao Bcc partilham um elevado grau de identidade nas sequências do gene que codifica para a subunidade 16s do rRNA (98% a 100%) e ao gene *recA* (94% a 95%) e níveis moderados de hibridação DNA-DNA (30% a 50%) (Coenye & LiPuma, 2003; Coenye *et al.*, 2001a; Coenye *et al.*, 2001c; Vandamme *et al.*, 1997; Vandamme *et al.*, 2000; Vandamme *et al.*, 2002; Vandamme *et al.*, 2003; Vermis *et al.*, 2004).

Muitas das espécies do género *Burkholderia* são encontradas em ambiente natural e não são patogénicas para o Homem (LiPuma, 2010). Contudo, algumas delas são capazes de causar infecções crónicas e agudas em pessoas com determinado tipo de patologias que serão abordadas mais detalhadamente nos próximos sub-capítulos. Muitas dessas espécies estão incluídas no Bcc, que consiste actualmente em 17 espécies (**Tabela 1**).

Baseado na análise do gene *recA*, a espécie *B.cenocepacia* foi subdividida em 4 subgrupos, denominados de A, B, C e D. O subgrupo A contém as estirpes epidémicas da linhagem de Edimburgo-Toronto (ET)-12 (Vandamme *et al.*, 2003), onde se engloba a *Burkholderia cenocepacia* J2315 e a *Burkholderia cenocepacia* K56-2, que estão na base deste trabalho.

Muitos dos projectos de sequenciação do genoma permitiram que actualmente existam sequências completas e incompletas do genoma de muitas espécies. As sequências dos genomas mostram que todas as espécies *Burkholderia* contêm mais de um cromossoma de elevadas dimensões e os seus genomas variam entre 6 a 9Mpb, um dos maiores genomas observados entre bactérias *gram* negativas (<http://www.bacterio.cict.fr/b/burkholderia.html>; <http://www.burkholderia.com/>; Mahenthiralingam *et al.*, 2005b).

**Tabela 1.** Complexo *Burkholderia cepacia* adaptado de Lipuma *et al.*, 2010

<b>Espécie</b>	<b>Ano de identificação</b>	<b>Referência</b>
<b><i>B. cepacia</i></b>	1950	(Vandamme <i>et al.</i> , 1997)
<b><i>B. multivorans</i></b>	1997	(Vandamme <i>et al.</i> , 1997)
<b><i>B. cenocepacia</i></b>	1997	(Vandamme <i>et al.</i> , 2003)
<b><i>B. stabilis</i></b>	1997	(Vandamme <i>et al.</i> , 1997)
<b><i>B. vietnamiensis</i></b>	1995	(Vandamme <i>et al.</i> , 1997)
<b><i>B. dolosa</i></b>	2001	(Vermis <i>et al.</i> , 2004)
<b><i>B. ambifaria</i></b>	2001	(Coenye <i>et al.</i> , 2001b)
<b><i>B. anthina</i></b>	2002	(Vandamme <i>et al.</i> , 2002)
<b><i>B. pyrrocinia</i></b>	2002	(Vandamme <i>et al.</i> , 2002)
<b><i>B. ubonensis</i></b>	2000	(Vanlaere <i>et al.</i> , 2008)
<b><i>B. latens</i></b>	2008	(Vanlaere <i>et al.</i> , 2008)
<b><i>B. diffusa</i></b>	2008	(Vanlaere <i>et al.</i> , 2008)
<b><i>B. arboris</i></b>	2008	(Vanlaere <i>et al.</i> , 2008)
<b><i>B. seminalis</i></b>	2008	(Vanlaere <i>et al.</i> , 2008)
<b><i>B. metallica</i></b>	2008	(Vanlaere <i>et al.</i> , 2008)
<b><i>B. contaminans</i></b>	2009	(Vanlaere <i>et al.</i> , 2009)
<b><i>B. lata</i></b>	2009	(Vanlaere <i>et al.</i> , 2009)

#### 4.1.1 Ecologia e diversidade no meio ambiente

As espécies bacterianas pertencentes ao Complexo *B.cepacia* têm a capacidade de colonizar uma variedade de ambientes naturais, sendo frequentemente isoladas da água e solo, onde são particularmente abundantes na rizosfera (O'Sullivan & Mahenthiralingam, 2005). O aumento de interesse no Bcc começou a partir do momento que se reconheceu o seu papel como patogénico oportunista e pelo seu elevado potencial de aplicação em processos biotecnológicos.

Apesar de inicialmente descrito como fitopatogénico actualmente existem casos descritos da sua acção na promoção do crescimento de diversas espécies vegetais. Estas bactérias podem ter um importante papel na agricultura, protegendo muitas culturas importantes de pragas, pela sua habilidade em produzir vários compostos anti-microbianos e fúngicos (Chiarini *et al.*, 2006). Podem ainda promover o crescimento de plantas pela sua capacidade de fixação de nitrogénio em simbiose com várias plantas (Caballero-Mellado *et al.*, 2007; Martinez-Aguilar *et al.*, 2008). Além disso tem vindo a ser demonstrado que estas bactérias são capazes de degradar compostos poluentes tais como, herbicidas, solventes clorados, tolueno e outros derivados de gasolina (Coenye & Vandamme, 2003; O'Sullivan & Mahenthiralingam, 2005).

A prevalência de espécies do género *Burkholderia* na rizosfera parece resultar da sua versatilidade nutricional e resistência a antibióticos produzidos por outras espécies competidoras. Acresce a demonstrada capacidade de síntese de enzima pectolíticas, úteis na invasão dos tecidos vegetais, e a produção de antibióticos capazes de suprimir outros microrganismos, conferindo-lhe vantagens competitivas (Parke & Gurian-Sherman, 2001). Contudo algumas espécies, em particular as que constituem o Bcc, são patogénicos oportunistas de humanos com o sistema imunitário comprometido e em especial de pacientes com fibrose quística (FQ) e com a doença granulomatosa crónica (DGC) (Mahenthiralingam *et al.*, 2005b). Em doentes com FQ e DGC este patógeno conduz ao declínio das funções pulmonares, conduzindo a necrose do tecido pulmonar e frequentemente septicemia fatal, estado clínico vulgarmente denominado de síndrome da cepacia. Outros exemplos da sua capacidade patogénica são as espécies *Burkholderia mallei* e *Burkholderia pseudomallei* reconhecidos como os

agentes causadores de mormo e meliodose, respectivamente, e registadas como agentes de bioterrorismo (Godoy *et al.*, 2003).

A base da notável diversidade ecológica apresentada pelo Bcc parece residir nos seus invulgares genomas, raros no tamanho e na organização, permitindo a estas bactérias crescer numa grande variedade de substratos, utilizar diferentes fontes de carbono e sobreviver nas mais diversas condições de stress (O'Sullivan & Mahenthiralingam, 2005).

#### **4.1.2 *Burkholderia* como patogénico oportunista**

O Complexo *Burkholderia cepacia* é um grupo de bactérias patogénicas que não se limita à população com FQ mas também é um agente etiológico de infecções em doentes com granulomatose crónica (DGC) e doentes imunocomprometidos. No que diz respeito a indivíduos imunocomprometidos, as estirpes do Bcc têm vindo a ser recolhidas em pacientes com HIV, com bronquite aguda e bronquiectasia e ainda de doentes oncológicos, conduzindo a estados de pneumonia aguda e fatal (Pegues *et al.*, 1993).

Os indivíduos com DGC têm uma alteração genética que impede a produção do anião radical superóxido o que os torna mais susceptíveis a determinadas infecções bacterianas e fúngicas. Foi também demonstrado que os leucócitos isolados de pacientes com DGC eram incapazes de eliminar bactérias do Bcc e que a infecção causada por estas bactérias era a maior causa de morte em pacientes DGC devido à *sepsis* e pneumonia (Johnston, 2001; O'Neil *et al.*, 1986; Speert, 2001).

A infecção por bactérias do Bcc em doentes com FQ pode variar desde a colonização assintomática e declínio gradual do estado geral do doente até ao agravamento rápido da função pulmonar levando à morte (Frangolias *et al.*, 1999). Estima-se que a colonização pulmonar por bactérias Bcc em doentes com FQ reduza significativamente a sua sobrevivência e que cerca de 20 a 30% dos doentes atinjam o estágio de síndrome de cepacia (Govan & Deretic, 1996). Acresce a este carácter patogénico das estirpes Bcc a sua multiresistência intrínseca a antibióticos e a sua facilidade de transmissibilidade e persistência entre doentes com FQ.

### 4.1.3 Aspectos genéticos e epidemiológicos da Fibrose Quística

*“ Sou um rapaz doente, com uma doença crónica degenerativa, sei que tenho que viver com esta minha doença até ao resto da minha vida”. Bruno, 30 anos*

A fibrose quística, descrita pela primeira vez em 1938, é uma doença genética grave de transmissão autossómica recessiva (Collins, 1992). A FQ é causada por mutações que ocorrem num gene com 250 Kilobases (Kb), identificado em 1989 no braço longo do cromossoma 7 humano (Kerem *et al.*, 1989; Riordan *et al.*, 1989; Rommens *et al.*, 1989). Este gene codifica uma proteína com 1480 aminoácidos denominada regulador de condutância transmembranar de fibrose quística (denominado a partir de agora com as siglas CFTR do inglês *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*), um canal do ião cloreto, localizado na membrana apical das células epiteliais (Hyde *et al.*, 1990).

A FQ surge com frequência variável nos diversos grupos étnicos, verificando-se uma maior incidência nos Caucasianos, na qual se estima que 1 em cada 2500 recém-nascidos seja afectado e 1 em cada 25 indivíduos seja portador do alelo mutado (Collins, 1992). Em Portugal, estima-se que a incidência da FQ seja da ordem de 1 em cada 400 recém-nascidos (Loureiro *et al.*, 1994). Segundo dados da *Cystic Fibrosis Foundation* existem 70000 indivíduos no mundo com esta patologia, com uma esperança média de vida de 37 anos e uma idade média de morte de 24 anos. A cada ano registam-se aproximadamente 1000 novos casos (*Cystic Fibrosis Foundation*, 2010).

### 4.1.4 Patofisiologia da fibrose quística

*“ (...) mas a pior altura foi (...) e que poderá não aguentar os 30 medicamentos diários que tomámos depois do transplante (...)” Bruno, 30 anos*

O estado clínico de doentes com FQ caracteriza-se, em parte, por alterações do perfil electrofisiológico. Sabe-se actualmente que a proteína CFTR interactua com

várias proteínas do citoesqueleto e que regula outros mecanismos do transporte iónico, por exemplo existem evidências experimentais que sugerem um papel modulador/regulador da proteína CFTR na secreção de iões bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ), nomeadamente a nível do intestino (Lyczak *et al.*, 2002). A proteína CFTR não funcional condiciona o transporte electrolítico na superfície apical das células epiteliais ou nas glândulas submucosas. Este estado conduz, de forma secundária, a uma diminuição do conteúdo hídrico das secreções e, conseqüentemente, à obstrução de ductos. As manifestações da doença ocorrem nos órgãos onde existe expressão da proteína CFTR anormal: glândulas sudoríparas, pulmões, pâncreas, intestino, fígado e tracto reprodutivo (Welsh & Smith, 1993).

O funcionamento anómalo das glândulas sudoríparas resulta da incapacidade de excretar fluído e conservar iões sódio e cloreto. Deste facto resulta um elevado teor de sais nas secreções exócrinas dos doentes com FQ (Govan & Deretic, 1996) .

No pâncreas, a diminuição do fluído ductal pancreático conduz à retenção e activação prematura de enzimas, levando à destruição progressiva dos tecidos e à sua auto-digestão (Lyczak *et al.*, 2002). A absorção de nutrientes, nomeadamente de gorduras, fica comprometida. A má nutrição resultante condiciona a obtenção dos elevados níveis de energia exigidos pelo estado hipermetabólico associado à infecção das vias respiratórias (Ratjen & Doring, 2003).

Outras características de doentes com FQ não estão relacionadas com o papel regulador da proteína CFTR na secreção de fluído. Por exemplo, a relação entre as mutações no gene *cftf* e a ausência bilateral congénita dos canais deferentes a nível do aparelho reprodutor masculino é pouco clara embora se verifique esterilidade em 98% dos doentes do sexo masculino (Ratjen & Doring, 2003). No sexo feminino, a diminuição da fertilidade pode ocorrer devido à desidratação do muco cervical (Welsh & Smith, 1993).

A ineficácia das vias de defesa aérea associada às secreções espessas e à resposta inflamatória pronunciada do tracto respiratório do doente com FQ fazem do pulmão um nicho ecológico único para a colonização e infecção por microrganismos (Planells-Cases & Jentsch, 2009). As secreções desidratadas dificultam a limpeza mucociliar e os elevados teores de sal inactivam a actuação das  $\beta$ -defensinas 1 e 2,



proteínas relacionadas com a resposta imunitária inata, aumentando a susceptibilidade a infecções respiratórias (Govan & Deretic, 1996).

Estudos recentes sugerem também um papel importante da proteína CFTR funcional na acidificação dos organelos celulares, que por sua vez, é determinada no processo de glicosilação das proteínas. A alcalinização característica dos compartimentos celulares de FQ tem como consequência a produção de glicoproteínas com um padrão de glicosilação alterado (Lyczak *et al.*, 2002).

A resposta imunitária *per se* é um problema. A produção de anticorpos e de imunocomplexos desencadeia um processo inflamatório que se caracteriza por um aumento do fluxo de neutrófilos aos pulmões, pela produção de proteases leucocitárias e de radicais livres, que são os principais responsáveis pelas lesões tecidulares a nível broncopulmonar. A infecção e a respectiva resposta inflamatória são os responsáveis directos pela destruição pulmonar progressiva, culminando em falha respiratória (Freitas & Costa, 1997).

No que diz respeito à infecção por bactérias do Bcc e em particular, às diferenças nos níveis de severidade da infecção, muito ainda existe por esclarecer. Apesar de poder resultar de diferenças nos factores de virulência expressos, variáveis de estirpe para estirpe (Darling *et al.*, 1998), pensa-se que a idade e factores genéticos inerentes ao hospedeiro e a co-colonização com outros patogénicos, terão certamente um papel determinante na evolução clínica dos doentes (LiPuma *et al.*, 2001). Sabe-se, no entanto, que todas as estirpes Bcc aparentam possuir a capacidade de causar doenças severas e mortes, dependendo do estado clínico dos doentes e da predisposição (Frangolias *et al.*, 1999; Govan *et al.*, 1993).

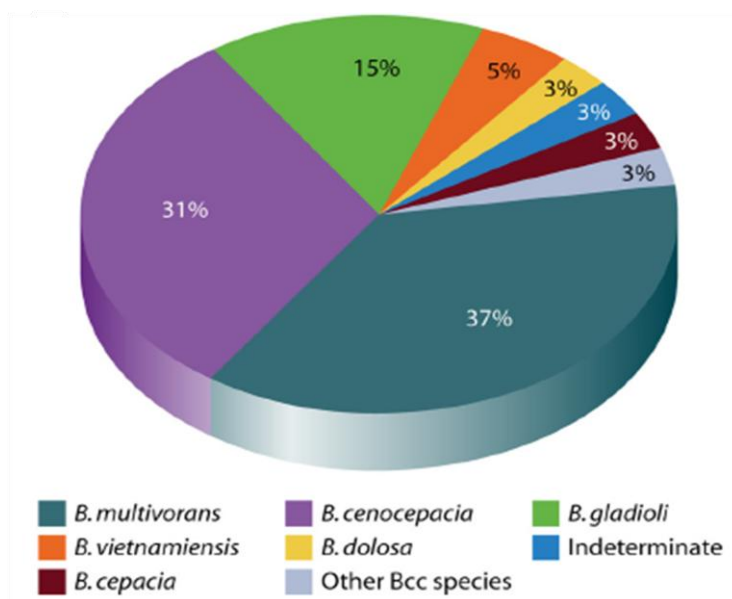
#### **4.1.5 Aquisição e transmissão de bactérias do género *Burkholderia***

A identificação de estirpes epidémicas sugere que algumas estirpes bacterianas estão particularmente adaptadas à infecção humana, com uma capacidade de transmissão entre pacientes (LiPuma, 2010; Sanger *et al.*) e um exemplo claro são as estirpes que constituem a linhagem ET-12.

A demonstração de que doentes infectados com uma estirpe do Bcc, podiam adquirir uma segunda estirpe por contacto com outros doentes veio reforçar a necessidade de, em determinadas situações, se aplicar medidas de isolamento mesmo entre doentes já infectados. Algumas estirpes são altamente transmissíveis, podendo disseminar-se rapidamente entre doentes com FQ e serem responsáveis por 40% das infecções num único centro de tratamento (Govan & Deretic, 1996). Existem numerosos estudos que demonstram que a partilha de aerossóis respiratórios, soluções salinas e anestésicas, águas destiladas, cateteres urinários entre uma diversidade de equipamento hospitalar, podem significar riscos de contaminação (LiPuma, 2010).

Um estudo de Baldwin e colaboradores (2007), demonstrou que múltiplos isolados clínicos de *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. stabilis*, *B. vietnamiensis* and *B. ambifaria* foram também identificados em fontes ambientais (Baldwin *et al.*, 2007). Recorrendo à análise de sequências multilocus, demonstrou-se que mais de 20% dos 381 isolados de doentes FQ eram indistinguíveis de estirpes recolhidas do ambiente (Baldwin *et al.*, 2007).

Os dados epidemiológicos mais recentes sobre as principais espécies que infectam doentes FQ, demonstraram que *B. multivorans*, *B. gladioli* e *B. cenopacia* contribuem, em conjunto, para mais de metade da população com FQ infectada nos Estados Unidos da América (**Figura 1**). É importante referir que *Burkholderia gladioli*, apesar de não pertencer ao complexo, na actualidade contribui para uma significativa proporção de infecções de doentes com fibrose quística (FQ). As espécies *B. multivorans* e *B. cenocepacia* são as mais frequentes, contribuindo em conjunto para mais de 60% de pacientes infectados. Contudo há que referir que em alguns países da Europa a proporção de pacientes infectados com *B. cenocepacia* é maior (Agodi *et al.*, 2001; LiPuma, 2010). Torna-se importante e curioso referir que *B. gladioli* e *B. cenopacia* são reconhecidas também como espécies fitopatogénicas, *B. ambifaria* pode ser recolhida da rizosfera de plantas e também *B. multivorans*, menos frequentemente, tem vindo a ser recolhida de habitats naturais (LiPuma, 2010).



**Figura 1.** Distribuição de espécies do género *Burkholderia* entres pacientes FQ nos Estados Unidos da América. Os dados são baseados em 2024 pacientes FQ. Adaptado de Lipuma *et al* 2010.

A possível existência de reservatórios ambientais significa um risco para os doentes com FQ. Entre os diversos estudos com o objectivo de analisar a distinção entre isolados clínicos e ambientais comprova-se que as barreiras que os separam são muito ténues. Por esta razão, existe uma preocupação e riscos acrescidos associados ao uso deste grupo de bactérias em processos benéficos como o biocontrolo e a biorremediação (Mahenthiralingam *et al.*, 2008). É de salientar que um organismo com tanta plasticidade e versatilidade genómica dificilmente poderá ser utilizado no seu todo como um recurso uma vez que o seu sucesso evolutivo como patogénico oportunista representará sempre uma ameaça.

#### 4.2 Factores e Mecanismos de Patogenicidade

A patogenicidade das bactérias do Bcc é multifactorial. Estes organismos são capazes de suportar os efeitos bactericidas dos componentes do sistema imunitário inato como os péptidos antimicrobianos, lisozimas, lactoferrina e a fosfolipase A2, entre outros (Baird *et al.*, 1999). Adicionalmente, as infecções do trato respiratório são de difícil tratamento devido não só à sua resistência intrínseca a um elevado espectro de compostos antimicrobianos utilizados em hospitais (Aaron *et al.*, 2000) mas

também à sua habilidade na produção de uma variedade de potenciais factores e mecanismos de virulência.

#### **4.2.1 Lipopolissacarídeos**

Lipopolissacarídeos (LPS) são conhecidos como factores de virulência em muitas bactérias *gram* negativas. No caso específico do Bcc, os LPS têm uma composição que difere em parte de outras bactérias *gram* negativas, o que os torna peculiares do ponto de vista estrutural. As características particulares destes LPS permitem neutralizar a carga iónica na superfície celular e parecem estar envolvidos nos mecanismos de resistência aos antibióticos, como as polimixinas e péptidos antimicrobianos catiónicos (Albrecht *et al.*, 2002).

Estudos estruturais demonstram uma grande diversidade de LPS entre estirpes do Bcc e por isso as tentativas de desenvolver uma vacina eficiente contra LPS do Bcc tem-se demonstrado muito difícil. O anti-soro produzido contra os LPS de uma estirpe do Bcc é usualmente incapaz de reagir com os LPS de outras estirpes (Nelson *et al.*, 1993; Rabkin *et al.*, 1989).

O LPS do Bcc é também capaz de estimular os neutrófilos humanos e aumentar a expressão de CD11b na sua superfície, estimulando a fagocitose da bactéria mas resulta na libertação de espécies reactivas de oxigénio e as enzimas dos neutrófilos induzem danos nos tecidos pulmonares (Hughes *et al.*, 1997).

#### **4.2.2 Pili e adesina 22KDa**

Os pili são apêndices filiformes existentes na superfície das bactérias e têm vindo a ser associados à patogenicidade. Alguns estudos *in vitro* demonstram a capacidade citotóxica dos pili, conduzindo à apoptose em linhas celulares epiteliais de pulmão (Chung & Speert, 2007) e demonstrando a capacidade de se ligarem a uma outra variedade de células epiteliais como as da cavidade bucal humana, epitélio das vias aéreas, pneumócitos do tipo II, traqueia, entre outras (Cervin *et al.*, 1994; Krivan *et al.*, 1988; Saiman *et al.*, 1990; Sajjan & Forstner, 1993; Sajjan *et al.*, 2000).

A ligação dos pili às células epiteliais é mediada pela adesina 22 KDa sendo ambos necessários para uma ligação eficaz à proteína CK13 (Urban *et al.*, 2005). A proteína CK13 é responsável pela ligação de bactérias do Bcc às células epiteliais, quando mediado pelo pili. Foi demonstrado existir um aumento da expressão da CK13 em vias aéreas de doentes com FQ, principalmente no epitélio bronquiolar e respiratório (Sajjan *et al.*, 2000), facilitando a infecção por estes organismos. Aparentemente, estirpes que apresentam quer os pili quer esta adesina 22 KDa apresentam um maior potencial para causar infecções, sendo que, até ao momento apenas as estirpes *B.cenocepacia* da linhagem ET12 estão descritas como capazes de apresentar ambos (Sajjan *et al.*, 2000).

#### **4.2.3 Adesinas triméricas de autotransporte**

As adesinas bacterianas medeiam um passo crítico e precoce da patogénese na maioria de infecções bacterianas. Um estudo de Mil-Homens e seus colaboradores (2010) identificou um agregado de adesinas correlacionadas com a virulência, estrito à linhagem epidémica de *B.cenocepacia* ET-12. Este agregado de adesinas possui aproximadamente 24 Kpb e está aparentemente organizado em quatro adesinas (BCAM0219, 0223, 0224 e 0225), uma proteína da membrana externa BCAM0220, uma cinase sensora de histidinas no *locus* BCAM0218 e dois reguladores de resposta denominados BCAM0221 e 0222. Aparentemente a cinase sensora de histidinas é responsável por detectar o estímulo e os dois reguladores de resposta regulam dois conjuntos de genes de virulência, a adesina BCAM0219 e a proteína da membrana externa BCAM220 e ou outro conjuntos constituído pelas adesinas de autotransporte BCAM0223, BCAM0224 e BCAM0225 (Mil-Homens *et al.*, 2010). Este agregado de adesinas encontra-se a montante da ilha *cci* de *B.cenocepacia*, que codifica para um largo número de genes ligados a virulência e ao metabolismo e inclui o marcador epidemiológico de virulência BCESM para as estirpes de *B.cenocepacia* descrito anteriormente (Baldwin *et al.*, 2004). Este agregado é parte da região genómica de 142Kpb e fazem parte da extensão a montante e a jusante da ilha *cci* (Mil-Homens *et al.*, 2010). Neste estudo, Mil-Homens e colaboradores (2010) demonstraram que a

ausência da adesina trimérica de autotransporte (TAA) BCAM0224 conduz uma redução de 90% da virulência em *B.cenocepacia* K56-2 e que a expressão do gene BCAM0224 é aumentada em 8 vezes em condições ambientais que mimetizam o ambiente pulmonar de doentes com FQ. Esta adesina é fundamental para a infecção, na medida em que, promove a aderência bacteriana à proteína colagénio do tipo I da matriz extracelular (Mil-Homens *et al.*, 2010).

#### **4.2.4 Flagelo**

O flagelo é um apêndice filiforme fundamental para a mobilidade. É considerado um importante factor na patogenicidade estando envolvido na disseminação da bactéria do local de infecção para outros órgãos. Aparentemente estão envolvidos na invasão de células epiteliais, formação de biofilmes e indução da resposta do hospedeiro (Eaves-Pyles *et al.*, 2001). O flagelo é capaz de ligar-se e interagir com o receptor TLR5 do hospedeiro, que reconhece padrões moleculares de microrganismos e inicia a resposta imunitária inata. Contudo a activação do sistema imunitário contribui para o aumento da inflamação e dos danos nos pulmões (Lyczak *et al.*, 2002).

Os resultados de alguns estudos *in vitro* confirmam que a mobilidade é fundamental para a invasão de células epiteliais (Tomich *et al.*, 2002) uma vez que mutantes de *B.cenocepacia* k56-2 com o flagelo bloqueado demonstram uma redução de 40% na morte de ratinhos C57BL/6j (Urban *et al.*, 2004).

#### **4.2.5 Proteínas extracelulares**

A secreção de proteínas é um importante mecanismo pelo qual as bactérias são capazes de libertar proteínas para o ambiente e para as células do hospedeiro e por isso crucial para a virulência de patógenos e sobrevivência no interior dos hospedeiros. No caso de estirpes do Bcc vários sistemas de transporte têm vindo a ser implicados na secreção de muitos factores de virulência como as proteases, hemolisinas, adesinas entre outros. Por exemplo um estudo de Hutchison e seus colaboradores (1998) caracterizou a haemolisina de *B. cenocepacia* J2315, observando que quando presente

em baixas concentrações é capaz de induzir degradação nucleosomal, consistente com a apoptose em neutrófilos humanos (Hutchison *et al.*, 1998).

Duas proteases extracelulares, a ZmpA e a ZmpB têm vindo a ser caracterizadas em várias espécies do Bcc e são capazes de actuar numa diversidade de substratos. Por exemplo, a ZmpA degrada o interferão  $\gamma$  e ZmpB degrada transferrina, lactoferrina e imunoglobulinas humanas (Gingues *et al.*, 2005; Kooi *et al.*, 2006). Estas duas proteínas parecem actuar no nível de integridade do tecido do hospedeiro e ao nível da defesa imunitária, resultando no aumento da inflamação (Corbett *et al.*, 2003; Kooi *et al.*, 2006).

Os sistemas de secreção de proteínas são outros factores de virulência. Estes dispositivos de exportação são encontrados numa variedade de bactérias *gram* negativas envolvidas na translocação de proteínas efectoras através da membrana das células do hospedeiro até aos seus citoplasmas. De entre os sistemas de secreção proteica conhecidos o tipo III, IV, V e VI aparentam ter um importante papel na virulência do Bcc (Aubert *et al.*, 2008; Dautin & Bernstein, 2007; Juhas *et al.*, 2007; Warawa & Woods, 2005).

#### **4.2.6 Siderofóros**

Os pulmões são um ambiente restrito a ferro o que pode representar um desafio para a infecção e colonização de patogénicos bacterianos de doentes com FQ. Assim, algumas estirpes do Bcc apresentam vários mecanismos que lhes permitem a obtenção de ferro a partir do ambiente. Uma dessas estratégias é a produção de sideróforos, moléculas de baixo peso molecular quelantes de ferro, nomeadamente piochelina, ornibactina e cepaciachelina (Thomas, 2007). Recentemente alguns estudos mostram a importância de produção de sideróforos para a patogenicidade do Bcc em mamíferos, em *Caenorhabditis elegans* e em *Galleria mellonella* (Uehlinger *et al.*, 2009).

#### 4.2.7 Exopolissacarídeos

Os exopolissacarídeos (EPS) são sugeridos como factores de virulência em muitas bactérias. A produção de EPS é uma característica comum entre os isolados clínicos do Bcc (Cunha *et al.*, 2004; Herasimenka *et al.*, 2007; Richau *et al.*, 2000; Zlosnik *et al.*, 2008). O EPS mais comum no Complexo *Burkholderia cepacia* é designado de cepaciano, mas são produzidos mais 3 tipos diferentes (Cérantola & Montrozier, 1997; Cescutti *et al.*, 2003; Chiarini *et al.*, 2004; Herasimenka *et al.*, 2007). Os estudos demonstram que os EPS parecem estar envolvidos na persistência das bactérias nos pulmões (Conway *et al.*, 2004). Foi demonstrado recentemente que o fenótipo mucoso, resultante de grandes produções de EPS conduzem à capacidade da persistência das bactérias conduzindo a infecções crónicas (Zlosnik *et al.*, 2008).

Parece ainda haver um papel dos EPS na interacção com péptidos antimicrobianos (Herasimenka *et al.*, 2005) e na formação de biofilmes (Cunha *et al.*, 2004). Além disto têm ainda a capacidade de sequestrar espécies reactivas de oxigénio e interferir com a quimiotaxia dos neutrófilos, uma resposta fundamental da defesa pulmonar do hospedeiro (Bylund *et al.*, 2006).

#### 4.2.8 Quorum sensing

O *quorum sensing* (QS) consiste num processo de comunicação química que permite às células modular a sua expressão genética em função das células vizinhas, pela síntese e detecção de moléculas QS (Barnard & Salmond, 2004).

O QS providência mecanismos pelos quais as bactérias podem rapidamente adaptar-se ao ambiente e têm-se demonstrado fundamental na virulência de *Burkholderia* (Lazdunski *et al.*, 2004), sendo responsável pela produção de toxinas, proteases, lipases e sideróforos e formação de biofilmes (Venturi *et al.*, 2004).

Desde que o QS foi demonstrado ser importante na virulência bacteriana, muitos estudos estão actualmente focados em encontrar compostos inibitórios do QS pelo seu potencial terapêutico. Até agora muitos inibidores QS tem sido descritos e um crescente número de estudos demonstram a sua habilidade na prevenção de formação de biofilmes, assim como a sua ruptura, diminuindo a produção de factores



de virulência e as dificuldades de resposta ao stress oxidativo a que estão sujeitas, permitindo o aumentando da acção dos neutrófilos (Brackman *et al.*, 2009; Hoffmann *et al.*, 2007; Rasmussen *et al.*, 2005a; Rasmussen *et al.*, 2005b; Rasmussen & Givskov, 2006).

Contudo, não podemos deixar de considerar a capacidade das bactérias do Bcc em degradar compostos, nos quais os inibidores de moléculas QS não são excepção (Riedel *et al.*, 2006).

#### 4.2.9 Biofilmes

A maior parte da actividade bacteriana na natureza ocorre com as bactérias organizadas em biofilmes. Esses biofilmes são constituídos por uma comunidade estruturada de células aderentes a uma superfície embebidas numa matriz (Dunne, 2002). A associação de organismos em biofilmes permite-lhes protecção de muitos factores ambientais devido às limitações de difusão de compostos e inactivação pela matriz do biofilme (Dunne, 2002).

A formação de biofilmes tem por base uma série de estádios temporais subsequentes, resumidos na **Figura 2** (Conway *et al.*, 2002). As bactérias em locomoção livre, ou seja na forma planctónica, aderem irreversivelmente a uma superfície (biótica ou abiótica) e a complexidade do biofilme aumenta à medida que as células se dividem e formam uma microcolónia. As microcolónias diferenciam-se em biofilmes maduros onde as células são embebidas por um forte matriz de exopolissacarídeos (Dunne, 2002).

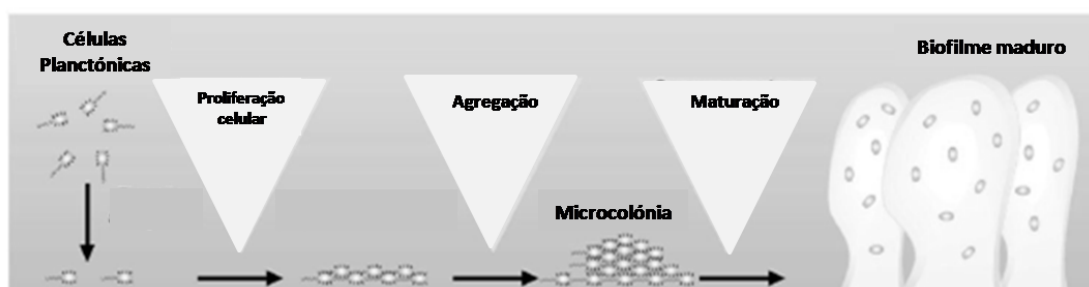


Figura 2. Modelo de desenvolvimento de uma biofilme. Adaptado de Costerton *et al* 1999.

A matriz na qual as células estão embebidas é denominada de glicocálix, sendo constituída por exopolissacarídeos e por substâncias exógenas retidas no ambiente local (Costerton *et al.*, 1999). Na maioria das espécies capazes de formar biofilmes, o glicocálix é predominantemente aniónico, criando uma barreira de retenção e concentração de nutrientes e minerais do ambiente circundante, protegendo ainda as células contra algumas ameaças ambientais, incluindo biocidas, antibióticos, anticorpos, tensoactivos e células efectoras de combate do hospedeiro como por exemplo os leucócitos (Dunne, 2002; Xavier *et al.*, 2005).

#### 4.2.10 Resistência a antibióticos

A habilidade do Bcc para resistir a vários antibióticos e compostos antimicrobianos torna-o sem dúvida um importante e preocupante patógeno oportunista. Do ponto de vista clínico, a resistência a antibióticos por parte do Complexo *B.cepacia* é problemático no tratamento de pacientes tornando o controlo da infecção difícil.

A alteração de permeabilidade da membrana foi classificada como o mecanismo de defesa mais importante contra agentes antimicrobianos, devido à existência de LPS modificados, bombas de efluxo, porinas e a habilidade de produzir EPS e/ou formar biofilmes (Fux *et al.*, 2005). Alguns estudos demonstraram que a expressão controlada de porinas em conjunto com propriedades intrínsecas, podem bloquear o acesso a várias moléculas antimicrobianas ao periplasma. Em somatório a presença de várias bombas de efluxo de antibióticos têm um importante papel na resistência a antibióticos (Mahenthiralingam *et al.*, 2005a). A estrutura peculiar do LPS do Bcc, responsável pela neutralização da carga aniónica das células, foi demonstrada ser determinante na resistência a vários antibióticos (Rajyaguru & Muszynski, 1997).

Para resolver este problema tem-se desenvolvido distintas abordagens pelas comunidades hospitalares. Actualmente duas ou mais combinações de fármacos podem permitir o controlo da infecção de estirpes Bcc, usando assim a vantagem do efeito sinérgico de drogas (Aaron *et al.*, 2000; Manno *et al.*, 2003). Contudo, a existência inesperada de interações antagónicas entre compostos e a manifestação de efeitos secundários associados aos antibióticos podem constituir outro problema.

#### 4.2.11 RNases como factores de virulência

O metabolismo do RNA é realizado pelas RNases, uma classe de enzimas definida pela sua capacidade de clivar as ligações fosfodiéster do RNA (Jain, 2009). Muitos organismos contêm múltiplas RNases e o papel crucial destas enzimas inclui funções como o processamento e maturação de RNA, substituição de RNA(s) instáveis, e degradação de RNA(s) errados (Condon, 2007; Jain, 2009). A degradação do RNA é um dos maiores processos de controlo dos níveis de RNA e desempenha um papel fundamental no metabolismo celular (Andrade *et al.*, 2009).

As RNases dividem-se em duas grandes classes: endonucleases, proteínas que clivam o RNA internamente e exoribonucleases que digerem um nucleótido de RNA de cada vez a partir de uma extremidade (Andrade *et al.*, 2009). A RNase R é uma enzima activa em polinucleótidos sintéticos, mRNA, rRNA e tRNA (Cheng & Deutscher, 2002), e que tem vindo a ser sugerida como uma RNase envolvida na virulência de organismos patogénicos. Estudos demonstraram que a RNase R está envolvida na patogenicidade de alguns organismos como *Shigella flexneri*, estirpes de *E. Coli* enteroinvasivas e ainda de *Aeromonas hydrophila*, em que a ausência desta proteína conduz a menor virulência (Andrade *et al.*, 2009; Tobe *et al.*, 1992). Contudo em *Brucella abortus* não existe um papel activo desta proteína na infecção (Miyoshi *et al.*, 2007). Aparentemente o papel da RNase na virulência parece variar de organismos para organismo e o papel exacto desta proteína continua por se elucidar.

A RNase R pertence à família RNR (Zuo & Deutscher, 2001). As proteínas pertencentes a esta família RNR encontram-se largamente distribuídas entre as bactérias e eucariotas sendo que,

em muitos organismos, a família RNR é apenas representada por homólogos de RNase R (Zuo & Deutscher, 2001). Estruturalmente a família RNR em *E.coli* é caracterizada por três domínios



**Figura 3.** Representação esquemática dos domínios encontrados nos membros da família RNR. O primeiro esquema representa os domínios da RNase II: CSD1, CSD2, o centro catalítico RNB e S1. Prevê-se que outros membros da família RNR mostrem um motivo adicional de *helix-turn-helix* no N-terminal e um região rica em lisina e arginina no C-terminal, como é o caso da RNaseR. Adaptado de Andrade *et al.*, 2009.

principais: S1- semelhante a um domínio de choque a frio no N-Terminal (Weber *et al.*, 2002), um domínio central semelhante a RNase II (Mian, 1997) e um domínio S-1 de

ligação ao RNA no C-terminal (Ma *et al.*, 1996) (**Figura 3**). A proteína RNase R produz nucleósidos monofosfatados 5' e assemelha-se, cataliticamente, à RNase II (Barbas *et al.*, 2008).

Estudos realizados por Cheng e colaboradores (1998), sugerem que a RNase R e a PNPase desempenham funções essenciais em *Escherichia coli* que não são realizadas por mais nenhuma das outras exoribonucleases celulares. As células com dupla mutação para PNPase e RNase R são inviáveis evidenciando a RNase R como essencial no metabolismo do RNA, e a sua função não pode ser substituída por nenhuma outra exoribonuclease celular (Cheng *et al.*, 1998). RNase R é a principal responsável pela actividade exonucleotídica em estirpes de *E.coli* que são deficientes para a RNase II (Cheng *et al.*, 1998). Alguns estudos têm inclusive demonstrado que a RNase R é mais eficaz do que a RNase II contra estruturas de RNAs como os tRNAs (Cheng & Deutscher, 2002) e caracterizada pelo controlo de qualidade de RNA ribossomal, indicando um papel mais específico na RNase R no metabolismo do RNA (Cairrão *et al.*, 2003).

No que diz respeito às estirpes da linhagem ET-12, o putativo gene que codifica para a RNase R (gene *rnr*) encontra-se no cromossoma longo 1 com 2475 pares de base (pb), (1722010pb – 1724484pb), no locus BCAL 1553 (*Welcome Trust Sanger Institute B. cenocepacia sequencing project*).

#### **4.3 Controlo da expressão genética e a resposta ao stresse**

A resistência ao stress e a virulência estão intimamente ligados. Muitos patogénicos bacterianos têm de resistir a ambientes difíceis durante o processo de infecção (Andrade *et al.*, 2009). Um tipo de resposta é a remodelação da sua expressão genética com o objectivo de ajustar a fisiologia celular às exigências do ambiente (Eriksson *et al.*, 2002) e nesta resposta as RNases desempenham o papel principal. Todas as moléculas são degradadas, desde os RNAs mensageiros instáveis aos mais estáveis e até os RNAs não codificantes, como o rRNA e tRNA ou os pequenos RNA(s) reguladores. A eliminação de transcritos desnecessários inclui RNAs cuja expressão já não é necessária no momento, mas também na remoção de RNAs errados. Por consequência, a degradação do RNA é um passo inerente aos mecanismos de

qualidade e controlo de RNA. Além disto contribuem para a reciclagem do conjunto de nucleótidos da célula (Andrade *et al.*, 2009).

Vários estudos demonstram que os níveis de transcritos e/ou da proteína RNase R aumentam em diversos estímulos o que atribui a esta enzima um papel fundamental na sobrevivência de bactérias em condições de stresse (Andrade *et al.*, 2009).

#### **4.3.1 RNase R em resposta a múltiplas condições de stresse**

A habilidade para adaptação a alterações ambientais é fundamental para a sobrevivência bacteriana. Por isto em resposta a condições de stress as bactérias têm de alterar rapidamente a sua expressão genética e remodelar as suas bases de RNA. Assim, deveremos ter em conta não só os novos transcritos como também a degradação de RNA já existente.

Os tipos de stresse aos quais as células vulgarmente estão expostas são a privação de nutrientes, alterações de temperatura e a exposição a agentes nocivos. Nestas condições esperam-se rápidas alterações na quantidade e estabilidade do mRNA (Takayama & Kjelleberg, 2000). Por consequência, será comum a observação de alterações ao nível da estrutura dos ribossomas e na actividade das RNases (Chen & Deutscher, 2005). A habilidade da RNase R em degradar rRNA, outras estruturas de RNA e também sequências palindrómicas extragénicas repetitivas (Chen & Deutscher, 2005; Cheng & Deutscher, 2002), parece ser fundamental nas alterações no RNA total bacteriano no momento de responder ao stresse.

#### **4.3.2 Níveis da RNase R durante o crescimento**

Foi demonstrado que a actividade específica da RNase R durante o crescimento celular muda drasticamente (Chen & Deutscher, 2005). A actividade da RNase R que se mantém constante durante a fase exponencial, aumenta 4 a 6 vezes a quando da aproximação à fase estacionária e um aumento adicional de 2 vezes durante a extensão da fase estacionária (Chen & Deutscher, 2005). Por isto a RNase R parece ter um papel importante no controlo da expressão genética das células em fase estacionária.

As células na fase estacionária têm de se tornar resistentes a uma série de factores ambientais como o stress oxidativo, privação de nutrientes (Andrade *et al.*, 2009) e uma série de produtos tóxicos acumulados, resultantes do seu próprio metabolismo. A RNase R aparenta ter um papel importante nessa resistência.

#### 4.3.3 Níveis da RNase R em resposta ao choque por frio

Os níveis de expressão da RNase R são fortemente regulados pela temperatura e aparentemente muito contribui a estabilização dos transcritos de *rnr* em resposta a modificações de temperatura. Segundo o estudo de Cairrão e colaboradores (2003) na primeira hora de choque de frio, há um aumento acentuado dos níveis basais de transcritos *rnr* que podem contribuir para os níveis aumentados de proteína RNase R detectados nestes estímulos (Cairrão *et al.*, 2003). Uma pronunciada variação na estabilidade de RNAs são típicos em mRNAs que codificam para proteínas de resposta ao choque de frio (Giangrossi *et al.*, 2002). O estudo de Cairrão e colaboradores (2003), demonstra um aumento de sete vezes da proteína RNase R de culturas de 37°C para 10°C. Em complementação aos resultados deste estudo, Cheng e colaboradores (2005) demonstrou que a passagem das células para 10°C leva a uma aumento de 10 a 12 vezes da actividade enzimática desta proteína. Por outro lado, em contraste com o forte aumento durante o choque a frio, o aumento em choque a quente é menos acentuado quando as culturas são transferidas para 45°C, registando-se apenas um aumento de 2 vezes na actividade enzimática (Chen & Deutscher, 2005).

Tem sido sugerido que a RNase R desempenha um papel na maturação de RNAs mensageiros e de transferência (tmRNA) durante o choque a frio (Cairrão *et al.*, 2003). Contudo alguns autores defendem que isto é improvável na medida que a natureza degradativa da RNase R não torna a sua função compatível como uma RNase de maturação (Chen *et al.*, 2005). Além disto em *Caulobacter crescentus*, a sua acção nos precursores de tmRNAs maduros é degradativa, e não de maturação (Hong *et al.*, 2005). De facto não foi ainda comprovado o papel de RNase R na maturação de qualquer tipo de molécula de RNA, todas as suas funções conhecidas são de degradação de RNAs (Chen & Deutscher, 2005).

Sabe-se que durante o choque a frio, uma significativa porção de novos ribossomas produzidos são desagrupados (Chen & Deutscher, 2005). Tendo este facto em conta torna-se evidente o papel conhecido da RNase R o papel conhecido de controlo de qualidade de rRNA. Na medida em que a PNPase é também conhecida por participar no controlo de qualidade de rRNA, é interessante que esta enzima também aumente durante o choque a frio (Chen & Deutscher, 2005).

Neste estudo avaliou-se a importância da RNase R na virulência de *B.cenocepacia*. Além disso, a análise funcional deste gene em resposta a vários stresses será também um assunto apresentado bem como a sua capacidade de virulência no modelo biológico *Galleria mellonella*.

#### **4.4 Modelos para estudos de infecção**

As espécies do Bcc causam infecções numa grande diversidade de hospedeiros incluindo humanos, mamíferos, insectos, nemátodos, protozoários e plantas (Uehlinger *et al.*, 2009). Existe uma variedade de mecanismos de patogenicidade e factores de virulência que torna as espécies e até mesmo as estirpes do Bcc diferentes. Estas diferenças permite-lhes a colonização e sobrevivência na presença de mecanismos de defesa específicos dos variados hospedeiros. É também concebível que bactérias patogénicas oportunistas como as do Bcc usem factores de virulência comuns para infectar diferentes organismos (Uehlinger *et al.*, 2009). Os numerosos e avançados estudos focados nos mecanismos de patogenicidade têm permitido a compreensão da capacidade demonstrada por estes organismos em infectar os vários hospedeiros.

Com o objectivo de investigar quer mecanismos conservados quer mecanismos específicos de patogenicidade ao hospedeiro, uma variedade de modelos de infecção *in vivo* tem vindo a ser desenvolvidos. Alguns dos modelos biológicos que podemos referir são o nematode *Caenorhabditis elegans*, o insecto *Galleria mellonella*, o embrião do peixe-zebra e ratinhos. Estes modelos de infecção têm vindo não só a ser

usados no estudo de factores de virulência do Bcc e na resposta imunitária do hospedeiro, mas também para testar novas terapias antimicrobianas.



**Figura 4.** Larvas de *Galleria mellonella*

De entre os modelos referidos é de destacar as larvas de *Galleria mellonella* (**Figura 3**) que serão utilizadas neste trabalho. O sistema de defesa dos insectos partilha um elevado grau de homologia estrutural e funcional com a resposta do sistema imunitário dos mamíferos, contudo limitado no que respeita ao sistema imunitário adquirido. As larvas são infectas com bactérias Bcc por injeção e a sua taxa de sobrevivência é avaliada durante o tempo.

As larvas podem ser mantidas a 37°C durante 72h e não precisam de ser alimentadas durante o decorrer da análise da infecção (Seed & Dennis, 2008).



## 5. Resultados e Discussão

---

## Clonagem e análise computacional do gene e proteína RNaseR de *Burkholderia cenocepacia* k56-2

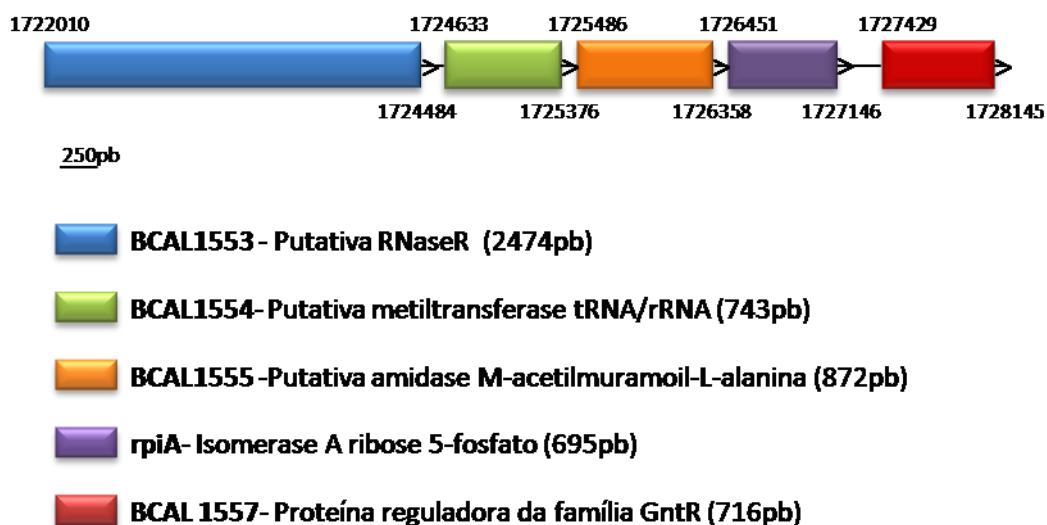


Figura 5. Organização do gene *rnr* no cromossoma 1 de *B.cenocepacia*. Os números apresentados na parte superior e inferior indicam, respectivamente o início e o fim de cada um dos genes. Esta construção foi realizada tendo em conta os dados disponíveis em *Welcome Trust Sanger Institute B. cenocepacia sequencing project*

Em *Burkholderia cenocepacia* J2315 o gene que codifica para a RNase R encontra-se no cromossoma longo 1 e é composto por 2474 nucleótidos (1722010pb – 1724484pb - *locus* BCAL 1553) (*Welcome Trust Sanger Institute B. cenocepacia sequencing project*). O *locus* BCAL1553 encontra-se na vizinhança de mais quatro genes os quais apresentam o mesmo sentido de transcrição (**Figura 5**).

Determinou-se a identidade e similaridade da sequência de aminoácidos da RNase R de *B.cenocepacia* com a de outros organismos nos quais o papel da RNase R na virulência tem sido foco de estudo (**Tabela 2**). Verificou-se que os organismos que apresentam maior identidade e similaridade com *B.cenocepacia* são *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*. Recorreu-se ainda ao software *ESyPred3D* para determinar a possível estrutura da RNase R de *Burkholderia cenocepacia*, apresentada na **Figura 6**.

**Tabela 2. Identidade e similaridade da sequência de aminoácidos da proteína RNase R de *B.cenocepacia* com outros organismos.** A identidade e similaridade foram obtidas recorrendo ao alinhamento de sequências no software *ClustalW2*.

	<b>Identidade com <i>B.cenocepacia</i></b>	<b>Similaridade com <i>B.cenocepacia</i></b>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	62,2%	75,4%
<i>Brucela abortus</i>	31,1%	46,5%
<i>Caulobacter crescentus</i>	31,5%	46,3%
<i>Escherichia coli</i>	99,8%	99,8%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	47,5%	61,6%
<i>Salmonella typhimurium</i>	95,9%	98,9%
<i>Shigella flexneri</i>	100%	100%



**Figura 6. Previsão da estrutura da RNase R de *B.cenocepacia*.** O software *ESyPred3D* utilizou a estrutura resolvida de *E.coli* para a RNase II (Frazao *et al.*, 2006). Esta cadeia partilha uma identidade de 24,6% com a sequência da RNase R de *Burkholderia cenocepacia*.

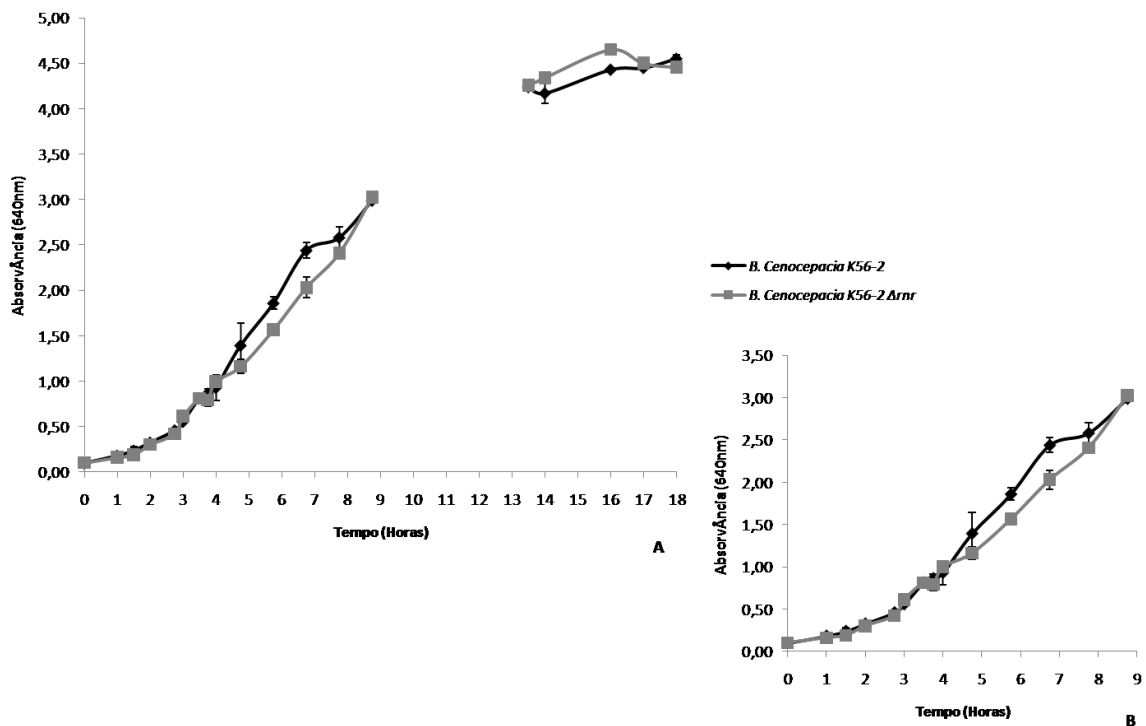
Com o intuito de analisar a função do gene *rnr* em *B.cenocepacia*, foi desenhada uma estratégia de clonagem para construir um mutante de *B.cenocepacia* K56-2 com deleção do gene *rnr*. Apesar de todo o trabalho informático se ter realizado com base no gene de *B.cenocepacia* J2315 o trabalho experimental foi realizado em *B.cenocepacia* K56-2 pelo facto de o seu manuseamento ser mais fácil e promissor. Posto isto amplificou-se um fragmento de 1672 pb a partir do DNA genómico de *B.cenocepacia* K56-2 recorrendo aos iniciadores de oligonucleótidos *Fr1553Fwd* e *Fr1553Rev* (ver **Tabela 4** do capítulo Material e Métodos). Este fragmento foi clonado no vector suicida *pDrive* e posteriormente interrompido pela introdução da cassette de resistência ao antibiótico trimetropim. A transformação de *B.cenocepacia* k56-2 com

esta construção permitiu obter a estirpe mutante, inicialmente seleccionados por crescimento em LB sólido suplementado com  $150\text{mg ml}^{-1}$  de trimetropim. O candidato a mutante com inserção foi posteriormente confirmado por PCR recorrendo aos iniciadores de oligonucleótidos BCAL1553*fwd* e BCAL1553*rev* (**Tabela 4**), permitindo identificar o clone mutante de *B.cenocepacia* k56-2, que será denominado a partir de agora de *B.cenocepacia* K56-2  $\Delta$ *rrn*.

A construção deste mutante permitiu uma série de análises funcionais do gene e consequentemente o estudo da sua importância no metabolismo e virulência de *B. cenocepacia*, que apresentamos nos pontos seguintes.

### Papel da RNase R no crescimento, na capacidade de formação de colónias em meio sólido e na morfologia celular

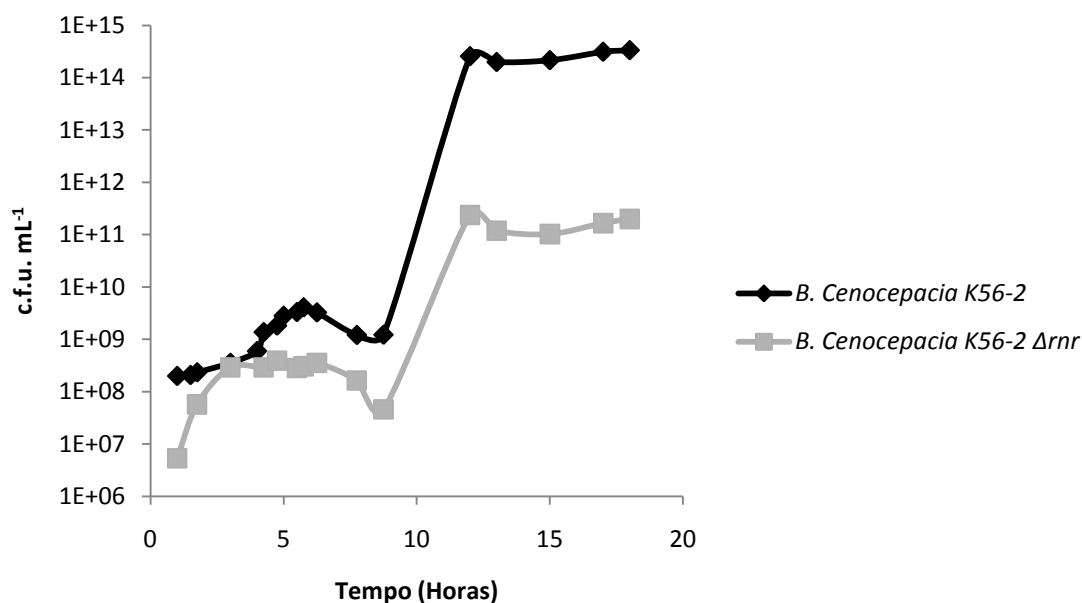
Avaliou-se o crescimento a  $37^{\circ}\text{C}$  de *B.cenocepacia* K56-2 e *B.cenocepacia* K56-2  $\Delta$ *rrn* (**Figura 7**). Verifica-se que o crescimento das células é semelhante entre a estirpe selvagem e a estirpe mutante.



**Figura 7. Representação gráfica de crescimento de *B. cenocepacia* K56-2 e *B. cenocepacia* K56-2  $\Delta rnr$  a 37°C.** A) 18 Horas de crescimento. B) Crescimento na fase exponencial. A curva foi obtida com a realização de 3 experiências independentes. As barras verticais apresentadas em cada ponto representam o desvio padrão. Os pontos nos quais não são representadas as barras de desvio padrão deve-se ao facto de serem valores muito baixos e difíceis de visualizar na escala do eixo das abcissas. O espaço com ausência de linha tendência entre as nove e as 12 horas deve-se á ausência de medições neste período.

### Capacidade de formação de colónias em meio de cultura sólido

Com o intuito de avaliar, para cada uma das estirpes em estudo, se há uma correspondência linear entre os valores de absorvância registados ao longo do tempo e o número de células viáveis, procedeu à quantificação das unidades formadoras de colónia (c.f.u.) em meio sólido de crescimento (**Figura 8**). De forma surpreendente constatou-se que a estirpe *B. cenocepacia* K56-2  $\Delta rnr$  apresenta sempre um número de c.f.u. inferiores que à estirpe selvagem, tornando-se esta diferença mais acentuada na fase estacionária. Ao final de 18 horas de crescimento a estirpe selvagem consegue atingir o valor  $3,36 \times 10^{14}$  c.f.u. mL<sup>-1</sup> enquanto a estirpe mutante apenas regista  $1,99 \times 10^{11}$  c.f.u. mL<sup>-1</sup>.

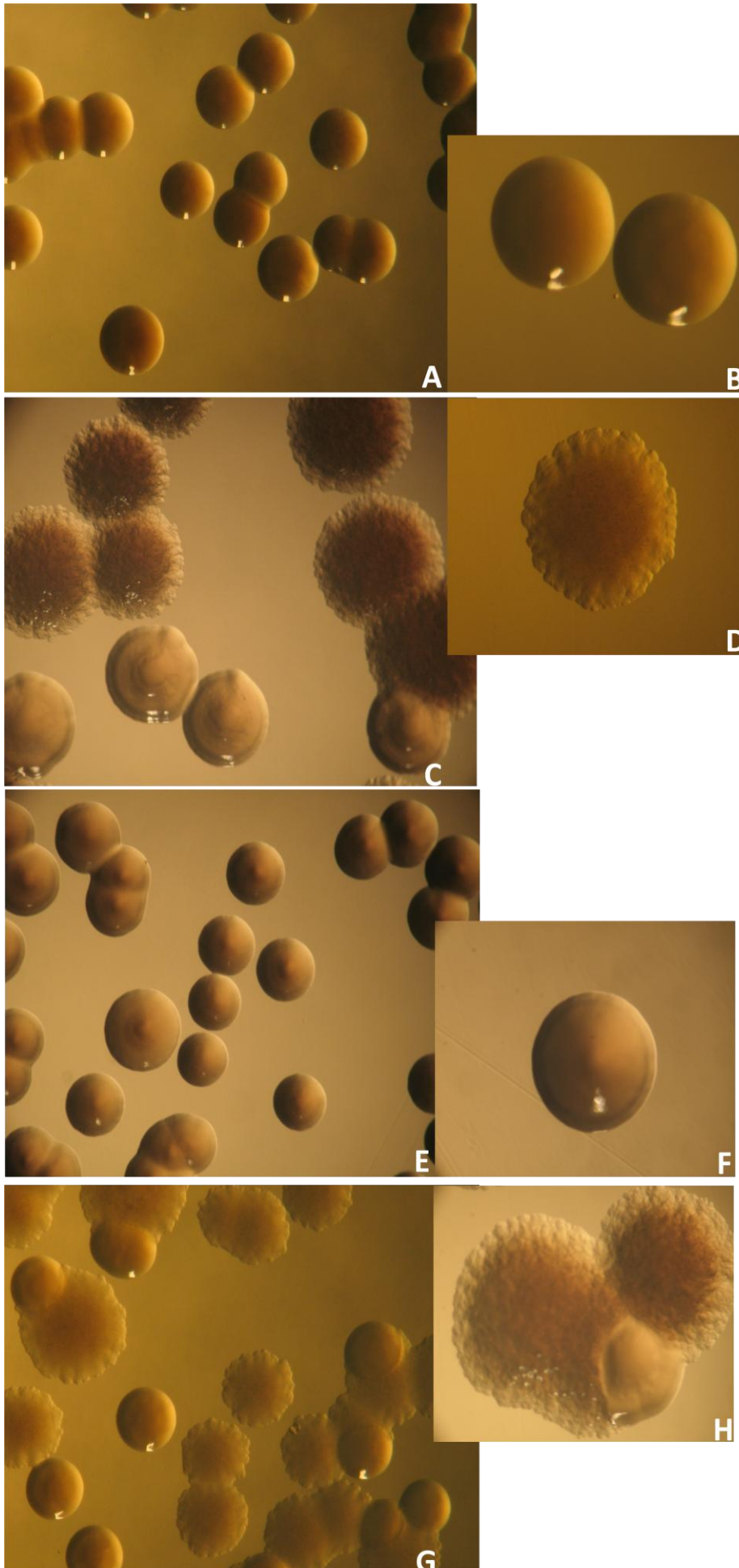


**Figura 8. Unidades formadoras de colónias de *B. cenocepacia* e *B. cenocepacia* K56-2  $\Delta rnr$ .** Os valores de c.f.u. registados foram obtidos por série de diluições  $10^4$ - $10^9$  e por contagens em triplicado. As barras apresentadas em cada ponto representam o desvio padrão. Os pontos nos quais não se representam a barra de desvio padrão deve-se ao facto de ser um valor muito baixo impossível de visualizar na escala do eixo abcissa.

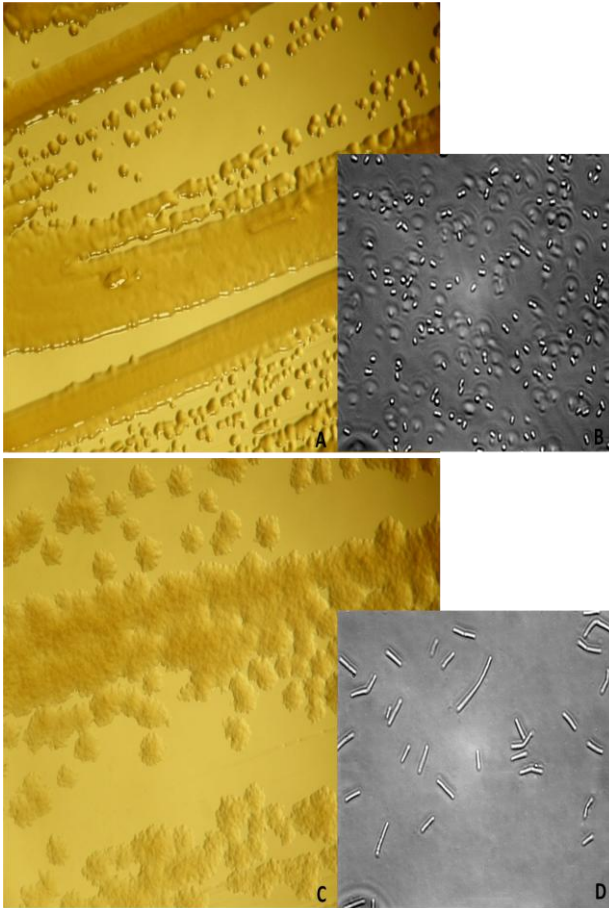
Verificou-se, através da observação à lupa, que as colónias da estirpe selvagem e mutante apresentavam variação colonial, sendo que as da estirpe selvagem eram todas lisas e brilhantes enquanto as da estirpe mutante, eram, maioritariamente, rugosas e baças (**Figura 9**). Observou-se ainda, que o número de colónias rugosas ao fim de 4 horas de crescimento, em meio líquido, era superior ao número de colónias rugosas após 18 horas de crescimento (dados não apresentados).

De seguida procedeu-se à observação microscópica das células de cada uma das colónias e verificou-se que na estirpe mutante existe duas populações fenotipicamente distintas (**Figura 10**). As observações originadas a partir de colónias rugosas demonstram que a população celular que as constitui é de células filamentosas longas, de morfologia muito distinta dos pequenos bastonetes característicos das colónias lisas. Observou-se ainda que as células das colónias rugosas dão sempre origem a colónias rugosas e as colónias lisas dão sempre origem a colónias lisas (**Figura 10A e 10C**).

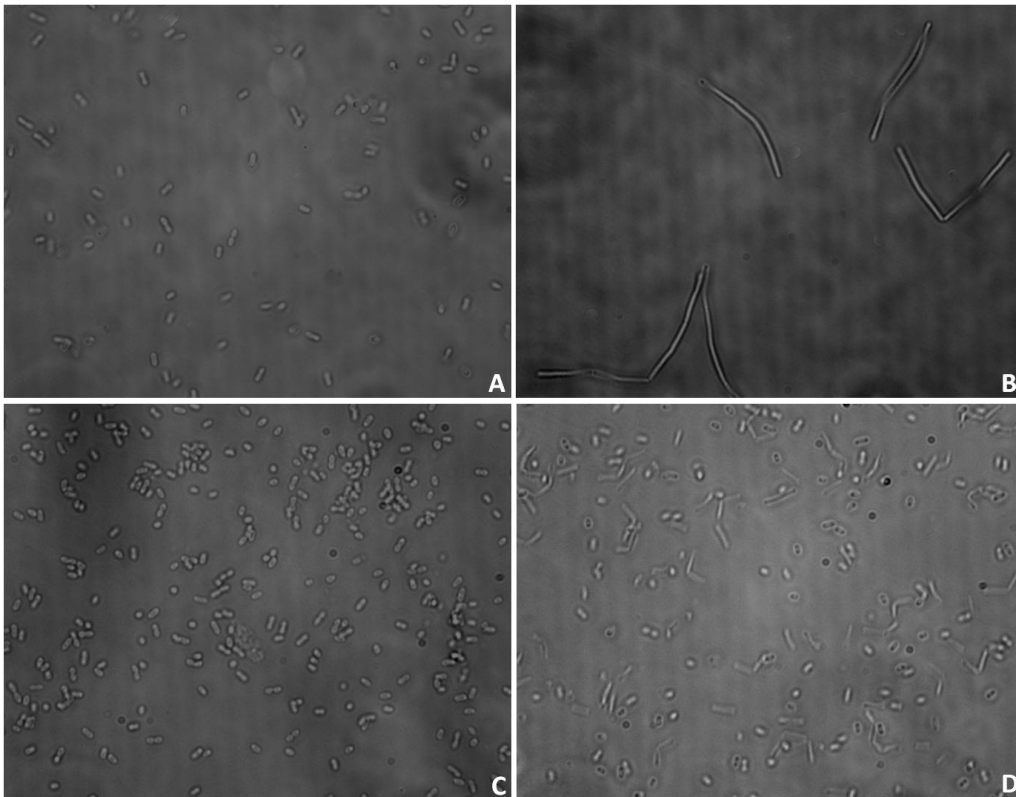
Analisou-se em mais detalhe as alterações morfológicas nas células devido à eliminação do gene *rnr* (**Figura 11**). Na estirpe selvagem as células são em forma de pequenos bastonetes e sempre iguais ao longo do tempo. Contudo, verificou-se que a estirpe mutante apresenta longas cadeias de células filamentosas sem septação e por isso juntas umas às outras (**Figura 11[B]**). Contudo, na fase estacionária, observam-se células individuais, de forma igual ao selvagem e as células unidas, com ausência de septação, são em menor número e por isso formando cadeias de células menos longas que na fase exponencial. (**Figura 11[D]**). A fim de confirmar que as estruturas longas e de forma filamentosa são de facto células com ausência de septação fez-se uma marcação de fluorescência com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (**Figura 12**). Observou-se que existem um conjunto de nucleóides individualizados, que confirmam a ausência de septação nas células de *B. cenocepacia* K56-2  $\Delta rnr$ .



**Figura 9.** Colônias de *B. cenocepacia* k56-2 e *B. cenocepacia* K56-2  $\Delta nr$  à lupa. A) Colônias de inóculo de *B. cenocepacia* K56-2, crescido durante 4 horas em meio líquido. B) Ampliação de colônias apresentadas na imagem A. C) Colônias de inóculo *B. cenocepacia* K56-2  $\Delta nr$ , crescidos durante 4 horas em meio líquido. D) Ampliação de uma das colônias apresentadas na imagem. E) Colônias de inóculo de *B. cenocepacia* k56-2, crescido durante 18 horas em meio líquido. F) Ampliação de uma das colônias apresentadas na imagem E. G) Colônias de inóculo *B. cenocepacia* K56-2  $\Delta nr$ , crescidos durante 18 horas em meio líquido. H) Ampliação de uma das colônias apresentadas na imagem. As imagens A,C,E,G encontram-se 6,5 vezes ampliadas e as imagens B,D,F, H com uma ampliação de 25 vezes.

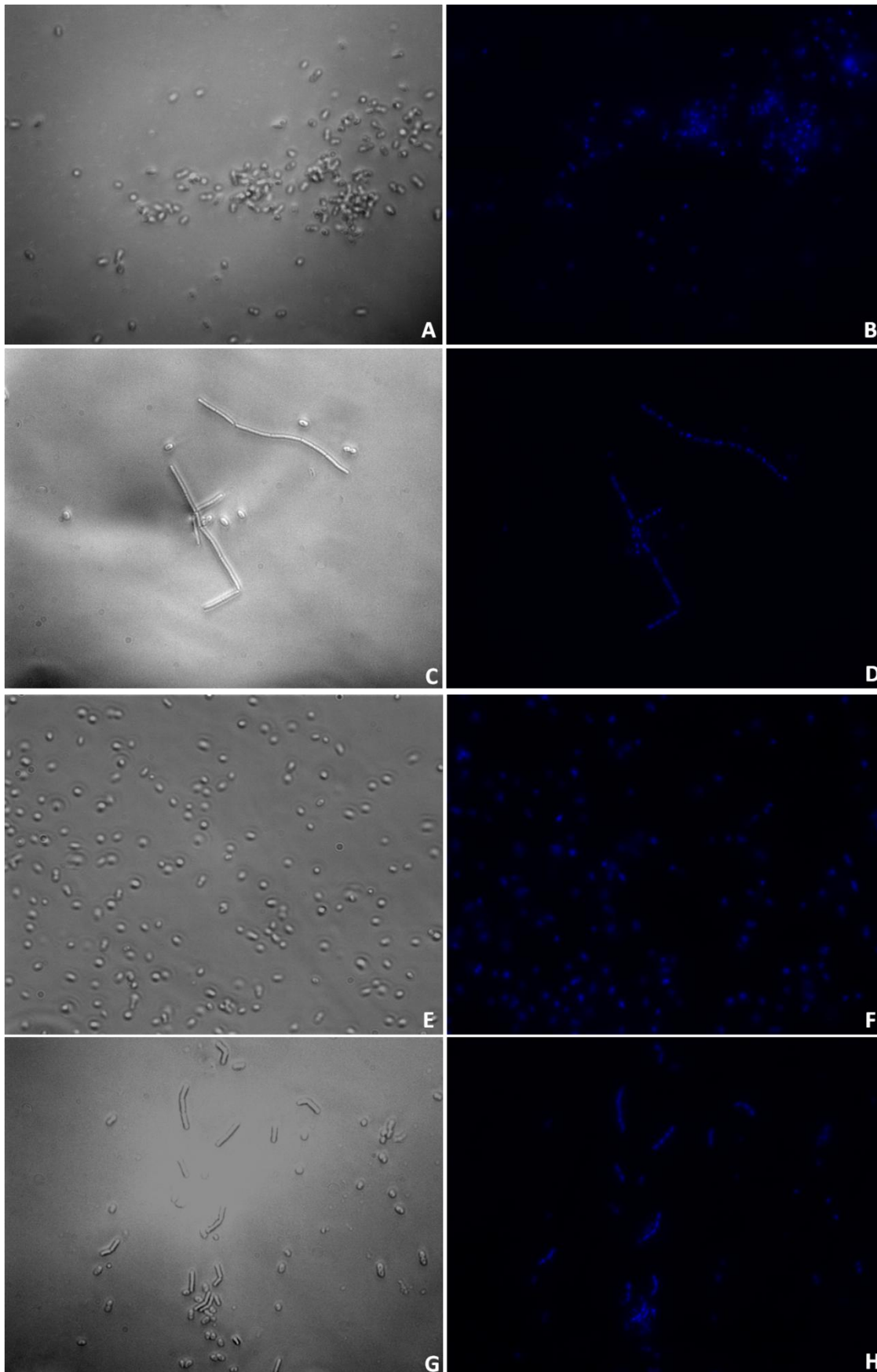


**Figura 10. Isolados de colônias e células de *B. cenocepacia* K56-2 e *B. cenocepacia* K56-2  $\Delta$ rrr.** A) Riscado em placa de colônia lisa de *B. cenocepacia* K56-2  $\Delta$ rrr. B) Observação microscópica de células que compõem as colônias lisas. C) Riscado em placa de colônia rugosa de *B. cenocepacia* K56-2  $\Delta$ rrr. D) Observação microscópica de células que compõem as colônias rugosas. Ampliação de 6,5 vezes à lupa dos riscados. A ampliação total das imagens de microscópio é de 1000x



**Figura 11. Células *B. cenocepacia* K56-2 e *B. cenocepacia* K56-2  $\Delta$ rrr.** A) Estirpe selvagem ao final de 4 horas de crescimento. B) Estirpe mutante ao final de 4 horas de crescimento. C) Estirpe selvagem ao final de 18 horas de crescimento. D) Estirpe mutante ao final de 18 horas de crescimento. A ampliação total de todas as imagens é de 1000x.





**Figura 12.** Células *B. cenocepacia* K56-2 e *B. cenocepacia* K56-2  $\Delta rnr$  marcadas com o fluorocromo DAPI. A) Estirpe selvagem ao final de 4 horas de crescimento em contraste de fase B) Estirpe selvagem ao final de 4 horas de crescimento com fluorescência emitida por DAPI C) Estirpe selvagem ao final de 18 horas de crescimento em contraste de fase D) Estirpe selvagem ao final de 18 horas de crescimento com fluorescência emitida por DAPI. A ampliação total de todas as imagens é de 1000x.

Está descrito para o microrganismo *E.coli* uma série de redes complexas que regulam a sua divisão celular. Uma das proteínas que integra uma dessas redes e que é importante referir é a RNase E. Esta proteína está descrita como uma enzima importante no metabolismo do mRNA bem como na maturação e processamento de uma variedade de pequenos RNAs catalíticos, incluindo *ssrA*, o M1 RNA (subunidade da RNase P), 5s rRNA, 16sRNA e tRNA (Tamura *et al.*, 2006). A acção da RNase E é essencial para a divisão celular de *E.coli* e a inactivação desta enzima resulta na produção de estruturas filamentosas alongadas consistente com múltiplos corpos celulares em ligação e incapacidade de formar colónias em meio sólido (Tamura *et al.*, 2006). Esta observação é semelhante ao obtido pela eliminação do gene *rnr* em *Burkholderia cenocepacia* k56-2. Se a acção destas duas enzimas fosse exactamente igual nestes dois organismos seria de esperar o assegurar da morfologia típica destas células na ausência de um ou outro gene. Aparentemente este facto não se verifica o que pode significar que, quer a RNase R quer a RNase E, apresentam substratos específicos e fundamentais na divisão celular. Assim, a função da RNase R na divisão celular pode eventualmente ser compensada, mas não na sua totalidade. O estudo de Tamura e seus colaboradores (2006) demonstrou ainda que as dificuldades de divisão celular são resultado do aumento da proteína FtsA e decréscimo da proteína FtsZ (Tamura *et al.*, 2006). O gene *ftsZ* é um gene muito conservado entre procariotas e tem um papel essencial no processo de divisão celular. Durante este processo a proteína FtsZ, uma homólogo estrutural da tubulina, polimeriza e forma um esqueleto para o emparelhamento de proteínas na divisão celular (Buddelmeijer & Beckwith, 2002). A proteína FtsZ em *E.coli* é codificada por um transcrito policistrónico, que produz outros dois tipos de proteínas a FtsA e FtsQ (Tamura *et al.*, 2006). A proteína RNase E cliva os transcritos *ftsQAZ* e esta clivagem afecta a abundância dos segmentos de mRNA codificantes de FtsA e FtsZ. A RNase E não funcional diminui a razão de transcritos dos genes *ftsZ* e *ftsA* e esta perturbação da razão FtsZ/FtsA pode afectar a divisão celular (Tamura *et al.*, 2006). É de notar que, também em *Burkholderia cenocepacia* este transcrito é policistrónico e parece provável que a RNase R também possa ter um papel na manutenção da razão FtsZ/FtsA, pela semelhança com o descrito para a acção da RNase E nestes transcritos e na progressão do ciclo celular.

É ainda importante referir que a perda de capacidade de formação de colónias em mutantes com eliminação da RNase E pode ser revertível pela superexpressão da RNase G e que a relação entre estas duas proteínas é elevada (Lee *et al.*, 2002; Tamura *et al.*, 2006) evidenciando-se, assim, a característica redundante de algumas RNases. Neste sentido será importante o estudo da capacidade de outras RNases na reposição da capacidade de c.f.u. e da divisão celular correcta, em *B. cenocepacia* K56-2  $\Delta rnr$  e compreender de que forma estas RNases se complementam e qual o papel único de cada uma.

As alterações morfológicas e a dificuldade de formação de c.f.u. registadas para *B. cenocepacia* K56-2  $\Delta rnr$ , podem ainda resultar da necessidade da participação da RNase R em outros mecanismos. Neste sentido não podemos deixar de referir um possível papel dos pequenos RNAs reguladores. Estas estruturas desempenham um papel importante em inúmeros processos fisiológicos, incluindo regulação da expressão genética, remodelação e modificação da estrutura da cromatina, modulação da actividade de proteínas, e controlo da tradução (Hong *et al.*, 2005). Neste sentido é importante referir o SsrA que é degradado pela RNase R em *E.coli* e outros organismos procariotas, e estabilizado pela proteína SmpB (Karzai *et al.*, 2000). SsrA é um pequeno RNA também conhecido por mensageiro de transferência (tmRNA), ou 10SaRNA e é a única molécula que apresentam a dupla função como RNA de transferência (tRNA) e RNA mensageiro (Hong *et al.*, 2005). O papel específico de SsrA é modificar proteínas que cuja biosíntese parou ou foi interrompida. Estas proteínas incompletas são marcadas para degradação pela co-tradução de péptidos alvos à sua extremidade C-terminal. Esta reacção é mediada pela ligação de SsrA e a sua proteína associada SmpB. Este sistema desempenha um papel chave no controlo de qualidade do ciclo celular e providencia mecanismo para “limpar” ribossomas presos ou obstruídos (Karzai *et al.*, 2000). A ausência destes mRNAs capazes de marcar péptidos e de libertar ribossomas representará claramente dois problemas. O primeiro é a libertação de ribossomas para sintetizar novos mRNAs. E ainda o potencial efeito deletério de libertação parcial de proteínas, provavelmente com baixas propriedades de solubilidade e actividades não reguladas no interior da célula (Karzai *et al.*, 2000).

Em *Caulobacter crescentus*, SsrA é fundamental para coordenar a progressão do ciclo celular e quer a sua síntese de novo, quer a sua degradação parecem ser rigorosamente controlados durante o ciclo celular (Hong *et al.*, 2005).

Em alguns estudos com *E.coli*, a RNase R é co-purificada com o complexo SsrA-SmpB mas o significado desta interacção é desconhecida (Karzai & Sauer, 2001). Foi demonstrado por Hong e seus colaboradores (2005) que a RNase R é a nuclease responsável pela degradação de SsrA em diferentes fases do ciclo celular e que a regulação desta degradação durante o ciclo celular é também regulada pela ligação de SmpB ao SsrA. Aparentemente SmpB pode limitar o acesso da RNase R à extremidade 3' do SsrA e foi ainda demonstrado que a RNase R é requerida para o processamento do pré-SsrA em *E.coli* em condições de choque do frio (Cairrão *et al.*, 2003).

Será importante, no futuro, avaliar as alterações nos transcritos de SsrA e SmpB, quer no frio, quer no crescimento a 37°C e perceber as relações com a RNase R em *B.cenocepacia*.

Curiosamente, nos diferentes crescimentos de *B. Cenocepacia K56-2 Δrnr* e comprovado pela análise das colónias e observações microscópicas, a população de células mutantes é constituída por duas sub-populações. De alguma forma, algumas células, conseguem compensar a ausência da RNase R e desenvolverem-se normalmente sem apresentarem dificuldades na divisão celular, recuperando a sua morfologia na totalidade. Além disto, parece que a capacidade de algumas em compensar a falta de *rnr* se mantêm nas gerações seguintes, sem que nunca mais tenha uma regressão do seu fenótipo, mantendo-se constante a forma de bastonete simples e conseqüentemente colónias lisas. Este facto parece evidenciar a selecção de uma diferença genotípica entre as bactérias que constituem a estirpe e que lhes permite compensar a ausência da RNase R. Serão necessários mais estudos sobre o genoma destas duas sub-populações para compreender o mecanismo por de trás desta capacidade de compensação.

## Importância da RNase R na mobilidade celular

Dada a importância da mobilidade para as células bacterianas, foram avaliados dois tipos de movimento bacteriano, designados de *swimming* e *swarming*. O *swimming* representa o movimento individual da célula em ambientes aquosos e semi-sólidos, dependente do flagelo (Inoue *et al.*, 2008). Por outro lado, o *swarming* é o mecanismo de propagação de um grupo de células de forma coordenada em superfícies semi-sólidas dependente do flagelo e da produção de determinado tipo de compostos extracelulares que reduzem a tensão da superfície e permitem a sua mobilidade (Inoue *et al.*, 2008).

Verificamos que o gene *rnr* é importante para os dois tipos de mobilidade. A estirpe mutante apresenta uma redução de mobilidade *swimming* e *swarming* (**Figura 13**). Contudo, esta diferença foi apenas verificada em células da fase exponencial com 4 horas de crescimento. Neste caso, ao final de 24 horas registou-se a formação de um diâmetro de 2,6 cm para o selvagem e 1,5 cm para o mutante no movimento de *swimming*, sendo esta diferença significativa ( $p < 0,001$ ). Também para o *swarming* se verifica uma diferença significativa com um diâmetro de 2,1 para selvagem e 1,4 para mutante ( $p < 0,05$ ).

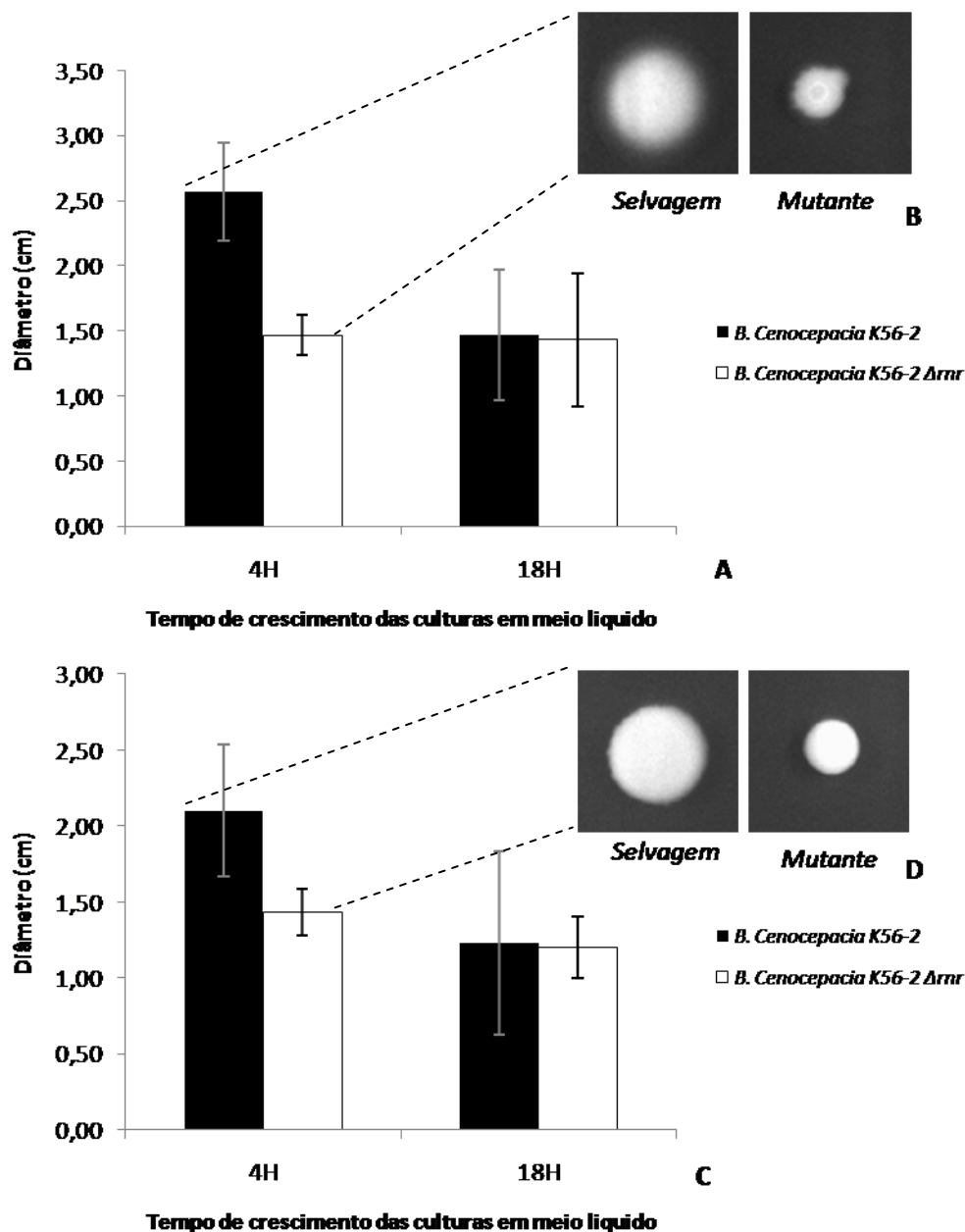


Figura 13. Mobilidade *swimming* e *swarming* de *B. Cenocepacia K56-2* e *B. Cenocepacia K56-2 Δnr*. A) Diâmetros obtidos pelo movimento *swimming* ao final de 24 horas de plaqueamento de inóculos líquidos com 4 e 18 horas de crescimento B) Imagens representativas dos valores representados em A. C) Diâmetros obtidos pelo movimento *swarming* ao final de 24 horas de plaqueamento de inóculos líquidos com 4 e 18 horas de crescimento B) Imagens representativas dos valores representados em C. Os resultados são de 3 experiências independentes. As barras indicam o desvio padrão. As diferenças registadas para o plaqueamento após 4 horas de crescimento em meio líquido são significativas quer para o *swimming* ( $p < 0,001$ ) quer para o *swarming* ( $p < 0,05$ ).

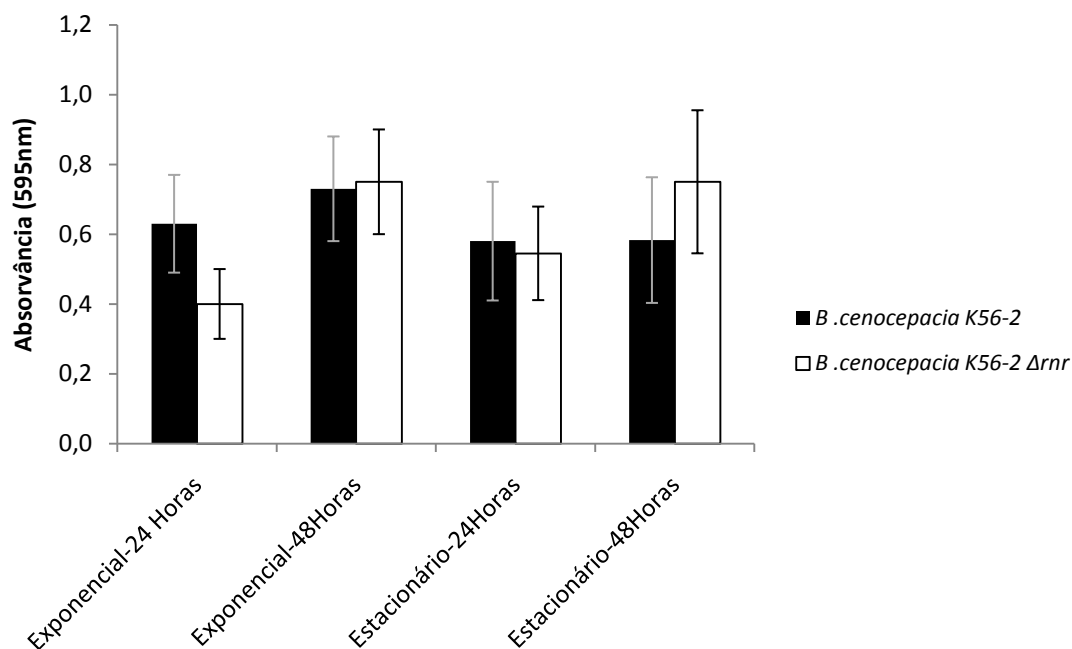
As células procariotas possuem vários mecanismos que medeiam o movimento celular próprio (Jarrell & McBride, 2008). O movimento das células é fundamental para o sucesso da colonização de bactérias oportunistas, permitindo-lhes o deslocamento para zonas alvo. Neste sentido os resultados obtidos neste estudo são importantes na

medida em que o movimento das células com eliminação do gene *rnr* fica afectado. Esta redução na capacidade de movimento poderá estar correlacionada com a morfologia que adquirem, uma vez que não se registaram diferenças significativas quando a morfologia entre ambas é mais semelhante.

A comunicação entre organismos é importante devido ao facto de muitos comportamentos de cooperação bacteriana poderem estar envolvidos na virulência das bactérias (West *et al.*, 2006). O *swarming* é um exemplo de modelo de comportamento social bacteriano e o seu estudo pode ser importante neste sentido. No caso de *B. cenocepacia* K56-2  $\Delta rnr$  este movimento é afectado e por isso poderá representar dificuldades na dispersão e colonização de determinado tipo de ambientes, como por exemplo as vias respiratórias de doentes com FQ.

### **Importância da proteína RNase R na formação de biofilmes**

A comunicação e cooperação entre os microrganismos realizam-se com variados tipos de comportamento além do movimento. Um outro exemplo é a formação de biofilmes. Por isto, foi avaliada neste trabalho a capacidade do mutante na formação de biofilmes (**Figura 14**). No que diz respeito às culturas com 4 horas de crescimento inoculadas nas microplacas de poliestireno, os resultados obtidos mostram que ao final de 24 horas de crescimento o mutante ainda não atingiu a mesma quantidade de biofilme formado que a estirpe selvagem, havendo uma diferença de densidade óptica, de 0,2 valores ( $p < 0,001$ ). A estirpe selvagem e o mutante só se igualam ao final de 48 horas de inoculação. Nas culturas com 18 horas de crescimento, antes da inoculação, não foram observadas diferenças na capacidade de formação de biofilme. Contudo, a estirpe mutante apresenta, após 48 horas apresenta uma maior formação de biofilme do que o selvagem, com uma diferença significativa de densidade de óptica de 0,15 ( $p < 0,05$ ).



**Figura 14. Formação de biofilmes de *B. cenocepacia* K56-2 e *B. cenocepacia* K56-2  $\Delta$ rrn.** Os valores de absorvância são dados pelo violeta de cristal retido pelas células com aderência à superfície das microplacas. Exponencial significa células plaqueadas com 4 horas de crescimento e estacionário representa células recolhidas com 18 horas de crescimento. A formação de biofilmes foi observada ao final de 24 horas e 48 horas pós-inoculação. As barras indicam o desvio padrão. As diferenças registadas para o plaqueamento de células em fase exponencial (4 horas) ao final de 24 horas e as diferenças registadas em crescimento estacionário (18 horas) ao final de 48 horas, são significativas ( $p < 0,001$  e  $p < 0,05$ , respectivamente).

A ligação inicial das células, a um dado suporte, depende de estruturas expostas à superfície tais como as adesinas e pili. Por outro lado, a maturação dos biofilmes requer genes que modulem a forma das células e a composição da superfície, genes envolvidos na produção de exopolissacarídeos, biogénese e manutenção da integridade da membrana externa, genes fundamentais na comunicação célula-a-célula, e produção de moléculas *quorum sensing* (Huber *et al.*, 2001; O'Toole & Kolter, 1998; Watnick & Kolter, 2000). Além disto, as células localizadas em regiões diferentes do biofilme exibem diferentes padrões de expressão genética (Costerton *et al.*, 1999). Os resultados obtidos podem ser explicados não só devido à morfologia adquirida pelas células na divisão celular durante a fase exponencial, como também poderá ser resposta à ausência da RNase R noutros mecanismos de alteração de expressão genética, necessários à formação rápida dos biofilmes.

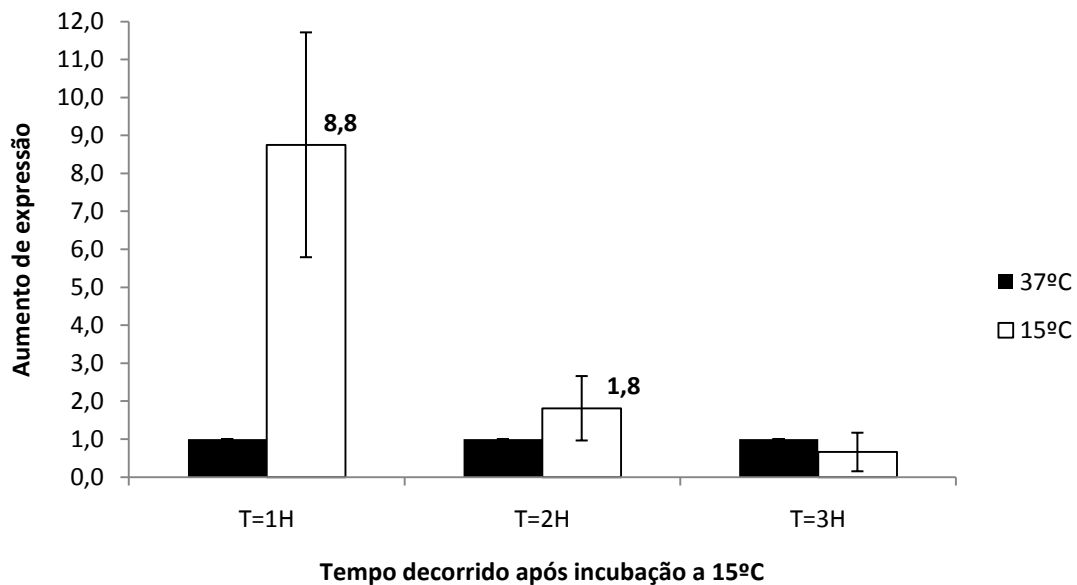
De futuro será importante verificar como se comportam determinados genes descritos como genes envolvidos na formação de biofilmes na estirpe selvagem e as suas alterações na estirpe mutante, nomeadamente os em epígrafe referidos.



A capacidade de formação de biofilmes é um assunto importante no que respeita a doentes com FQ vez que a sua formação contribui para a persistência da infecção crónica (Hassett *et al.*, 2009). Com isto, e tendo em conta os resultados observados nas dificuldades de formação do biofilme com a ausência do gene *rnr*, este ponto deverá ser um foco de estudo futuro.

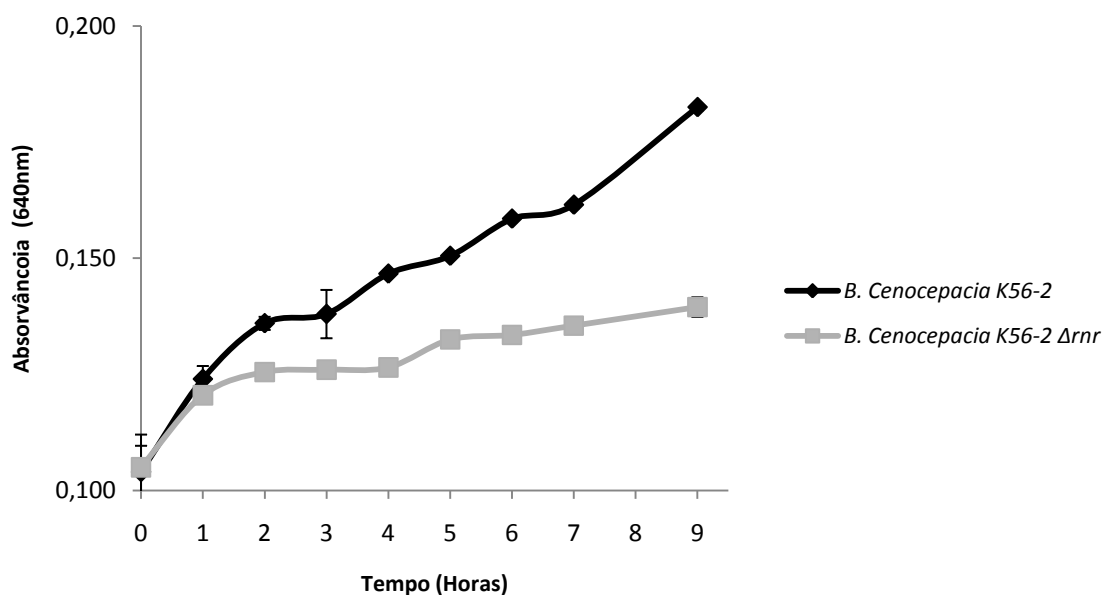
### Papel da RNase R na resposta ao stress térmico para baixas temperaturas

O comportamento da RNase R como proteína de resposta ao choque do frio não parece ser linear e apesar de estar descrita para muitos organismos como importante na resposta a este tipo de stress, em *C. crescentus*, por exemplo, não é uma proteína induzida pelo choque do frio (Hong *et al.*, 2005). Assim, neste estudo foi avaliada a resposta da RNase R no choque do frio induzido em *Burkholderia Cenocepacia* k56-2. Recorrendo ao PCR em Tempo Real (RT-PCR) para avaliação das diferenças de expressão foi verificado que, uma hora após a transferência de culturas para 15°C, foi observado um aumento de transcritos *rnr* de aproximadamente 8 vezes comparativamente a culturas controlo, em crescimento contínuo a 37°C, mantendo-se mais expresso até ao final de 2 horas (**Figura 15**).



**Figura 15. Aumento da expressão do gene *rnr* em culturas transferidas de 37°C para 15°C.** A expressão do gene *rnr* ao longo do tempo foi determinado recorrendo ao PCR em Tempo Real (RT-PCR) e avaliada pela aplicação do método  $\Delta\Delta Ct$ . Culturas mantidas em crescimento a 37°C até ao início da fase exponencial, com uma densidade óptica a 640nm de aproximadamente 0,5, foram transferidas para temperaturas de 15°C mantendo-se as restantes condições experimentais. Foi recolhido o RNA ao final de 1 -2 e 3 horas após a transferência. As barras a preto representam as culturas em crescimento contínuo a 37°C as barras a cinza representam as culturas que foram transferidas dos 37°C para os 15°C. As barras apresentadas em cada ponto representam o desvio padrão. Os valores indicados em cima das barras são os aumentos de expressão comparativamente ao calibrado.

As diferenças de expressão registadas traduzem a possível importância da proteína RNase R em resposta ao choque do frio em *Burkholderia cenocepacia*, e por isso acompanhou-se o crescimento de *B. cenocepacia* e *B. cenocepacia K56-2  $\Delta rnr$*  a 15°C (**Figura 16**). Como esperado ambas as estirpes tiveram um crescimento muito reduzido durante as 9 horas de crescimento acompanhado. Contudo, o crescimento do mutante foi muito mais lento com valores de biomassa formada ao longo do tempo muito mais reduzidos para todas as horas com significância estatística para todos os pontos entre as 2 e as 9 horas ( $p < 0,01$ ).



**Figura 16. Representação gráfica de crescimento de *B. cenocepacia* K56-2 e *B. cenocepacia* K56-2  $\Delta rnr$  a 15°C.** A curva foi obtida com a realização de 3 experiências independentes. As barras apresentadas em cada ponto representam o desvio padrão. Os pontos nos quais não é representada a barra de desvio padrão deve-se ao facto de ser um valor muito baixo de difícil visualização na escala do eixo das abcissas. Para os pontos representados no gráfico no intervalo de tempo de 2h e 9h, as diferenças são significativas com valores de  $p < 0,01$ .

Estudos realizados por Cairrão e colaboradores (2003) indicam que a RNase R é um novo membro de proteínas induzidas por choque de frio em *E.coli*. Neste estudo

verificou-se que uma mudança das culturas para um crescimento a 10°C induzia um aumento gradual dos transcritos de *rnr*, registando-se um aumento total de 7 a 8 vezes passadas 3 horas do choque induzido. Nos resultados deste trabalho, com *Burkholderia cenocepacia*, a passagem para uma temperatura de 15°C leva ao mesmo aumento, mas logo ao final da primeira hora reduz, continuando a diminuir gradualmente nas horas seguintes. Aparentemente, em *Burkholderia cenocepacia*, a importância da proteína na modulação da maquinaria para responder ao choque é mais acentuada na primeira hora. De forma reduzida, existe uma resposta imediata decaindo os seus níveis pouco depois, como é característico de outras proteínas de resposta ao choque por frio. Contudo, num crescimento contínuo a 15°C, podemos verificar que esta proteína desempenha um papel importante já que a estirpe mutante para a *rnr* não consegue acompanhar o crescimento da estirpe selvagem. Assim a RNase R é a única exoribonuclease capaz de permitir uma resposta eficaz da bactéria ao choque do frio, não sendo a sua função assegurada por mais nenhuma proteína.

Encontra-se descrito para *E.coli* que em resposta ao choque por frio existe um aumento da síntese de uma variedade de proteínas. O papel da RNase R poderá ser o de assegurar o controlo de qualidade do rRNA, assegurando a exigência da qualidade destas proteínas, sintetizadas neste tipo de stresse, e que lhe permita garantir a sua sobrevivência.

Num estudo de Cheng e colaboradores (2005) foi demonstrado um aumento da quantidade da proteína RNase R de 7 vezes na transferência de culturas de 37°C para 10°C. Em somatório, este estudo demonstrou que a passagem das células para 10°C leva a um aumento de 10 a 12 vezes da sua actividade enzimática, aumentando durante três horas após a transferência e mantendo-se no nível máximo ao longo de seis horas pelo menos. Quer o estudo de Cairrão quer este, demonstram que estes aumentos são também resultado da estabilidade de mRNA e da proteína, respectivamente (Cairrão *et al.*, 2003; Chen & Deutscher, 2010).

No que diz respeito ao RNA, Cairrão *et al.* (2003) propõem que na fase inicial de aclimatização há uma protecção dos transcritos da degradação, quer pelo aumento da estabilidade de estruturas secundárias formadas sobre o choque de frio quer pela acção de proteínas de choque de frio (Cairrão *et al.*, 2003). Subsequentemente, nas próximas horas da fase de aclimatização, há uma redução dessa protecção e o

decaimento de transcritos é rápida. A enzima PNPase parece estar envolvida no decaimento de transcritos de alguns mRNAs de resposta ao choque por frio, na fase final da aclimatização e inclusive dos de *rnr*, como demonstrado por Cairrão (Cairrão *et al.*, 2003). Neste sentido será importante avaliar o comportamento desta enzima também em *Burkholderia cenocepacia* uma vez que parecem estar fortemente ligadas em várias respostas metabólicas a alterações do meio ambiente.

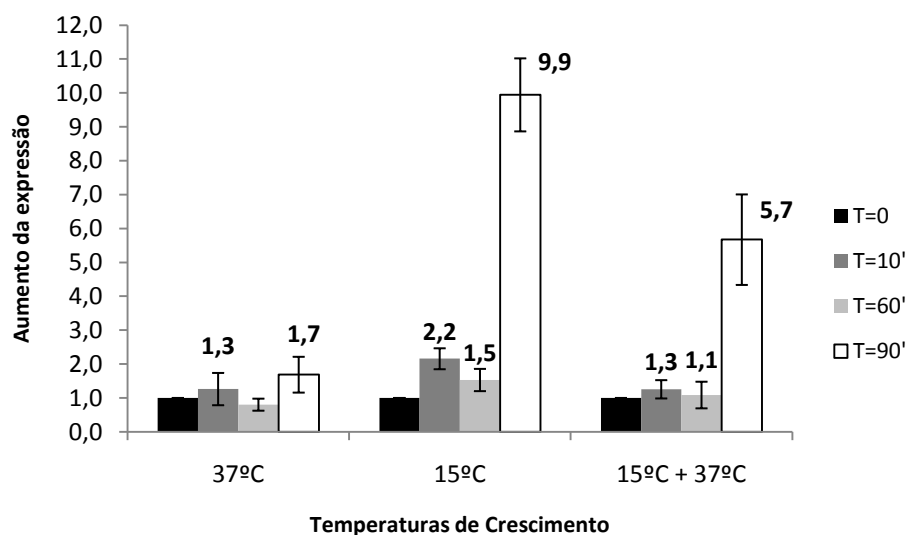
Chen e Deutsher (2010) defendem que os processos regulatórios que conduzem à elevação de RNase R durante o choque do frio e da entrada na fase estacionária são diferentes, já que no choque de frio há um aumento quer da proteína quer de RNA, e no caso da fase estacionária tardia há um decréscimo dos transcritos em paralelo com um aumento da actividade e quantidade de proteína (Chen & Deutscher, 2010). Será importante de futuro avaliar a quantidade de transcritos em *B.cenocepacia* k56-2 nestes dois procedimentos experimentais a fim de avaliar se este facto também se comprova para este organismo.

### **Níveis de *rnr* na resposta ao stresse induzido pelo antibiótico rifampicina**

Com o intuito de perceber o comportamento da *Burkholdeira cenocepacia* na transcrição de *rnr* em resposta ao stresse induzido por antibióticos foi aplicado o antibiótico rifampicina, um antibiótico cuja forma de actuação é ligar-se à RNA polimerase. A sua aplicação foi feita em diferentes condições de crescimento das culturas e avaliadas as alterações de expressão do gene (**Figura 17**). Na cultura em crescimento a 37°C, dez minutos após a adição de rifampicina registou-se um ligeiro aumento dos transcritos de *rnr* sendo este mais acentuado passados 90 minutos, duplicando a expressão existente comparativamente ao calibrador (amostra correspondente ao momento inicial da adição da rifampicina). Com o intuito de avaliar o comportamento do gene em resposta a dois tipos de stress foi adicionada rifampicina a culturas transferidas anteriormente para crescimento a frio (15°C, durante uma hora). Registou-se, nestas condições, um aumento de expressão do gene *rnr* logo ao final de dez minutos, sendo este de quase 10 vezes após os 90 minutos. Verificou-se também, que na transição de culturas em crescimento a 15°C para 37°C durante trinta minutos, existiu um decréscimo do transcrito de aproximadamente 4

vezes ao final de 90 minutos. Este facto demonstra que o aumento registado a 15°C, comparado ao registado a 37°C, é resposta cumulativa aos dois estímulos.

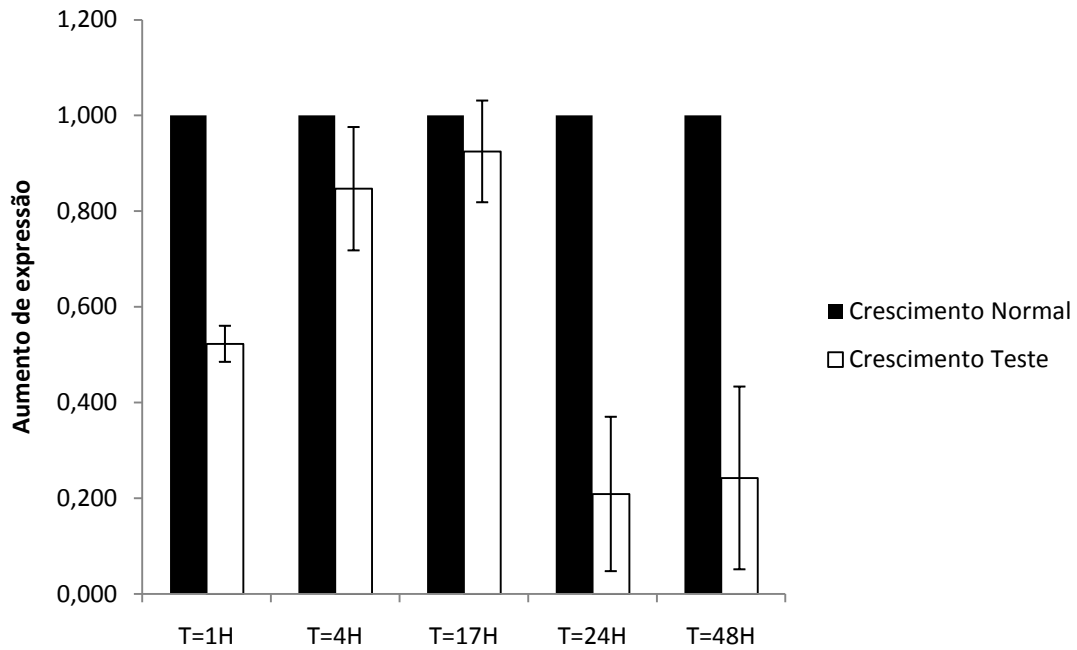
Estes resultados demonstram mais uma vez a importância desta enzima na resposta das células a estímulos ambientais.



**Figura 17. Aumento da expressão do gene *rnr* após adição de rifampicina a diferentes condições de crescimento de culturas.** A expressão do gene *rnr*, ao longo do tempo e em diferentes condições de crescimento das culturas, após a adição de rifampicina ( $500\mu\text{g ml}^{-1}$ ), foi determinado recorrendo ao RT-PCR e avaliada pela aplicação do método  $\Delta\Delta\text{Ct}$ . As culturas foram mantidas em crescimento a 37°C, 15°C e uma delas a 15°C transferido para 37°C durante trinta minutos (cultura representada de 15°C mais 37°C). Os tempos assinalados representam o tempo decorrido após a adição da rifampicina. As barras apresentadas em cada ponto representam o desvio padrão. Os valores indicados em cima das barras são os aumentos de expressão comparativamente ao calibrador.

### Níveis de *rnr* em condições que mimetizam o ambiente pulmonar de doentes FQ

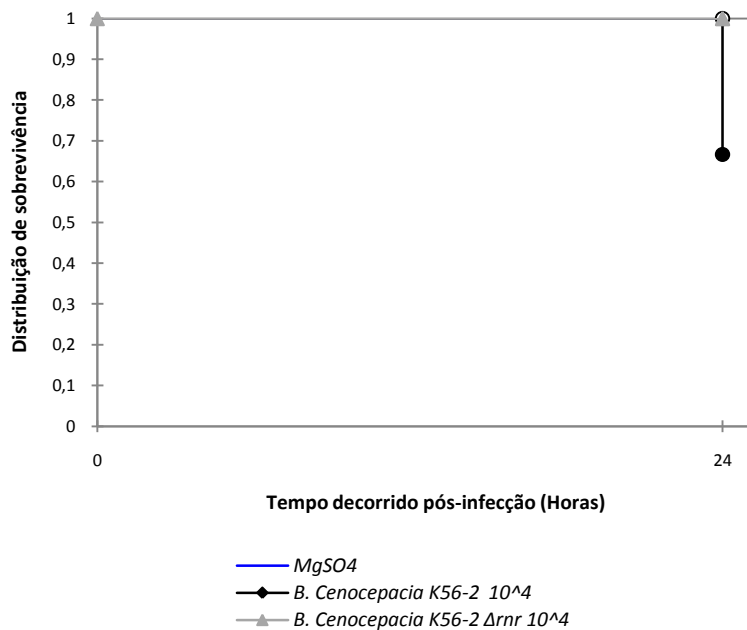
Avaliou-se os níveis de transcritos *rnr* em células crescidas num ambiente com propriedades físico-químicas similares às encontradas nos pulmões de doentes com FQ. Este microambiente caracteriza-se por elevada osmolaridade, condições limitantes de oxigénio e stress oxidativo. Para nenhum dos tempos de crescimento em que se avaliou a quantidade de transcritos de *rnr* se registou o seu aumento, comparativamente a células crescidas nas designadas condições normais de crescimento da estirpe (**Figura 18**). É importante avaliar a expressão do gene em tempos mais intermédios, dado que tal resultado pode ser devido aos grandes intervalos de tempo avaliados.



**Figura 18. Níveis do gene *rnr* em células crescidas em ambiente que mimetiza o pulmão de doentes FQ.** Os níveis do gene *rnr*, foram determinados para diferentes tempos de crescimento e obtidos recorrendo ao RT-PCR e avaliada pela aplicação do método  $\Delta\Delta Ct$ . As barras apresentadas em cada ponto representam o desvio padrão. Os valores indicados em cima das barras são os aumentos de expressão comparativamente ao calibrador.

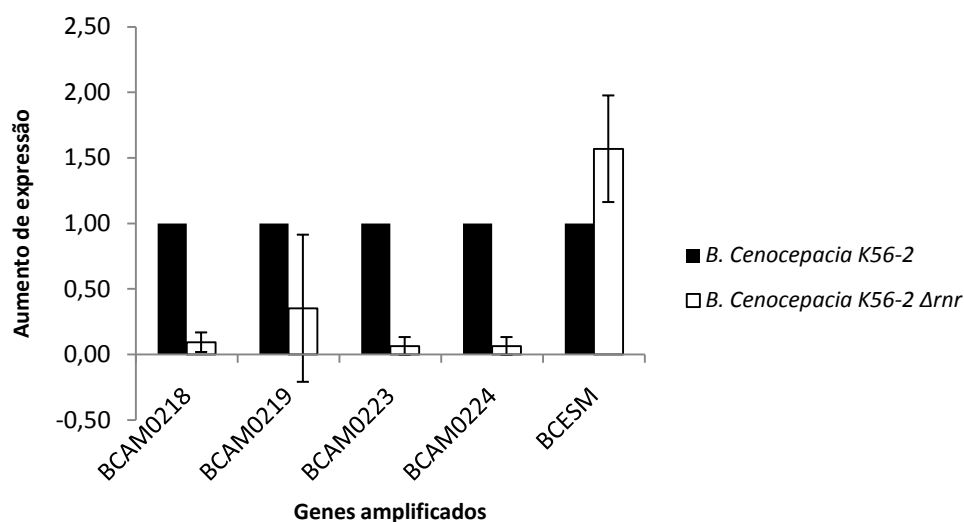
### Papel da RNase R na virulência

Com o intuito de avaliar o papel da RNase R na virulência, determinou-se a capacidade de *B. cenocepacia* K56-2  $\Delta rnr$  causar morte, comparativamente a *B. cenocepacia* no modelo biológico *Galleria mellonella* (**Figura 19**). A taxa de mortalidade nas larvas infectadas com a estirpe mutante está reduzida em 30% ( $p < 0,001$ ). Ao final de 24 horas de infecção 30% das larvas infectadas com a estirpe selvagem estão mortas enquanto as larvas infectadas com a estirpe mutante estão todas vivas tal como no grupo controlo injectado com o sulfato de magnésio ( $MgSO_4$ ).



**Figura 19. Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para a infecção de *G.mellonella* com estirpe mutante e selvagem.** A comparação das curvas de Kaplan-Meier de *B. cenocepacia* K56-2 e *B. cenocepacia* K56-2 Δrrn, pelo teste estatístico de Log-Rank demonstram que as diferenças são estatisticamente significativas com  $p < 0,0001$ . Foram injectadas dez larvas com  $10^4$  c.f.u. e avaliada a sua morte passadas 24 horas. As larvas foram consideradas mortas quando deixam de se mover, quando a coloração característica delas passa a castanho e quando deixam de responder ao toque cuidadoso com uma pinça. Os resultados são a combinação de três experiências independentes.

Por último, determinou-se a quantidade de transcritos de alguns genes ligados à virulência em *B. cenocepacia* e *B. cenocepacia* K56-2 Δrrn. Os genes eleitos para este procedimento experimental foram alguns dos recentemente descritos por Mil-Homens e seus colaboradores (2010), BCAM0218, 0219, 0223 e 0224, e o marcador de estirpes epidémicas de *Burkholderia cepacia* (BCESM). Para todos os genes do agregado de adesinas, descrito anteriormente, a estirpe mutante apresenta os genes associados a virulência subexpressos na estirpe mutante. O BCESM apresenta um aumento da expressão na estirpe mutante comparativamente a estirpe selvagem, no entanto, é de referir o elevado desvio padrão apresentado para esse ensaio que pode conduzir a um falso aumento de expressão registado.



**Figura 17. Expressão de genes associados à virulência em *B. cenocepacia* K56-2 e *B. cenocepacia* K56-2  $\Delta$ rrn.** Os níveis do gene *rrn*, foram determinados recorrendo a iniciadores de oligonucleótidos específicos para cada gene, apresentados na Tabela 4 do capítulo Material e Métodos e recorrendo ao RT-PCR, avaliado pela aplicação do método  $\Delta\Delta$ Ct. As barras apresentadas em cada ponto representam o desvio padrão.

Alguns estudos demonstram que a RNase R está envolvida na patogenicidade de alguns organismos como *S. flexneri*, algumas estirpes de *E. coli* e em *A. hydrophila*. Demonstrou-se neste estudo que a RNase R tem um papel importante na infecção de *B.cenocepacia*.

O amplo espectro de doenças bacterianas é impressionante e pode ser explicada pela habilidade dos patogénicos em modificar adequadamente a expressão genética em resposta aos estímulos ambientais e no controlo de factores de virulência por reguladores transcricionais. A RNase R poderá eventualmente ser um desses reguladores que pode modular a virulência bacteriana.

No que diz respeito ao conjunto de genes associados a virulência, estudados neste trabalho, não é surpreendente que apresentem menor expressão na estirpe mutante, já que esta é menos virulenta. É possível que a RNase R tenha uma função de controlo do mRNA destes genes. A importância deste agregado na virulência parece evidente e sem dúvida que merecem uma forte atenção a fim de compreender detalhadamente a sua rede de acção e o papel da RNase R nestes.

Será importante no futuro avaliar a rede de genes virulentos sobre os quais a RNase R possivelmente actua, de modo directo ou indirecto.



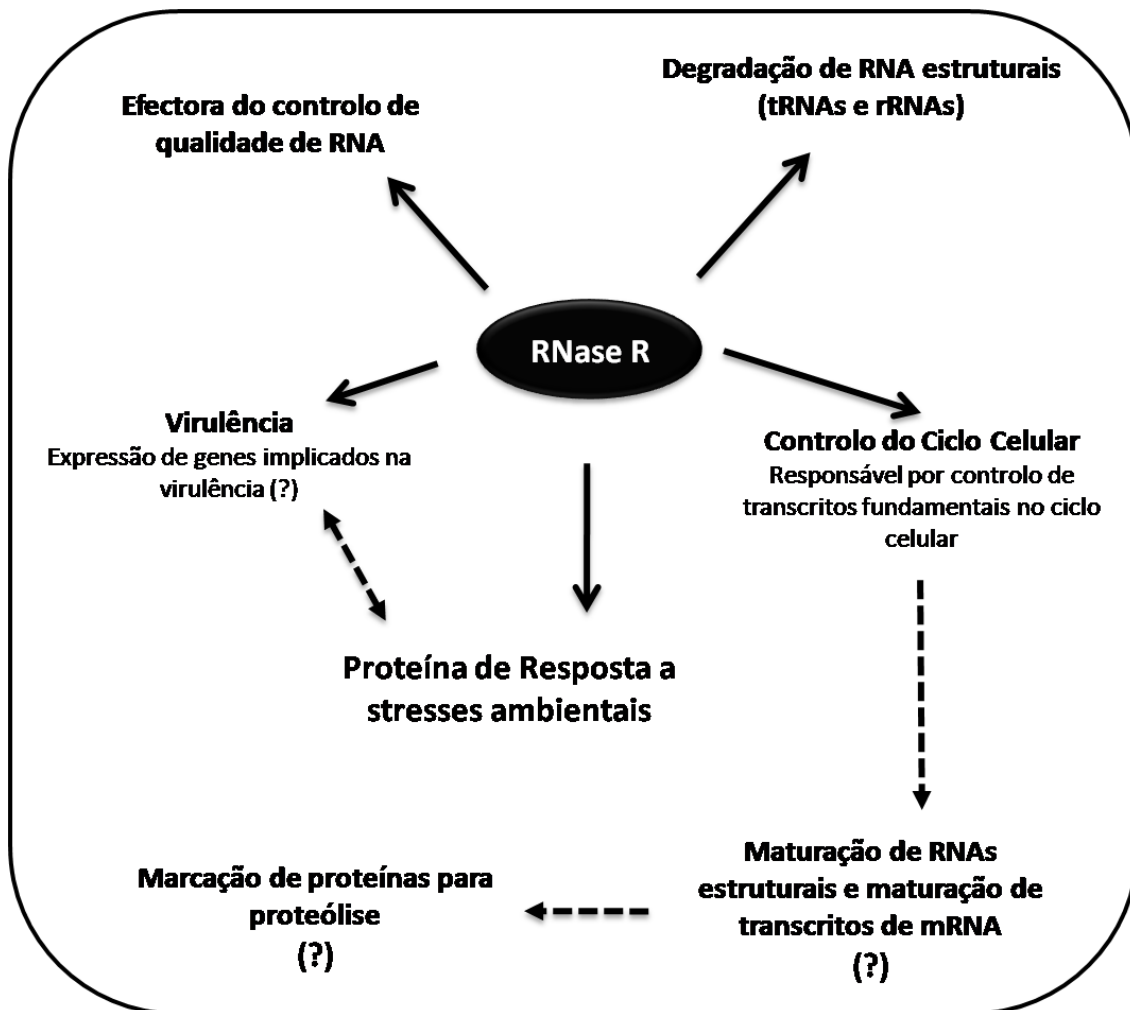
## 6. Conclusões

---

As bactérias são colonizadoras ubíquas e estão frequentemente sujeitas a variados estímulos externos. Apesar disto, é claro o sucesso evolutivo destes organismos e por isso a resposta adaptativa às variações ambientais constantes tem de ser rápida e eficaz de forma a garantir a sua sobrevivência. Fica claro neste estudo, o papel da RNase R nestes mecanismos de adaptação. Não é claro se o mecanismo de resposta a diferentes condições de stresse estudadas é único e portanto comum entre todos ou se resulta de vários mecanismos distintos. Contudo, as diferenças na quantidade de transcrito *rnr* entre cada uma das respostas sugere que será uma resposta múltipla e devida à activação de vários mecanismos. Será importante no futuro compreender mais detalhadamente o mecanismo ou os mecanismos subjacentes ao aumento de *rnr* a diferentes estímulos ambientais.

O problema crescente da resistência a antibióticos em *B.cenocepacia* conduz a uma necessidade de investigação de novos alvos terapêuticos. Este estudo demonstra o potencial terapêutico da RNase R, não só pela diminuição da virulência de *B.cenocepacia*, na ausência da proteína, como também pela sua importância na correcta divisão celular. As proteínas com funções no ciclo celular são importantes alvos para terapêuticos antibacterianos. As dificuldades de divisão pela ausência desta proteína e a dificuldade de formação de c.f.u., destaca a importância desta proteína no equilíbrio metabólico deste organismo. Contudo, é preciso mais estudos sobre as vias de divisão celular em que esta proteína intervém e compreender de que forma a bactéria, aparentemente compensa a falta desta, retomando um ciclo celular normal. Na **Figura 18** encontra-se um resumo esquemático do envolvimento da RNase R em diversos processos biológicos de *B.cenocepacia*.

Até à data não existe qualquer estudo da importância das RNases em *B.cenocepacia*, sendo este pioneiro nesta área, bem como no potencial terapêutico desta proteína para o combate das infecções por Bcc, pela sua acção na virulência e ciclo celular.



**Figura 17. Representação esquemática do envolvimento da RNase R em diversos processos biológicos de *B.cenocepacia*.** A RNase R está implicada no controlo de qualidade do RNA e degradação de RNAs estruturais. O papel da RNase R na maturação de SsrA/tmRNA e na maturação dos transcritos *ftsQAZ*, pode ser fundamental para um correcto ciclo celular e para a capacidade de formação de colónias. O papel de maturação neste transcritos pode implicar, indirectamente, problemas na biogénese de ribossomas e libertação de ribossomas bloqueados e, conseqüentemente, problemas na tradução. A RNase R assume ainda importância na resposta a diferentes stresses como ao frio e à rifampicina. A RNase R desempenha também um importante papel na virulência, provavelmente pela sua acção directa ou indirecta na expressão de genes de virulência. Este esquema tem por base um anteriormente descrito por Cairrão *et al* (2005).

## 7. Materiais e Metodologias

---

## Sequências de ácidos nucleicos e aminoácidos

A sequência do putativo gene codificante da proteína RNaseR de *B. Cenocepacia* J2315 foi recolhida do *Welcome Trust Sanger Institute* ([http://www.sanger.ac.uk/Projects/B\\_cenocepacia/](http://www.sanger.ac.uk/Projects/B_cenocepacia/)). A sequência de aminoácidos necessárias das espécies *Shigella flexneri*, *Aeromonas hydrophila*, *Brucella abortus* e *Caulobacter crescentus* foi obtida a partir do banco de genes NCBI. A determinação de homologia entre sequências foi obtida com o recurso a programas BLAST. As sequências de aminoácidos foram alinhadas recorrendo ao *Clustal W* disponível na internet na responsabilidade do Instituto da Bioinformática Europeu.

## Estirpes Bacterianas e condições de crescimento

As estirpes utilizadas foram *B. cenocepacia* K56-2 e *E.coli* XL1-Blue. As bactérias foram cultivadas em meio *Luria-Bertani* (LB), com agitação orbital de 250 r.p.m., a 37°C. Quando apropriado o meio foi suplementado com 150 µg. ml<sup>-1</sup> de ampicilina - amp, (*E.coli* XL1-Blue) ou 150 µg.ml<sup>-1</sup> trimetopim - tp (*B. cenocepacia* K56-2 com eliminação de *rnr*). Os ensaios que mimetizam o ambiente pulmonar foram realizados em LB com 300mM de NaCl e 10mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, com uma agitação de 60 r.p.m. e em condições de microaerofilia como descrito em Mil-Homens 2010 (Mil-Homens *et al.*, 2010). Nos ensaios de choque a frio as culturas foram transferidas de 37°C para os 15°C nos tempos descritos.

## Plasmídeos e oligonucleótidos

A lista de plasmídeos usados e construídos durante este trabalho estão representados na **Tabela 3** e a lista de Oligonucleotidos usados nas amplificações por PCR e por RT-PCR são apresentadas na seguinte **Tabela 4**. Os iniciadores de oligonucleótidos foram desenhados com base na sequencia genómica de *B.cenocepacia* J2315.

**Tabela 3.** Plasmídeos utilizados neste trabalho

Plasmídeo	Descrição	Fonte
pUC-TP	Derivado de pUC-GM com gene de resistência a Tp (Tp <sup>r</sup> -1,1Kb)	(Sokol <i>et al.</i> , 1999)
pDrive	Vector de clonagem, Amp <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>	Qiagen
pDrive-rnr	Vector de clonagem pDrive com o gene <i>rnr</i>	Neste trabalho
pDrive-rnr/Tp	Vector de clonagem pDrive com o gene <i>rnr</i> interrompido pelo Tp <sup>r</sup>	Neste trabalho

**Tabela 4.** Oligonucleótidos utilizados para a amplificação por PCR. Nesta tabelas as abreviaturas A,C,G,T significam respectivamente Adenina, Citosina, Guanina e Timina.

Nome do Oligonucleótido	Sequência (5' – 3')
Fr1553Fwd (1)	CGCGGATCCAGCAAATATCCGTACCCCATCCG
Fr1553Rev (2)	CCCAAGCTTTGAAGTGCGCGTATGCCTCGTA
Tp-EcoRI Fwd	CCGGAATTCAGGTCGACTCTAGAGGATCTGGA
Tp-EcoRV Rev	TTTTTGATATCACCATGATTACGCCAAGCTTGC
RT1553 Fwd	CGACACGACCGAGACCTACA
RT1553 Rev	GCATTCTCGATCAGCTTGTG
RTBCESMFwd	GGCACAACGCGGAAAGTACA
RTBCESMRev	TCGGAGTCGAGCACAAGCT
RT0218Fwd	CGGCGATCTGAAGGTTGCA
RT0218Rev	AGCGCTAGTGCTTCGATCGA
RT0219Fwd	TCTCGGGTACGCGATTGAC
RT0219Rev	TGTTATACAGCTGAAACGACCTTACG
RT0223Fwd	GCAATCGGCCGGAATC
RT0223Rev	TCGTCTATGCCTCGGTCCAT
RT0224Fwd	TCACGAGGCGAATTGTCAAC
RT0224Rev	GAGACGTTACGACATCCGTATC
RTSigAFwd	GCGGATGCGTTTCGGTAT
RTSigARev	GCGTGACGTCGAACTGCTT
BCAL1553Fwd	TTGAGCAAATATCCGTACCCCA
BCAL1553Rev	CGGCGTCTCTCGATACTGC

## Clonagem do gene *rnr* e construção do mutante

Um fragmento de 1672 pb do gene *rnr* foi amplificado a partir do DNA genómico de *B.cenocepacia* K56-2 e amplificado por PCR recorrendo aos iniciadores de oligonucleótidos Fr1553Fwr e Fr1553Rev (**Tabela 4**), contendo os locais de restrição *Bam*HI e *Hind*III, respectivamente. Este fragmento foi clonado dentro do vector suicida pDrive (Quiagen), denominado de pDrive-rnr. A cassette de resistência ao trimetropim foi amplificada a partir do plasmideo pUC-Tp com Tp-EcoRIFwd e Tp-EcoRVRev e clonado em pDrive-rnr com os locais de restrição EcoRI e EcoRV originando o plasmideo denominado de pDrive-rnr/Tp. Transformou-se *B.cenocepacia* com este plasmideo e os transformantes foram seleccionados por crescimento em LB sólido (agar) suplementados com 150mg ml<sup>-1</sup> de trimetropin. Para distinguir entre mutantes *crossover* simples ou duplo as colónias foram inoculadas em réplica para sensibilidade à canamicina. O candidato a mutante com inserção foi posteriormente caracterizado por PCR recorrendo aos iniciadores BCAL1553Fwd e BCAL1553Rev, permitindo identificar o clone mutante de *B.cenocepacia* k56-2, denominado aqui de *B.cenocepacia* k562- $\Delta$ rnr.

## Análise estatística

Os testes de significância para os diversos procedimentos experimentais foram realizados recorrendo à análise da variância (ANOVA). A validação dos pressupostos que o teste ANOVA implica foi efectuada com o recurso ao Teste de *Kolmogorov-Smirnov* (análise da distribuição normal) e pelo *Teste de Levene* (Análise da homogeneidade da amostra). Um valor de  $P < 0,05$  foi considerado como significativo. Todos estes testes foram realizados recorrendo ao programa informático *Minitab 15* (*Minitab*). As curvas de sobrevivência de *Kaplan-Meier* para as infecções de *G.mellonella* foram realizadas recorrendo ao software XLSTAT-Life (*Microsoft*). A comparação das curvas de sobrevivência de *Kaplan-Meier* foram realizadas recorrendo ao mesmo software e recorrendo ao teste estatístico *Log-Rank*.

## **Manipulação de DNA e técnicas associadas**

O DNA total foi purificado usando o *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Quiagen), de acordo com o protocolo do fabricante. As reacções de amplificação por PCR foram realizadas num volume de 50µl, cada uma contendo 100ng de DNA complementar, 0,2 mM de cada primer, 0,2mM de cada nucleótido trifosfato, 1,5mM MgSO<sub>4</sub>, 2,5U de *DNA polimerase Taq citomed* (Invitrogen), 1x de tampão de amplificação. As amplificações foram realizadas com desnaturação inicial a 95°C durante 2 minutos seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 95°C para desnaturação, mais 30 segundos à temperatura de emparelhamento óptimo dos oligonucleótidos e com o tempo de extensão adequado para cada produto, com mais uma extensão final de 7 minutos a 72°C. As temperaturas de emparelhamento e os tempos de extensão foram optimizadas para cada conjunto de oligonucleótidos e fragmentos de DNA. O DNA plasmídico foi extraído recorrendo a *Quiaprep Spin Miniprep kit* (QIAGEN), de acordo com as instruções do fabricante.

## **Determinação de unidades formadoras de colónias**

As unidades formadoras de colónias foram obtidas com diluições sucessivas de células em crescimento em meio líquido e plaqueadas nas placas de LB adequadas e contabilizadas passadas 48Horas.

## **Biofilmes**

A formação de biofilmes foi obtida pelo inóculo de uma densidade óptica (640nm) de 0,2 em microplacas de poliestireno, de pré-inóculos crescidos 4h e 17h. Após 24h e 48h de incubação as células não aderentes foram removidas e as bactérias aderentes foram fixadas em formaldeído durante 20 minutos e coradas com violeta de cristal 1%(w/V) durante dez minutos. De seguida foram lavadas com TBS e o violeta cristal fixado foi dissolvido em etanol a 95%. A absorvância foi media a 595nm. A experiência foi repetida 3 vezes de forma independente.



## Reacções de PCR em tempo-real

A estirpe mutante e selvagem foram crescidas em meio LB e o RNA total foi obtido, por células em crescimento e recolhidas nos tempos pretendidos, recorrendo ao RNeasy mini Kit (Qiagen) seguindo as instruções do protocolo do fabricante. O cDNA foi sintetizado a partir de 150ng de RNA em 10ml de mistura contendo 2,5mM de hexameros aleatórios, tampão de amplificação de PCR, 500mM de desoxinucleótidos trifosfatados, 0,4 unidades de inibidor de RNase por cada mL, 1,25 unidade de transcriptase reversa por cada mL (*Applied Biosystems, Roche*). cDNA (25ng) foi utilizado para realizar os ensaio de PCR quantitativo em tempo real como o sistema de PCR em tempo real Applied Biosystems 7500 e utilizados a mistura de reagentes *SYBR green master* como os diferentes oligonucleótidos assinalados com RT na **Tabela 4**. As curvas de *melting* foram realizadas em triplicado para cada ensaio e para cada gene. O gene endógeno utilizado foi o factor sigma- sigA (BCAL0918). A quantificação relativa dói utilizada recorrendo ao método  $\Delta\Delta Ct$ .

## Fluorescência com DAPI

As células foram fixadas à chama e colocou-se uma gota de uma solução mãe de DAPI a 1mg/ml, diluída em água de 1:500. As observações foram feitas recorrendo a um filtro de excitação e emissão de radiação adequado a este fluorocromo.

## Ensaio de mobilidade celular

A estirpe selvagem e mutante foram inoculadas (3  $\mu$ l) em placas quadradas contendo 50 ml de meio sólido *Swimming* e *Swarming*. As placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas e os diâmetros foram medidos e fotografados. O meio sólido de *Swarming* é constituído por LB suplementado com 0,5% (wt/v) de agar e 5g/L glucose. O meio *Swimming* é constituído por 10g/L de triptona, 5g/L NaCl e 0,3% /wt/v) de agar.

## Ensaio de infecção *Galleria mellonella*

As culturas de *B. cenocepacia* k56-2 e a estirpe mutante *B. cenocepacia* K56-2  $\Delta rnr$  cresceram 4 horas a 37°C com 250 r.p.m., com uma densidade óptica inicial de 0,1. As células foram depois recolhidas e diluídas sucessivamente numa razão 1:10 iniciada em  $1 \times 10^6$  até obter  $1 \times 10^4$  células em 10 mM MgSO<sub>4</sub> com 1,2 mg de ampicilina ml<sup>-1</sup>. Um micrómetro foi adaptado para controlar o volume de injeção de uma microseringa. Este aparelho foi usado para injectar aliquotas de 3,5 µl no lado esquerdo do último segmento (sentido anteroposterior) de *G. mellonella*. O grupo controlo foi injectado com a solução de MgSO<sub>4</sub> com ampicilina. Dada a injeção as larvas foram guardadas em caixas de *petri* no escuro a 37°C. A sobrevivência foi acompanhada em intervalos de 24 horas até 72 horas.

## 8. Agradecimentos

---

O desenvolver de um projecto científico só é possível de concretizar com a partilha de ideias entre várias pessoas. Esta tese não é excepção.

Por isto agradeço aos meus colegas e amigos do Grupo de Ciências Biológicas do IBB, que de uma forma subtil me deixaram absorver os seus conhecimentos, deram conselhos e ajudaram-me a clarificar as minhas ideias em muitas conversas. Destaco especialmente a Dalila Mil-Homens que me transmitiu inúmeros dos seus conhecimentos. Tenho a certeza que sem ela não teria conseguido realizar este projecto, ou pelo menos com a qualidade com que o consegui. Destaco ainda o Nuno Bernardes e a Sofia Ferreira por se terem mostrado sempre disponíveis para ajudar.

Agradeço também ao Professor Arsénio Fialho por me ter deixado integrar a sua equipa e por toda a sua ajuda e orientação no decorrer deste projecto. Agradeço ainda à Professora Cecília Arraiano por todo o seu suporte e partilha de conhecimento.

Um obrigado às pessoas que me ajudaram ao reler os rascunhos dos capítulos e ao tecerem comentários sobre eles. Os seus conselhos foram dispendiosos para eles, em termos de tempo, mas foram extremamente valiosos para mim.

Agradeço ao Bruno Ricardo por me ter permitido utilizar citações do seu testemunho na minha dissertação.

Não posso de deixar ainda de agradecer, de uma forma muito especial, à Professora Deodália Dias que tem vindo a acompanhar o meu progresso nos últimos anos do qual muito do sucesso que o caracteriza a ela lhe devo, por muitos diálogos científicos e outros não tão científicos. Agradeço-lhe a disponibilidade em me ajudar, qualquer que fosse ou seja a circunstância.

Não posso ainda deixar de referir o papel fundamental da Fundação para a Ciência e Tecnologia que financiaram este projecto.

**Por último, obrigado à minha família e amigos,  
que me fazem sorrir quando choro e sentir-me vivo,  
quando já não o sinto.**

## 9. Referências

---

- Aaron, S. D., Ferris, W., Henry, D. A., Speert, D. P. & Macdonald, N. E. (2000).** Multiple combination bactericidal antibiotic testing for patients with cystic fibrosis infected with *Burkholderia cepacia*. *Am J Respir Crit Care Med* **161**, 1206-1212.
- Agodi, A., Mahenthiralingam, E., Barchitta, M., Giannino, V., Sciacca, A. & Stefani, S. (2001).** *Burkholderia cepacia* complex infection in Italian patients with cystic fibrosis: Prevalence, epidemiology, and genomovar status. *J Clin Microbiol* **39**, 2891-2896.
- Albrecht, M., Wang, W., Shamova, O., Lehrer, R. & Schiller, N. (2002).** Binding of protegrin-1 to *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Respir Res* **3**, 18.
- Andrade, J. M., Pobre, V., Silva, I. J., Domingues, S. & Arraiano, C. M. (2009).** The Role of 3'-5' Exoribonucleases in RNA Degradation. In *Molecular Biology of Rna Processing and Decay in Prokaryotes*, pp. 187-229. San Diego: Elsevier Academic Press Inc.
- Aubert, D. F., Flannagan, R. S. & Valvano, M. A. (2008).** A novel sensor kinase-response regulator hybrid controls biofilm formation and type VI secretion system activity in *Burkholderia cenocepacia*. *Infect Immun* **76**, 1979-1991.
- Baldwin, A., Sokol, P. A., Parkhill, J. & Mahenthiralingam, E. (2004).** The *Burkholderia cepacia* epidemic strain marker is part of a novel genomic island encoding both virulence and metabolism-associated genes in *Burkholderia cenocepacia*. *Infect Immun* **72**, 1537 - 1547.
- Baldwin, A., Mahenthiralingam, E., Drevinek, P. & other authors (2007).** Environmental *Burkholderia cepacia* complex isolates in human infections. *Emerg Infect Dis* **13**, 458-461.
- Barbas, A., Matos, R. G., Amblar, M., Lopez-Vinas, E., Gomez-Puertas, P. & Arraiano, C. M. (2008).** New insights into the mechanism of RNA degradation by ribonuclease II - Identification of the residue responsible for setting the RNase II end product. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 13070-13076.
- Barnard, A. M. L. & Salmond, G. P. C. (2004).** Quorum Sensing: The Complexities of Chemical Communication between Bacteria. *Complexus* **2**, 87-101.
- Brackman, G., Hillaert, U., Van Calenbergh, S., Nelis, H. J. & Coenye, T. (2009).** Use of quorum sensing inhibitors to interfere with biofilm formation and development in *Burkholderia multivorans* and *Burkholderia cenocepacia*. *Res Microbiol* **160**, 144-151.
- Buddelmeijer, N. & Beckwith, J. (2002).** Assembly of cell division proteins at the E-coli cell center. *Curr Opin Microbiol* **5**, 553-557.

- Burkholder, W. H. (1950).** Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopathology* **40**, 115-117.
- Bylund, J., Burgess, L.-A., Cescutti, P., Ernst, R. K. & Speert, D. P. (2006).** Exopolysaccharides from *Burkholderia cenocepacia* inhibit neutrophil chemotaxis and scavenge reactive oxygen species. *J Biol Chem* **281**, 2526-2532.
- Caballero-Mellado, J., Onofre-Lemus, J., Estrada-de los Santos, P. & Martinez-Aguilar, L. (2007).** The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. *Appl Environ Microbiol* **73**, 5308-5319.
- Cairrão, F., Cruz, A., Mori, H. & Arraiano, C. M. (2003).** Cold shock induction of RNase R and its role in the maturation of the quality control mediator SsrA/tmRNA. *Mol Microbiol* **50**, 1349-1360.
- Cérantola, S. & Montrozier, H. (1997).** Structural elucidation of two polysaccharides present in the lipopolysaccharide of a clinical isolate of *Burkholderia cepacia*. *Eur J Biochem* **246**, 360-366.
- Cervin, M. A., Simpson, D. A., Smith, A. L. & Lory, S. (1994).** Differences in eucaryotic cell binding of *Pseudomonas*. *Microb Pathog* **17**, 291-299.
- Cescutti, P., Impallomeni, G., Garozzo, D., Sturiale, L., Herasimenka, Y., Lagatolla, C. & Rizzo, R. (2003).** Exopolysaccharides produced by a clinical strain of *Burkholderia cepacia* isolated from a cystic fibrosis patient. *Carbohydr Res* **338**, 2687-2695.
- Chen, C. & Deutscher, M. P. (2005).** Elevation of RNase R in Response to Multiple Stress Conditions. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 34393-34396.
- Chen, C. L. & Deutscher, M. P. (2010).** RNase R is a highly unstable protein regulated by growth phase and stress. *Rna-a Publication of the Rna Society* **16**, 667-672.
- Chen, K., Sun, G. W., Chua, K. L. & Gan, Y. H. (2005).** Modified virulence of antibiotic-induced *Burkholderia pseudomallei* filaments. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**, 1002-1009.
- Cheng, Z. F., Zuo, Y. H., Li, Z. W., Rudd, K. E. & Deutscher, M. P. (1998).** The vacB gene required for virulence in *Shigella flexneri* and *Escherichia coli* encodes the exoribonuclease RNase R. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 14077-14080.
- Cheng, Z. F. & Deutscher, M. P. (2002).** Purification and characterization of the *Escherichia coli* exoribonuclease RNase R - Comparison with RNase II. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 21624-21629.

**Chiarini, L., Cescutti, P., Drigo, L. & other authors (2004).** Exopolysaccharides produced by *Burkholderia cenocepacia* *recA* lineages IIIA and IIIB. *J Cyst Fibros* **3**, 165-172.

**Chiarini, L., Bevivino, A., Dalmastrì, C., Tabacchioni, S. & Visca, P. (2006).** *Burkholderia cepacia* complex species: health hazards and biotechnological potential. *Trends Microbiol* **14**, 277-286.

**Chung, J. W. & Speert, D. P. (2007).** Proteomic identification and characterization of bacterial factors associated with *Burkholderia cenocepacia* survival in a murine host. *Microbiology* **153**, 206-214.

**Coenye & LiPuma, J. J. (2003).** Molecular epidemiology of *Burkholderia* species. *Front Biosci* **8**, e55 - 67.

**Coenye, T., LiPuma, J. J., Henry, D., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Gillis, M., Speert, D. P. & Vandamme, P. (2001a).** *Burkholderia cepacia* genomovar VI, a new member of the *Burkholderia cepacia* complex isolated from cystic fibrosis patients. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 271-279.

**Coenye, T., Mahenthiralingam, E., Henry, D., LiPuma, J. J., Laevens, S., Gillis, M., Speert, D. P. & Vandamme, P. (2001b).** *Burkholderia ambifaria* sp. nov., a novel member of the *Burkholderia cepacia* complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 1481-1490.

**Coenye, T., Vandamme, P., Govan, J. R. W. & LiPuma, J. J. (2001c).** Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol* **39**, 3427-3436.

**Coenye, T. & Vandamme, P. (2003).** Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ Microbiol* **5**, 719-729.

**Collins, F. S. (1992).** CYSTIC-FIBROSIS - MOLECULAR-BIOLOGY AND THERAPEUTIC IMPLICATIONS. *Science* **256**, 774-779.

**Condon, C. (2007).** Maturation and degradation of RNA in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **10**, 271-278.

**Conway, B.-A. D., Venu, V. & Speert, D. P. (2002).** Biofilm formation and acyl homoserine lactone production in the *Burkholderia cepacia* complex. *J Bacteriol* **184**, 5678-5685.

**Conway, B.-A. D., Chu, Karen K., Bylund, J., Altman, E. & Speert, D. P. (2004).** Production of exopolysaccharide by *Burkholderia cenocepacia* results in altered cell-surface interactions and altered bacterial clearance in mice. *J Infect Dis* **190**, 957-966.

**Corbett, C. R., Burtnick, M. N., Kooi, C., Woods, D. E. & Sokol, P. A. (2003).** An extracellular zinc metalloprotease gene of *Burkholderia cepacia*. *Microbiology* **149**, 2263-2271.

**Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. (1999).** Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* **284**, 1318-1322.

**Cunha, M. V., Sousa, S. A., Leitão, J. H., Moreira, L. M., Videira, P. A. & Sá-Correia, I. (2004).** Studies on the involvement of the exopolysaccharide produced by cystic fibrosis-associated isolates of the *Burkholderia cepacia* complex in biofilm formation and in persistence of respiratory infections. *J Clin Microbiol* **42**, 3052-3058.

**Cystic Fibrosis Foundation (2010).** <http://www.cff.org/AboutCF/>.

**Darling, P., Chan, M., Cox, A. D. & Sokol, P. A. (1998).** Siderophore production by cystic fibrosis isolates of *Burkholderia cepacia*. *Infect Immun* **66**, 874 - 877.

**Dautin, N. & Bernstein, H. D. (2007).** Protein secretion in Gram-negative bacteria via the autotransporter pathway. *Annu Rev Microbiol* **61**, 89-112.

**Dunne, W. M. (2002).** Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev* **15**, 155-+.

**Eaves-Pyles, T., Murthy, K., Liaudet, L., Virag, L., Ross, G., Soriano, F. G., Szabo, C. & Salzman, A. L. (2001).** Flagellin, a novel mediator of *Salmonella*-induced epithelial activation and systemic inflammation:  $\kappa$ B $\alpha$  degradation, induction of nitric oxide synthase, induction of proinflammatory mediators, and cardiovascular dysfunction. *J Immunol* **166**, 1248-1260.

**Eriksson, S., Hurme, R. & Rhen, M. (2002).** Low-temperature sensors in bacteria. *Philos Trans R Soc Lond Ser B-Biol Sci* **357**, 887-893.

**Frangolias, D. D., Mahenthiralingam, E., Rae, S., Raboud, J. M., Davidson, A. G. F., Wittmann, R. & Wilcox, P. G. (1999).** *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis: variable disease course. *Am J Respir Crit Care Med* **160**, 1572-1577.

**Fraza, C., McVey, C. E., Amblar, M., Barbas, A., Vornhein, C., Arraiano, C. M. & Carrondo, M. A. (2006).** Unravelling the dynamics of RNA degradation by ribonuclease II and its RNA-bound complex. *Nature* **443**, 110-114.

**Freitas, M. & Costa, M. (1997).** Pneumologia na prática clínica. *Clinica de Pneumologia* **3<sup>a</sup> Ed.**

**Fux, C. A., Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Stoodley, P. (2005).** Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol* **13**, 34-40.

**Giangrossi, M., Giuliodori, A. M., Gualerzi, C. O. & Pon, C. L. (2002).** Selective expression of the beta-subunit of nucleoid-associated protein HU during cold shock in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **44**, 205-216.

**Gingues, S., Kooi, C., Visser, M. B., Subsin, B. & Sokol, P. A. (2005).** Distribution and expression of the ZmpA metalloprotease in the *Burkholderia cepacia* complex. *J Bacteriol* **187**, 8247-8255.

**Godoy, D., Randle, G., Simpson, A. J., Aanensen, D. M., Pitt, T. L., Kinoshita, R. & Spratt, B. G. (2003).** Multilocus sequence typing and evolutionary relationships among the causative agents of melioidosis and glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *J Clin Microbiol* **41**, 2068-2079.

**Govan, J. R. W., Doherty, C. J., Nelson, J. W., Brown, P. H., Greening, A. P., Maddison, J., Dodd, M. & Webb, A. K. (1993).** Evidence for transmission of *Pseudomonas cepacia* by social contact in cystic fibrosis. *The Lancet* **342**, 15-19.

**Govan, J. R. W. & Deretic, V. (1996).** Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* **60**, 539 - 574.

**Hassett, D. J., Sutton, M. D., Schurr, M. J., Herr, A. B., Caldwell, C. C. & Matu, J. O. (2009).** *Pseudomonas aeruginosa* hypoxic or anaerobic biofilm infections within cystic fibrosis airways. *Trends Microbiol* **17**, 130-138.

**Herasimenka, Y., Benincasa, M., Mattiuzzo, M., Cescutti, P., Gennaro, R. & Rizzo, R. (2005).** Interaction of antimicrobial peptides with bacterial polysaccharides from lung pathogens. *Peptides* **26**, 1127-1132.

**Herasimenka, Y., Cescutti, P., Impallomeni, G., Campana, S., Taccetti, G., Ravenni, N., Zanetti, F. & Rizzo, R. (2007).** Exopolysaccharides produced by clinical strains belonging to the *Burkholderia cepacia* complex. *J Cyst Fibros* **6**, 145-152.

**Hoffmann, N., Lee, B., Hentzer, M., Rasmussen, T. B., Song, Z., Johansen, H. K., Givskov, M. & Hoiby, N. (2007).** Azithromycin blocks quorum sensing and alginate polymer formation and increases the sensitivity to serum and stationary-growth-phase killing of *Pseudomonas aeruginosa* and attenuates chronic *P. aeruginosa* lung infection in Cftr/Mice. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 3677-3687.

**Hong, S. J., Tran, Q. A. & Keiler, K. C. (2005).** Cell cycle-regulated degradation of tmRNA is controlled by RNase R and SmpB. *Mol Microbiol* **57**, 565-575.

**Huber, B., Riedel, K., Hentzer, M., Heydorn, A., Gotschlich, A., Givskov, M., Molin, S. & Eberl, L. (2001).** The *cep* quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. *Microbiology* **147**, 2517-2528.



**Hughes, J. E., Stewart, J., Barclay, G. R. & Govan, J. R. (1997).** Priming of neutrophil respiratory burst activity by lipopolysaccharide from *Burkholderia cepacia*. *Infect Immun* **65**, 4281-4287.

**Hutchison, M. L., Poxton, I. R. & Govan, J. R. W. (1998).** *Burkholderia cepacia* produces a hemolysin that is capable of inducing apoptosis and degranulation of mammalian phagocytes. *Infect Immun* **66**, 2033-2039.

**Hyde, S. C., Emsley, P., Hartshorn, M. J. & other authors (1990).** STRUCTURAL MODEL OF ATP-BINDING PROTEINS ASSOCIATED WITH CYSTIC-FIBROSIS, MULTIDRUG RESISTANCE AND BACTERIAL TRANSPORT. *Nature* **346**, 362-365.

**Inoue, T., Shingaki, R. & Fukui, K. (2008).** Inhibition of swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* by branched-chain fatty acids. *FEMS Microbiol Lett* **281**, 81-86.

**Jain, C. (2009).** Identification and Characterization of Growth Suppressors of *Escherichia coli* Strains Lacking Phosphorolytic Ribonucleases. *J Bacteriol* **191**, 5622-5627.

**Jarrell, K. F. & McBride, M. J. (2008).** The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nat Rev Microbiol* **6**, 466-476.

**Johnston, R. B. (2001).** Clinical aspects of chronic granulomatous disease. *Curr Opin Hematol* **8**, 17-22.

**Juhas, M., Crook, D. W., Dimopoulou, I. D., Lunter, G., Harding, R. M., Ferguson, D. J. P. & Hood, D. W. (2007).** Novel type IV secretion system involved in propagation of genomic islands. *J Bacteriol* **189**, 761-771.

**Karzai, A. W., Roche, E. D. & Sauer, R. T. (2000).** The SsrA-SmpB system for protein tagging, directed degradation and ribosome rescue. *Nat Struct Biol* **7**, 449-455.

**Karzai, A. W. & Sauer, R. T. (2001).** Protein factors associated with the SsrA center dot SmpB tagging and ribosome rescue complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3040-3044.

**Kerem, B. S., Rommens, J. M., Buchanan, J. A., Markiewicz, D., Cox, T. K., Chakravarti, A., Buchwald, M. & Tsui, L. C. (1989).** IDENTIFICATION OF THE CYSTIC-FIBROSIS GENE - GENETIC-ANALYSIS. *Science* **245**, 1073-1080.

**Kooi, C., Subsin, B., Chen, R., Pohorelic, B. & Sokol, P. A. (2006).** *Burkholderia cenocepacia* ZmpB is a broad-specificity zinc metalloprotease involved in virulence. *Infect Immun* **74**, 4083-4093.

**Krivan, H. C., Ginsburg, V. & Roberts, D. D. (1988).** *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas cepacia* isolated from cystic fibrosis patients bind specifically to

gangliotetraosylceramide (asialo GM1) and gangliotriaosylceramide (asialo GM2). *Arch Biochem Biophys* **260**, 493-496.

**Lazdunski, A. M., Ventre, I. & Sturgis, J. N. (2004).** Regulatory circuits and communication in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Micro* **2**, 581-592.

**Lee, K., Bernstein, J. A. & Cohen, S. N. (2002).** RNase G complementation of me null mutation identifies functional interrelationships with RNase E in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **43**, 1445-1456.

**LiPuma, J. J., Spilker, T., Gill, L. H., Campbell, P. W., Liu, L. & Mahenthiralingam, E. (2001).** Disproportionate distribution of *Burkholderia cepacia* complex species and transmissibility markers in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **164**, 92 - 96.

**LiPuma, J. J. (2010).** The Changing Microbial Epidemiology in Cystic Fibrosis. *Clin Microbiol Rev* **23**, 299-+.

**Loureiro, P., Pacheco, P., Duarte, A., Albuquerque, C. & Lavinha, J. (1994).** Geografia genética e prevenção da fibrose quística em Portugal. *Arquivos do Instituto Nacional de saúde* **20-21**, 35-41.

**Lyczak, J. B., Cannon, C. L. & Pier, G. B. (2002).** Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* **15**, 194-222.

**Ma, D., Alberti, M., Lynch, C., Nikaido, H. & Hearst, J. E. (1996).** The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of *acrAB* genes of *Escherichia coli* by global stress signals. *Mol Microbiol* **19**, 101 - 112.

**Mahenthiralingam, Baldwin, A. & Dowson, C. G. (2008).** *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. *J Appl Microbiol* **104**, 1539-1551.

**Mahenthiralingam, E., Urban, T. A. & Goldberg, J. B. (2005a).** The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Nat Rev Micro* **3**, 144-156.

**Mahenthiralingam, E., Urban, T. A. & Goldberg, J. B. (2005b).** The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Nat Rev Microbiol* **3**, 144-156.

**Manno, G., Ugolotti, E., Belli, M. L., Fenu, M. L., Romano, L. & Cruciani, M. (2003).** Use of the E test to assess synergy of antibiotic combinations against isolates of *Burkholderia cepacia* complex from patients with cystic fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **22**, 28-34.

**Martinez-Aguilar, L., Diaz, R., Pena-Cabriales, J. J., Estrada-de los Santos, P., Dunn, M. F. & Caballero-Mellado, J. (2008).** Multichromosomal genome structure and confirmation of diazotrophy in novel plant-associated *Burkholderia* species. *Appl Environ Microbiol* **74**, 4574-4579.

**Mian, I. S. (1997).** Comparative sequence analysis of ribonucleases HII, III, II PH and D. *Nucleic Acids Res* **25**, 3187-3195.

**Mil-Homens, D., Rocha, E. P. C. & Fialho, A. M. (2010).** Genome-wide analysis of DNA repeats in *Burkholderia cenocepacia* J2315 identifies a novel adhesin-like gene unique to epidemic-associated strains of the ET-12 lineage. *Microbiology* **156**, 1084-1096.

**Miyoshi, A., Rosinha, G. M. S., Camargo, I., Trant, C. M. C., Cardoso, F. C., Azevedo, V. & Oliveira, S. C. (2007).** The role of the *vacB* gene in the pathogenesis of *Brucella abortus*. *Microbes Infect* **9**, 375-381.

**Nelson, J. W., Butler, S. L., Brown, P. H., Greening, A. P. & Govan, J. R. W. (1993).** Serum IgG and sputum IgA antibody to core lipopolysaccharide antigen from *Pseudomonas cepacia* in patients with cystic fibrosis. *J Med Microbiol* **39**, 39-47.

**O'Neil, K. M., Herman, J. H., Modlin, J. F., Moxon, E. R. & Winkelstein, J. A. (1986).** *Pseudomonas cepacia*: An emerging pathogen in chronic granulomatous disease. *J Pediatr* **108**, 940-942.

**O'Sullivan, L. A. & Mahenthalingam, E. (2005).** Biotechnological potential within the genus *Burkholderia*. *Lett Appl Microbiol* **41**, 8-11.

**O'Toole, G. A. & Kolter, R. (1998).** Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* **28**, 449-461.

**Parke, J. L. & Gurian-Sherman, D. (2001).** Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. *Annu Rev Phytopathol* **39**, 225-258.

**Pegues, D. A., Carson, L. A., Anderson, R. L., Norgard, M. J., Argent, T. A., Jarvis, W. R. & Woernle, C. H. (1993).** Outbreak of *Pseudomonas cepacia* bacteremia in oncology patients. *Clin Infect Dis* **16**, 407-411.

**Planells-Cases, R. & Jentsch, T. J. (2009).** Chloride channelopathies. *Biochim Biophys Acta* **1792**, 173-189.

**Rabkin, C. S., Jarvis, W. R., Anderson, R. L. & other authors (1989).** *Pseudomonas cepacia* typing systems: collaborative study to assess their potential in epidemiologic investigations. *Rev Infect Dis* **11**, 600-607.

**Rajyaguru, J. M. & Muszynski, M. J. (1997).** Association of resistance to trimethoprim/sulphamethoxazole, chloramphenicol and quinolones with changes in major outer membrane proteins and lipopolysaccharide in *Burkholderia cepacia*. *J Antimicrob Chemother* **40**, 803-809.

Rasmussen, T. B., Bjarnsholt, T., Skindersoe, M. E., Hentzer, M., Kristoffersen, P., Kote, M., Nielsen, J., Eberl, L. & Givskov, M. (2005a). Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. *J Bacteriol* **187**, 1799-1814.

Rasmussen, T. B., Skindersoe, M. E., Bjarnsholt, T. & other authors (2005b). Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species. *Microbiology* **151**, 1325-1340.

Rasmussen, T. B. & Givskov, M. (2006). Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *Int J Med Microbiol* **296**, 149-161.

Ratjen, F. & Doring, G. (2003). Cystic fibrosis. *Lancet* **361**, 681-689.

Richau, J. A., Leitão, J. H., Correia, M., Lito, L., Salgado, M. J., Barreto, C., Cescutti, P. & Sá-Correia, I. (2000). Molecular typing and exopolysaccharide biosynthesis of *Burkholderia cepacia* isolates from a Portuguese cystic fibrosis center. *J Clin Microbiol* **38**, 1651-1655.

Riedel, K., Kothe, M., Kramer, B., Saeb, W., Gotschlich, A., Ammendola, A. & Eberl, L. (2006). Computer-aided design of agents that inhibit the *cep* quorum-sensing system of *Burkholderia cenocepacia*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 318-323.

Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B. S. & other authors (1989). IDENTIFICATION OF THE CYSTIC-FIBROSIS GENE - CLONING AND CHARACTERIZATION OF COMPLEMENTARY-DNA. *Science* **245**, 1066-1072.

Rommens, J. M., Iannuzzi, M. C., Kerem, B. S. & other authors (1989). IDENTIFICATION OF THE CYSTIC-FIBROSIS GENE - CHROMOSOME WALKING AND JUMPING. *Science* **245**, 1059-1065.

Saiman, L., Cacalano, G. & Prince, A. (1990). *Pseudomonas cepacia* adherence to respiratory epithelial cells is enhanced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **58**, 2578-2584.

Sajjan, U. & Forstner, J. (1993). Role of a 22-kilodalton pilin protein in binding of *Pseudomonas cepacia* to buccal epithelial cells. *Infect Immun* **61**, 3156-3163.

Sajjan, U., Wu, Y., Kent, G. & Forstner, J. (2000). Preferential adherence of cable-piliated *Burkholderia cepacia* to respiratory epithelia of CF knockout mice and human cystic fibrosis lung explants. *J Med Microbiol* **49**, 875-885.

Sanger, Institute, *Burkholderia cenocepacia*, Sequencing & Project [http://www.sanger.ac.uk/b\\_cenocepacia](http://www.sanger.ac.uk/b_cenocepacia).

Seed, K. D. & Dennis, J. J. (2008). Development of *Galleria mellonella* as an alternative infection model for the *Burkholderia cepacia* Complex. *Infect Immun* **76**, 1267-1275.

**Sokol, P. A., Darling, P., Woods, D. E., Mahenthiralingam, E. & Kooi, C. (1999).** Role of ornibactin biosynthesis in the virulence of *Burkholderia cepacia*: Characterization of *pvdA*, the gene encoding L-ornithine N-5-oxygenase. *Infect Immun* **67**, 4443-4455.

**Speert, D. P. (2001).** Understanding *Burkholderia cepacia*: Epidemiology, genomovars, and virulence. *Infections in Medicine* **18**, 49-56.

**Takayama, K. & Kjelleberg, S. A. (2000).** The role of RNA stability during bacterial stress responses and starvation. *Environ Microbiol* **2**, 355-365.

**Tamura, M., Lee, K., Miller, C. A., Moore, C. J., Shirako, Y., Kobayashi, M. & Cohen, S. N. (2006).** RNase E maintenance of proper FtsZ/FtsA ratio required for nonfilamentous growth of *Escherichia coli* cells but not for colony-forming ability. *J Bacteriol* **188**, 5145-5152.

**Thomas, M. (2007).** Iron acquisition mechanisms of the *Burkholderia cepacia* complex. *BioMetals* **20**, 431-452.

**Tobe, T., Sasakawa, C., Okada, N., Honma, Y. & Yoshikawa, M. (1992).** VACB, A NOVEL CHROMOSOMAL GENE REQUIRED FOR EXPRESSION OF VIRULENCE GENES ON THE LARGE PLASMID OF SHIGELLA-FLEXNERI. *J Bacteriol* **174**, 6359-6367.

**Tomich, M., Herfst, C. A., Golden, J. W. & Mohr, C. D. (2002).** Role of flagella in host cell invasion by *Burkholderia cepacia*. *Infect Immun* **70**, 1799-1806.

**Uehlinger, S., Schwager, S., Bernier, S. P., Riedel, K., Nguyen, D. T., Sokol, P. A. & Eberl, L. (2009).** Identification of Specific and Universal Virulence Factors in *Burkholderia cenocepacia* Strains by Using Multiple Infection Hosts. *Infect Immun* **77**, 4102-4110.

**Urban, T. A., Griffith, A., Torok, A. M., Smolkin, M. E., Burns, J. L. & Goldberg, J. B. (2004).** Contribution of *Burkholderia cenocepacia* flagella to infectivity and inflammation. *Infect Immun* **72**, 5126-5134.

**Urban, T. A., Goldberg, J. B., Forstner, J. F. & Sajjan, U. S. (2005).** Cable Pili and the 22-kilodalton adhesin are required for *Burkholderia cenocepacia* binding to and transmigration across the squamous epithelium. *Infect Immun* **73**, 5426-5437.

**Vandamme, P., Holmes, B., Vancanneyt, M. & other authors (1997).** Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 1188-1200.

**Vandamme, P., Mahenthiralingam, E., Holmes, B., Coenye, T., Hoste, B., De Vos, P., Henry, D. & Speert, D. P. (2000).** Identification and population structure of *Burkholderia stabilis* sp. nov. (formerly *Burkholderia cepacia* Genomovar IV). *J Clin Microbiol* **38**, 1042-1047.

**Vandamme, P., Henry, D., Coenye, T., Nzula, S., Vancanneyt, M., LiPuma, J. J., Speert, D. P., Govan, J. R. W. & Mahenthiralingam, E. (2002).** *Burkholderia anthina* sp. nov. and *Burkholderia pyrrocinia*, two additional *Burkholderia cepacia* complex bacteria, may confound results of new molecular diagnostic tools. *FEMS Immunol Med Microbiol* **33**, 143-149.

**Vandamme, P., Holmes, B., Coenye, T., Goris, J., Mahenthiralingam, E., LiPuma, J. J. & Govan, J. R. W. (2003).** *Burkholderia cenocepacia* sp. nov.-a new twist to an old story. *Res Microbiol* **154**, 91-96.

**Vanlaere, E., LiPuma, J. J., Baldwin, A., Henry, D., De Brandt, E., Mahenthiralingam, E., Speert, D., Dowson, C. & Vandamme, P. (2008).** *Burkholderia latens* sp. nov., *Burkholderia diffusa* sp. nov., *Burkholderia arboris* sp. nov., *Burkholderia seminalis* sp. nov. and *Burkholderia metallica* sp. nov., novel species within the *Burkholderia cepacia* complex. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 1580-1590.

**Vanlaere, E., Baldwin, A., Gevers, D. & other authors (2009).** Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 102-111.

**Venturi, V., Friscina, A., Bertani, I., Devescovi, G. & Aguilar, C. (2004).** Quorum sensing in the *Burkholderia cepacia* complex. *Res Microbiol* **155**, 238-244.

**Vermis, K., Coenye, T., LiPuma, J. J., Mahenthiralingam, E., Nelis, H. J. & Vandamme, P. (2004).** Proposal to accommodate *Burkholderia cepacia* genomovar VI as *Burkholderia dolosa* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 689-691.

**Warawa, J. & Woods, D. E. (2005).** Type III secretion system cluster 3 is required for maximal virulence of *Burkholderia pseudomallei* in a hamster infection model. *FEMS Microbiol Lett* **242**, 101-108.

**Watnick, P. & Kolter, R. (2000).** Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol* **182**, 2675-2679.

**Weber, M. H. W., Fricke, I., Doll, N. & Marahiel, M. A. (2002).** CSDBase: an interactive database for cold shock domain-containing proteins and the bacterial cold shock response. *Nucleic Acids Res* **30**, 375-378.

**Welcome Trust Sanger Institute B. cenocepacia sequencing project** Welcome Trust Sanger Institute B. cenocepacia sequencing project [[http://www.sanger.ac.uk/b\\_cenocepacia](http://www.sanger.ac.uk/b_cenocepacia)].

**Welsh, M. J. & Smith, A. E. (1993).** MOLECULAR MECHANISMS OF CFTR CHLORIDE CHANNEL DYSFUNCTION IN CYSTIC-FIBROSIS. *Cell* **73**, 1251-1254.

**West, S. A., Griffin, A. S., Gardner, A. & Diggle, S. P. (2006).** Social evolution theory for microorganisms. *Nat Rev Microbiol* **4**, 597-607.

**Xavier, J. B., Picioreanu, C., Rani, S. A., van Loosdrecht, M. C. M. & Stewart, P. S. (2005).** Biofilm-control strategies based on enzymic disruption of the extracellular polymeric substance matrix - a modelling study. *Microbiology* **151**, 3817-3832.

**Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T. & Arakawa, M. (1992).** Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of 7 species of the genus *Pseudomonas* homology group-II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Homes 1981) comb-nov. *Microb Pathog* **36**, 1251-1275.

**Zlosnik, J. E. A., Hird, T. J., Fraenkel, M. C., Moreira, L. M., Henry, D. A. & Speert, D. P. (2008).** Differential mucoid exopolysaccharide production by members of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol* **46**, 1470-1473.

**Zuo, Y. H. & Deutscher, M. P. (2001).** Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution. *Nucleic Acids Res* **29**, 1017-1026.