



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

**CARACTERIZAÇÃO DO PAPEL DO GENE *BOLA*:
CONSEQUÊNCIAS NA MOTILIDADE BACTERIANA E
FORMAÇÃO DE BIOFILMES**

SUSANA ISABEL LOURO DE BARAHONA

DEZEMBRO DE 2013



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

**CARACTERIZAÇÃO DO PAPEL DO GENE *BOLA*:
CONSEQUÊNCIAS NA MOTILIDADE BACTERIANA E
FORMAÇÃO DE BIOFILMES**

ORIENTADOR: PROFESSORA DOUTORA CECÍLIA M. ARRAIANO

CO-ORIENTADOR: DOUTOR RICARDO N. MOREIRA

INSTITUTO DE TECNOLOGIA QUÍMICA E BIOLÓGICA

SUSANA ISABEL LOURO DE BARAHONA

DEZEMBRO DE 2013

“Para observar com clareza, basta mudar a direcção do olhar.”

Adaptado de Antoine de Saint-Exupéry.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram e apoiaram a realização desta dissertação:

Gostaria de agradecer à Comissão Científica e Organizadora da quinta edição do Mestrado em Microbiologia Médica pela qualidade e excelência de ensino proporcionada no decorrer do mesmo.

À Professora Cecília Arraiano pela oportunidade de trabalhar na sua equipa, pela orientação, reforço positivo, entusiasmo e alegria contagiante.

Ao meu co-orientador Ricardo Moreira pela oportunidade de errar, pensar e agir. Obrigado por toda a dedicação, confiança, paciência e amizade.

A todos os meus colegas de laboratório pela boa disposição, tempo e ajuda disponibilizada. Obrigado por todos os bons momentos partilhados. Um agradecimento especial à Andreia Aires, Inês Silva, Margarida Saramago e Patrícia Apura.

Ao Richard pela força, compreensão e amizade. Obrigado pelas fotografias, vídeos e por todos os momentos, somos dos mais..!

Ao Renato por toda a dedicação, protecção e apoio incondicional.. obrigado por me conheceres tão bem.

Aos meus amigos Di, Ana, Margarida, ao Dé e ao Miguel por fazerem parte da minha vida e estarem em todas as minhas melhores recordações.

Às pessoas mais importantes da minha vida: Pai, Mãe, Lena, Cristina, Ana e Ricardo pelo vosso orgulho desmedido, pelo vosso apoio e carinho, por serem a minha “casa” e coração. Obrigado pelo vosso Amor.

RESUMO

A reprogramação da expressão génica é uma das características chave na sobrevivência e adaptação bacteriana. Esta flexibilidade genética permite à célula bacteriana adoptar estratégias face a diversas condições adversas, sendo a formação de biofilmes uma das possíveis vias adaptativas. Genes envolvidos na resposta a stresse, como o gene *bolA* de *Escherichia coli*, são geralmente induzidos quando as células necessitam de se adaptar e sobreviver a condições desfavoráveis. Os efeitos da proteína BolA são pleiotrópicos sendo, conseqüentemente, a sua caracterização funcional um desafio complexo. A indução da expressão do gene *bolA* ocorre em resposta a variados tipos de stresse, estando este aumento relacionado com o favorecimento do crescimento em biofilme.

Os resultados obtidos neste estudo reforçam o importante papel da proteína BolA como um factor chave na adaptação celular a situações de stresse. Observou-se que esta proteína, recentemente descrita como um factor de transcrição, regula a expressão de um surpreendente número de genes envolvidos na biogénese flagelar, tendo importantes conseqüências a nível de motilidade e favorecendo a transição do estado celular planctónico para biofilme. Adicionalmente, verificou-se ainda uma regulação em *feedback* entre a proteína BolA e a molécula sinalizadora c-di-GMP, havendo uma redução da concentração intracelular deste metabolito concomitantemente com o aumento da expressão desta proteína.

O trabalho apresentado nesta dissertação proporciona um importante avanço na caracterização das funções da proteína BolA de *Escherichia coli*, revelando que esta desempenha um papel determinante na coordenação da biogénese flagelar e a formação de biofilmes. Assim, o estudo desta proteína mostrou-se de elevada relevância para a compreensão da base genética e molecular envolvida na regulação destes dois mecanismos celulares, permitindo o desenvolvimento de estratégias de prevenção a nível industrial e de saúde pública no futuro.

ABSTRACT

Gene expression is one of the main characteristics in bacterial survival and adaptation. Genetic flexibility allows the cells to adapt to different strategies when facing adverse conditions. The genes involved in stress response, like *Escherichia coli* *bolA* gene, are generally induced when cells need to adapt and survive hostile conditions. BolA protein expression is responsible for a variety of effects in the cells, being its pleiotropic effects a challenge for its characterization. Overexpression of *bolA* occurs mainly in response to stress conditions, being its higher expression levels related with biofilm formation.

Our results emphasize the importance of BolA as a key factor in cellular adaptation to stress. We have shown that this protein, recently described as a transcriptional factor, regulates the expression of a surprisingly number of genes involved in the flagellar biogenesis. Moreover, BolA overexpression was shown to have consequences in cell motility and to favor the transition between the planktonic growth and sessile biofilm lifestyle. Additionally, it was possible to observe a feedback regulation between BolA and the production of c-di-GMP molecule. We show that the intracellular concentration of this signaling molecule is reduced concomitantly with the increase of the levels of BolA expression.

In conclusion, the work presented here provides an important advance in the functional characterization of the *Escherichia coli* BolA protein, unraveling its determinant role in the coordination of the flagellar biogenesis and biofilm formation. Therefore, the study of this protein is of utmost importance for the comprehension of the genetic and molecular basis involved in the regulation of these two cellular mechanisms, contributing for future studies with industrial and public healthcare applications.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
1.1 Regulação transcricional e pós-transcricional do gene <i>bolA</i> de <i>E. coli</i>	2
1.2 Regulação da expressão da proteína Bola em condições desfavoráveis de crescimento	5
1.3 Divisão e morfologia celular	6
1.4 Modulação da Permeabilidade na Adaptação ao Stresse	7
1.5 Motilidade Bacteriana Mediada por Flagelos	8
1.5.1 Biogénese flagelar	8
1.5.2 Motor Flagelar	11
1.6 Desenvolvimento de Biofilmes como Mecanismo de Adaptação ao Stresse	13
MATERIAIS E MÉTODOS	20
2.1 Estirpes e Crescimentos Bacterianos	21
2.2 Construção de estirpes bacterianas	21
2.3 Preparação de Células Competentes	25
2.4 Transformação de Células Competentes	26
2.5 Preparação de Células Electrocompetentes	26
2.6 Transformação por Electroporação	26
2.7 Transdução Generalizada	27
2.8 Determinação de Curvas de Crescimento Bacterianas	28
2.9 Microscopia de Contraste de Fase	28
2.10 Ensaio de Motilidade Bacteriana	28
2.11 Extracção de RNA Total	29
2.12 Transcrição Reversa	30
2.13 PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)	31
2.14 Imunoprecipitação da Cromatina e Sequenciação	32
2.15 Extracção de proteína total	34
2.16 <i>Western Blot</i>	35
2.17 Quantificação dos níveis intracelulares de c-di-GMP	36
RESULTADOS	37

3.1 A proteína BolA afecta a motilidade bacteriana	39
3.2 Construção do delectante simples no gene <i>ycgR</i> e duplo nos genes <i>bolA</i> e <i>ycgR</i>	41
3.3 Velocidade relativa de <i>swimming</i> entre as estirpes MG1655 e MG1655 Δ <i>ycgR</i>	42
3.4 A regulação da expressão do gene <i>ycgR</i> é independente da proteína BolA	43
3.5 O aumento dos níveis intracelulares de c-di-GMP altera a motilidade da estirpe <i>wt</i> para um fenótipo similar a Δ <i>bolA</i>	44
3.6 A proteína BolA regula os níveis intracelulares de c-di-GMP	45
3.7 Níveis transcricionais e traducionais do gene <i>bolA</i> são modulados por c-di-GMP..	46
3.8 A proteína BolA regula a expressão de enzimas DGC e PDE por interacção directa com a sequência promotora dos seus respectivos genes.....	49
3.9 Construção da fusão <i>bolA::3xFLAG-kan^R</i>	52
DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
ANEXOS	78

ÍNDICE DE FÍGURAS

Figura 1 - Regulação do gene <i>bolA</i> a nível transcricional e pós-transcricional.....	4
Figura 2 - Transcrição hierárquica dos genes flagelares.....	10
Figura 3 - Principais componentes constituintes do flagelo..	11
Figura 4 - Interação da proteína YcgR com o motor flagelar..	13
Figura 5 - Rede regulatória envolvida no controlo da expressão do gene <i>csgD</i> e seu efeito na formação de biofilmes e na motilidade..	16
Figura 6 - Regulação da formação de biofilmes por FlhDC, OmpR/EnvZ e RcsCDB..	17
Figura 7 – Função da molécula sinalizadora c-di-GMP na regulação da expressão do gene <i>csgD</i>	18
Figura 8 - Etapas do desenvolvimento de biofilmes.....	19
Figura 9 - Representação da análise global de transcritos por <i>microarrays</i>	38
Figura 10 - A expressão diferencial do gene <i>bolA</i> afecta a motilidade em <i>E. coli</i>	39
Figura 11 - Cascata de biogénese flagelar acoplada aos resultados obtidos na análise do transcriptoma.	40
Figura 12 – Esquematização da construção da estirpe MG1655 Δ <i>ycgR</i>	41
Figura 13 - Comparação da velocidade de <i>swimming</i> entre as estirpes de <i>E. coli</i> MG1655 e MG1655 Δ <i>ycgR</i>	43
Figura 14 - Comparação do fenótipo de motilidade entre as estirpes MG1655 e MG1655 Δ <i>bolA</i> face à adição de c-di-GMP ao meio de crescimento.	45
Figura 15 - Quantificação dos níveis intracelulares de c-di-GMP em estirpes de <i>E. coli</i> com diferentes níveis de expressão de gene <i>bolA</i>	46
Figura 16 - Influência do metabolito c-di-GMP nos níveis de expressão do gene <i>bolA</i> .47	
Figura 17 - Quantificação relativa dos níveis da proteína BolA, em fase estacionária, face à adição de c-di-GMP ao meio de crescimento.....	48
Figura 18 - Análise das amostras de DNA obtidas a partir da técnica de CHIP.	50
Figura 19 - Resultado representativo da análise por CHIP-seq.....	51
Figura 20 - Enzimas DGC e PDE cuja expressão é afectada a nível transcricional pela proteína BolA.....	52
Figura 21 – Esquematização das etapas de construção da estirpe MG1655 <i>bolA</i> ::3xFLAG- <i>kan^R</i>	53

Figura 22 - Análise do crescimento bacteriano de MG1655 <i>bolA::3xFLAG-kan^R</i> relativamente a MG1655.	54
Figura 23 - Análise fenotípica da expressão de gene <i>bolA</i> nas estirpes MG1655 e MG1655 <i>bolA::3xFLAG-kan^R</i>	54
Figura 24 – A proteína Bola actua como factor de transcrição de genes envolvidos na síntese flagelar.	57

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Mistura de reacção para amplificação do gene <i>cm^R</i>	22
Tabela 2 - Programa de PCR.	22
Tabela 3 - Mistura de reacção para amplificação da região a sequenciar.....	23
Tabela 4 - Mistura de reacção para amplificação da sequência codificante de 3xFLAG e <i>kan^R</i>	24
Tabela 5 - Mistura de reacção para amplificação da região <i>bolA::3xFLAG-kan^R</i>	25
Tabela 6 - Mistura de reacção para confirmar a pureza das amostras de RNA total.....	30
Tabela 7 - Mistura de reacção para eliminação de gDNA.	30
Tabela 8 - Mistura de reacção para Transcrição Reversa.	31
Tabela 9 - Mistura de reacção para realização de qRT-PCR.	31
Tabela 10 - Programa utilizado na amplificação quantitativa de cDNA.	32
Tabela 11 - Meios de cultura, soluções e géis.	79
Tabela 12 - Estirpes bacterianas usadas neste estudo.	82
Tabela 13 – Plasmídeos usados neste estudo.....	83
Tabela 14 - Oligonucleótidos usados na amplificação da cassette de resistência ao cloranfenicol.	84
Tabela 15 - Oligonucleótidos usados na amplificação da região $\Delta ycgR:cmR$	84
Tabela 16 - Oligonucleótidos usados na amplificação da sequência codificante de 3xFLAG- <i>kan^R</i>	84
Tabela 17 - Oligonucleótidos usados na amplificação da região codificante <i>bolA::3xFLAG-kan^R</i>	84
Tabela 18 - Oligonucleótido usado na sequenciação da região codificante <i>bolA-3xFLAG:kan^R</i>	85
Tabela 19 - Oligonucleótidos usados para qRT-PCR e respectivos genes de interesse. 85	

LISTA DE ABREVIATURAS

β	Beta
cAMP	<i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i>
c-di-GMP	<i>Cyclic Diguanosine Monophosphate</i>
cDNA	DNA complementar
ChIP	Imunoprecipitação da Cromatina
cm^R	Gene de resistência ao cloranfenicol
Ct	<i>Cycle threshold</i>
ddH ₂ O	Água bidestilada
Δ	Delectante
DGC	Diguanilato ciclase
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dNTP	Deoxiribonucleótido trifosfato
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EPS	Substâncias Poliméricas Extracelulares
g	Gramma
°C	Graus Celsius
gDNA	DNA genómico
h	Hora
H ₂ O	Água
IPTG	<i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>
kan^R	Gene de resistência à canamicina
KDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
λ	Lambda
LA	Luria-Bertani Agar
LB	Luria Broth
M	Molar
μ F	Microfarad

μg	Micrograma
μl	Microlitro
μM	Micromolar
mg	Miligrama
min	Minuto
MQ	Milli-Q
ml	Mililitro
mRNA	RNA mensageiro
ng	Nanograma
Ø	Sigma
Ω	Ômega
ONPG	<i>o-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranoside</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
Pb	Par de bases
PBP	<i>Penicillin-binding protein</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDE	Fosfodiesterase
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoreto
PNPase	<i>Polynucleotide phosphorylase</i>
ppGpp	<i>Guanosine tetrphosphate</i>
qRT-PCR	PCR quantitativo em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease
RNase III	Ribonuclease III
<i>rnc</i>	Gene que codifica a Ribonuclease III
seg	Segundo
SOC	<i>Super Optimal Broth with catabolite repression</i>
sRNA	<i>Small RNA</i>
tRNA	RNA de transferência
V	Volte
<i>wt</i>	<i>Wild type</i>



INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A célula bacteriana é um sistema dinâmico, com rápida capacidade de adaptação a mudanças ambientais, quer através de alterações genóticas como fenotípicas, que permitem a sua sobrevivência. Face a períodos de escassez de nutrientes ou outros tipos de stresse, as bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli* (*E. coli*), sobrevivem através da adaptação do estado fisiológico celular.

O gene *bolA*, localizado na região 10min do mapa genético de *E. coli*, foi descrito pela primeira vez, como um gene de fase estacionária [1,2]. No entanto, embora a sua expressão seja regulada de acordo com a fase de crescimento [54], este tem sido descrito como um gene de resposta ao stresse, não estando a sua função confinada à fase estacionária de crescimento [84]. A proteína BolA encontra-se envolvida no controlo de numerosos processos celulares e, como tal, o controlo da sua expressão compreende uma rede complexa de regulação.

1.1 Regulação transcricional e pós-transcricional do gene *bolA* de *E. coli*

O gene *bolA* codifica uma proteína com um peso molecular de 13,5 KDa [2]. A sua expressão é regulada por dois promotores diferentes, *bolAp1* e *bolAp2*, controlados pelos factores de transcrição σ^S (RpoS) e σ^{70} (RpoD), respectivamente [1,54]. O promotor *bolAp2* permite a expressão constitutiva do gene *bolA*, produzindo mRNA em pequenas quantidades, ao longo de todo o crescimento bacteriano [1]. Por outro lado, o promotor *bolAp1* é regulado pela taxa e fase de crescimento e contém um elemento *gearbox* (CGGCNAGTA), característico de muitos genes estruturais [1]. O mRNA transcrito a partir deste promotor é principalmente detectado na transição para fase estacionária de crescimento ou sob condições de stresse, com simultânea diminuição dos níveis de transcrito a partir do promotor *bolAp2* [1]. Esta observação deu origem à hipótese de que a interacção do factor de transcrição RpoS com a maquinaria de transcrição do promotor *bolAp1* possa interferir com a capacidade da RNA polimerase interagir ou prosseguir com a transcrição dependente do promotor *bolAp2* [84].

Para além da regulação através de dois promotores independentes, a expressão do gene *bolA* é de certa forma muito complexa, quer através de factores transcricionais que

actua directamente na expressão deste gene, como de regulações indirectas. A título de exemplo, a Ribonuclease III (RNase III; codificada pelo gene *rnc*), tem um importante papel na expressão do gene *bolA* [30]. Esta endoribonuclease está descrita como um dos elementos responsáveis pela regulação do mRNA *rpoS*, uma vez que actua como modulador positivo em situações de carência de glucose, assegurando os níveis normais de expressão deste RNA [82]. Consequentemente, esta regulação afecta de forma indirecta os níveis de mRNA do gene *bolA*. Adicionalmente, a poliadenilação, inversamente relacionada com a taxa de crescimento bacteriano, tem também um papel indirecto no controlo transcricional do gene *bolA* [48,83]. Como resultado da poliadenilação, verifica-se uma redução da proteólise do factor de transcrição RpoS pelo complexo ClpXP, havendo um aumento dos níveis desta proteína, o que contribui para a transcrição de genes que são, como o gene *bolA*, dependentes de RpoS [83]. A expressão do gene *bolA* é ainda sensível, de forma positiva e negativa, aos níveis intracelulares de ppGpp [34] e cAMP [102], respectivamente.

A nível da regulação directa da transcrição do gene *bolA*, Yamamoto e seus colaboradores observaram que o promotor *bolAp1* é negativamente regulado, *in vitro*, pela proteína repressora OmpR na sua forma fosforilada [102]. Recentemente, a proteína H-NS, um importante factor de transcrição com funções muito diversas na célula, foi também identificada como um elemento que contribui para a complexa regulação da expressão do gene *bolA* [62]. Curiosamente, esta proteína afecta genes dependentes do factor de transcrição RpoS [8]. É frequentemente comparada a histonas eucariotas devido à sua elevada afinidade para interacção com moléculas de DNA e liga-se preferencialmente a regiões estruturadas ricas em AT, encontradas em certas regiões promotoras [8]. A origem da regulação da expressão do gene *bolA* por parte desta proteína está na base da sua interacção directa com ambas as regiões promotoras deste mesmo gene, originando um complexo inibidor multiproteico que impede a ligação da RNA polimerase [62].

Para além dos reguladores transcricionais estão também descritas diferentes formas de regulação pós-transcricional que influenciam de forma relevante a quantidade resultante de proteína BolA na célula. Em condições de ausência de glucose, a enzima RNase III está envolvida na estabilidade do mRNA transcrito a partir do promotor *bolAp1*. Nestas condições, verificou-se que o mRNA *bolAp1* é expresso cerca de nove

vezes mais numa estirpe selvagem (*wt*) quando comparado com condições normais de crescimento [30]. Por outro lado, numa estirpe delectante no gene *rnc* este aumento é apenas de quatro vezes, havendo assim uma diminuição do mRNA *bolAp1* na ausência da enzima RNase III [30]. A diminuição dos níveis de mRNA na ausência desta ribonuclease deve-se à perda de estabilidade do RNA, uma vez que na estirpe *wt* o transcrito *bolAp1* é duas vezes mais estável do que na estirpe delectante no gene *rnc* [30].

Estudos preliminares evidenciam um possível papel da proteína Hfq, um importante chaperone em bactérias Gram-negativas, na regulação da estabilidade do mRNA do gene *bola*. Observou-se que numa estirpe mutante no gene *hfq* tanto os níveis de mRNA *bola* como a estabilidade do mesmo se encontram significativamente reduzidos, quando comparada com a estirpe *wt*.

Como se pode verificar, a expressão do gene *bola* compreende uma rede complexa de regulação, que depende não só da taxa de síntese de mRNA celular mas também da sua degradação (Fig. 1).

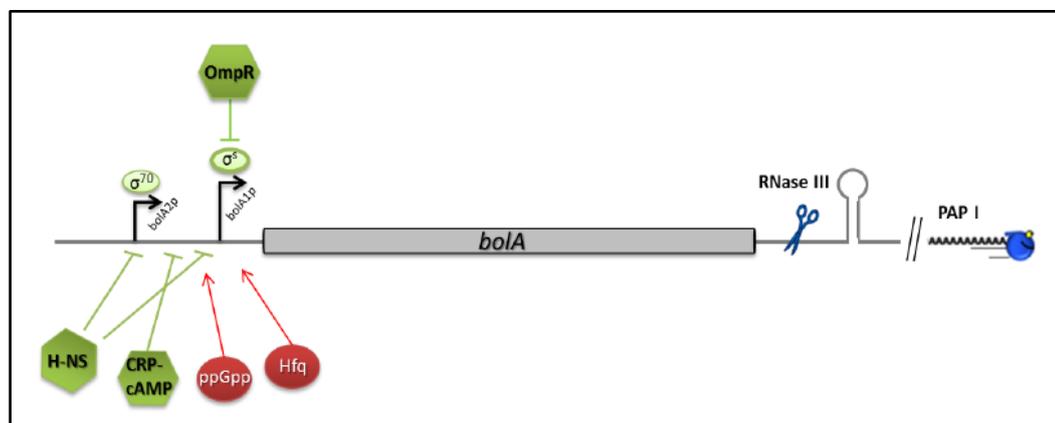


Figura 1 - Regulação do gene *bola* a nível transcricional e pós-transcricional. O promotor *bolAp1* é regulado pelo factor de transcrição σ^S sendo induzido em fase estacionária de crescimento e face a diversas condições de stresse. A regulação do promotor *bolAp2*, o qual é induzido constitutivamente, é dependente do factor de transcrição σ^{70} . A nível transcricional a expressão do gene *bola* é negativamente regulada pela proteína OmpR, H-NS e CRP-cAMP e, positivamente regulada por ppGpp e PAPI. A nível pós-transcricional a estabilidade do mRNA *bola* é positivamente afectada pelas proteínas RNase III e Hfq.

1.2 Regulação da expressão da proteína BOLA em condições desfavoráveis de crescimento

De forma semelhante ao gene *rpoS*, a indução da expressão do gene *bolA* ocorre no início da fase estacionária, concomitantemente com o decréscimo da taxa de crescimento celular [54]. No entanto, em fase exponencial, a expressão deste gene pode também ser induzida quando as células bacterianas são alvo de algum tipo de stresse, realçando a sua importância na resposta geral a condições desfavoráveis de crescimento [84]. Na presença de situações deste tipo verifica-se não só a sobre-expressão do gene *bolA*, como também diferentes consequências a nível fenotípico nas células. Face a situações de carência de glucose ou aumento da osmolaridade do meio envolvente, a expressão do transcrito *bolApI* é, respectivamente, 17 e 22 vezes superior a uma condição favorável de crescimento [84]. A expressão deste transcrito aumenta cerca de 3 vezes quando uma população bacteriana é confrontada com um choque térmico ou stresse ácido. Adicionalmente, a indução do promotor *bolApI* por choque térmico é quase imediata, atingindo-se um nível máximo de transcrito imediatamente após 15 minutos de exposição ao stresse [84]. Aquando da reversão do stresse verifica-se um decréscimo rápido dos níveis de mRNA *bolA*, acompanhado por um aumento significativo da densidade óptica e também do aumento moderado da viabilidade celular. A indução da expressão do transcrito *bolApI* por stresse ácido é mais gradual, verificando-se um aumento da densidade óptica pouco tempo após a reversão do stresse, embora o crescimento celular nunca atinja uma taxa equivalente à existente antes do stresse. O stresse oxidativo imposto face à adição de H_2O_2 inibe tanto o crescimento como a viabilidade bacteriana [84]. A expressão do promotor *bolApI* face à interrupção do crescimento celular por exposição a determinado stresse vai de encontro ao facto de este ser um promotor *gearbox* [94]. A indução deste promotor, imposta por determinado stresse ultrapassa a regulação normal imposta pela taxa de crescimento. O facto de existirem diferentes padrões de indução levanta a hipótese da existência de diferentes mecanismos reguladores que controlam a expressão do gene *bolA* dependendo do stresse a que as células são impostas [84]. A activação do promotor *bolApI* dependente de stresse confere ao gene *bolA* um papel geral de protecção revelando mecanismos adicionais à regulação dependente da fase e taxa de crescimento.

1.3 Divisão e morfologia celular

Os efeitos da proteína BolA a nível celular são pleiotrópicos, tendo especial interesse os que se relacionam com mecanismos interligados com a síntese da parede celular [1].

O produto do gene *bolA* contém um domínio regulador de ligação ao DNA, essencialmente formado por um motivo *helix-turn-helix*, que permite a interacção e regulação da expressão de diferentes genes [1]. A proteína BolA actua como indutor da expressão de proteínas envolvidas na síntese da parede celular, nomeadamente aumentando a expressão de mRNAs referentes às DD-carboxipeptidases PBP5 e PBP6 (codificadas respectivamente pelos genes *dacA* e *dacC*) e da β -lactamase AmpC [1,31,85]. As *Penicillin-binding proteins* (PBPs) têm um papel chave nos mecanismos de alongação e divisão celular [89], sendo responsáveis pelo *cross-linking* do peptidoglicano [9]. Aquando da sobre-expressão da proteína BolA ocorrem mudanças substanciais a nível celular, alterando a morfologia característica de *E. coli* em forma de bacilo para uma morfologia arredondada [2]. As alterações morfológicas celulares induzidas por esta proteína envolvem uma via complexa que integra as regulações transcricionais acima referidas das proteínas PBP5/PBP6 e adicionalmente da proteína MreB [9,31]. Esta última é um homólogo estrutural da actina, essencial na alongação celular e na manutenção da estrutura bacilar bacteriana. Quando observada a distribuição da proteína MreB na célula por microscopia, é possível notar a sua estrutura helicoidal descrita como uma forma de citoesqueleto bacteriano [49]. De realçar é o facto de a regulação transcricional dos genes que codificam as proteínas PBP5, PBP6 e MreB ser mediada por interacção directa da proteína BolA na região promotora dos respectivos genes, regulando a transcrição dos dois primeiros de forma positiva e do último de forma negativa [9,31]. A indução dos níveis das proteínas PBP5 e PBP6, bem como a inibição de MreB convergem, promovendo a inibição da alongação celular, alterando assim a morfologia das células para uma forma arredondada [31]. O facto da proteína BolA interagir com as regiões promotoras dos genes *dacA* e *dacC*, bem como do gene *mreB*, expande o seu papel como regulador transcricional, ampliando o seu impacto a nível da sobrevivência e crescimento bacteriano.

1.4 Modulação da Permeabilidade na Adaptação ao Stresse

A membrana externa bacteriana constitui uma importante barreira contra stresses químicos e mecânicos aos quais os microrganismos estão expostos [65]. A composição da membrana externa sofre diversas alterações regulatórias, as quais permitem a adaptação a diferentes ambientes [91]. Em bactérias Gram-negativas, a membrana externa é composta por uma bicamada lipídica com baixa permeabilidade para solutos hidrofílicos [65]. A bicamada lipídica contém proteínas transmembranares formadoras de poros que permitem a captação de nutrientes e o efluxo de detritos [65]. As principais proteínas que permitem a difusão passiva de solutos através da membrana externa de *E. coli* são as porinas OmpF e OmpC [65]. A proteína OmpF apresenta uma maior permeabilidade que a proteína OmpC, o que facilita a difusão de potenciais agentes tóxicos [41]. Assim, em condições ótimas de crescimento, a proteína OmpF facilita a captação de nutrientes por *E. coli* [32]. Em condições desfavoráveis de crescimento, como o aumento da osmolaridade, verifica-se um aumento da expressão da proteína OmpC, bem como a inibição de OmpF [65]. Por outro lado, em condições de baixa osmolaridade ocorre o aumento da expressão da proteína OmpF [38]. O controlo diferencial das proteínas OmpC e OmpF tem como base o sistema *two-component*, EnvZ/OmpR, que regula a expressão destas porinas em resposta a mudanças de osmolaridade [65]. É também de realçar que outros factores têm sido relacionados com a alteração da expressão destas porinas, entre os quais a alteração da temperatura ou pH, a disponibilidade de nutrientes, ou a presença de toxinas [32]. A proteína BolA está descrita como envolvida no balanço da expressão das porinas OmpC e OmpF [32]. Demonstrou-se que a sobre-expressão do gene *bolA* confere não só uma maior resistência celular a detergentes, como um aumento de cinco vezes da concentração mínima inibitória à vancomicina, o que sugere um importante papel desta proteína ao nível da membrana externa [32]. Elevados níveis de expressão de BolA levam ao aumento do rácio entre as porinas OmpC/OmpF, verificando-se assim uma diminuição da permeabilidade da membrana celular, o que conseqüentemente confere um aumento da resistência a produtos tóxicos [32].

Como já referido, os níveis de expressão do gene *bolA* são regulados negativamente pelo factor de transcrição OmpR na sua forma fosforilada [102]. Este

facto poderia indicar um papel ambíguo da proteína OmpR, que por um lado induz os níveis da proteína OmpC e, por outro, inibe este efeito pela regulação negativa da expressão do gene *bolA* [32]. No entanto, existem factores pós-transcricionais adicionais que contribuem para um aumento dos níveis de expressão do gene *bolA* o que ainda assim permite a indução da expressão da proteína OmpC, face a uma situação de stresse [32].

O facto da proteína BolA estar envolvida na manutenção da integridade da membrana externa, tem enorme relevância na compreensão do papel desta proteína na formação de biofilmes [61]. Adicionalmente, a formação de biofilmes está fortemente relacionada com a motilidade celular [101] sendo a compreensão desta relação crucial no estudo dos mecanismos envolvidos na regulação da motilidade durante a formação dos mesmos.

1.5 Motilidade Bacteriana Mediada por Flagelos

A motilidade bacteriana pode ocorrer por variados mecanismos, no entanto, a forma mais estudada de motilidade envolve a formação e a rotação apropriada de estruturas denominadas flagelos [47]. Os flagelos são espontaneamente formados numa via que envolve mais de 50 proteínas, a qual consome cerca de 2% dos recursos metabólicos celulares [39,72].

No crescimento planctónico, a motilidade bacteriana conferida por flagelos é essencial na adaptação ao ambiente envolvente. Esta representa uma forma generalizada e bastante eficaz de locomoção activa das células bacterianas, proporcionando a capacidade de encontrar ambientes com condições favoráveis, resultando numa vantagem significativa de sobrevivência [3]. Assim, para muitas espécies bacterianas, a motilidade mediada por flagelos é um factor significativo ou mesmo crucial no sucesso da sua propagação.

1.5.1 Biogénese flagelar

Os genes envolvidos na biogénese flagelar são organizados em três classes hierárquicas. Os genes de classe I codificam para reguladores principais envolvidos na

transcrição de genes de classe II. Os genes de classe II codificam componentes flagelares estruturais que formam o corpo basal, a maquinaria de secreção e para o gancho, bem como para o factor de transcrição σ^F e o correspondente factor anti- σ^F (proteína FlgM). Por fim, os genes de classe III codificam componentes estruturais que formam o filamento e as proteínas do motor flagelar [39].

Em *E. coli*, o complexo proteico FlhDC, codificado pelo operão *flhDC*, é o activador de classe I da biogénese flagelar [75]. A sua expressão aumenta em fase exponencial tardia, quando as células em estado planctónico se tornam móveis, adoptando assim, uma estratégia que beneficia a sua condição nutricional [103]. Este complexo proteico controla a expressão dos genes de classe II, de uma forma dependente do factor de transcrição σ^{70} . Entre os genes de classe II encontra-se o factor de transcrição σ^F , codificado pelo gene *fliA*, que permite a transcrição de genes de classe III [100] (Fig. 2). A formação de flagelos é regulada transcricionalmente através da interacção entre o factor de transcrição σ^F e o seu antagonista anti- σ^F [22]. A interacção entre estas proteínas garante que a expressão de genes que codificam proteínas necessárias apenas em fases tardias da biogénese flagelar não sejam transcritas até a estrutura gancho-corpo basal (HBB) estar formada. Assim, até esta estrutura estar completa, a proteína FlgM é mantida no citosol, onde interage e inibe o factor de transcrição σ^F . Uma vez formado, o complexo HBB permite a secreção da proteína FlgM, permitindo a transcrição de genes de classe III dependentes do factor de transcrição σ^F [44] (Fig. 2). Este mecanismo garante que o filamento proeminente não seja sintetizado até a estrutura basal, à qual se liga, estar formada. Este mecanismo evidencia a importância do flagelo na regulação da sua própria biossíntese, sendo a formação do complexo HBB um ponto chave no controlo da expressão de genes flagelares.

A expressão de genes envolvidos na biogénese flagelar ocorre, como referido, em fase exponencial tardia, ocorrendo em paralelo a indução da expressão do factor de transcrição σ^S . No entanto, a formação do complexo transcricional RNA polimerase/ σ^S permanece ineficiente até que determinados factores de transcrição, como a proteína Crl, sejam também expressos, impedindo a transcrição de genes que codificam proteínas envolvidas na síntese de fímbrias [6].

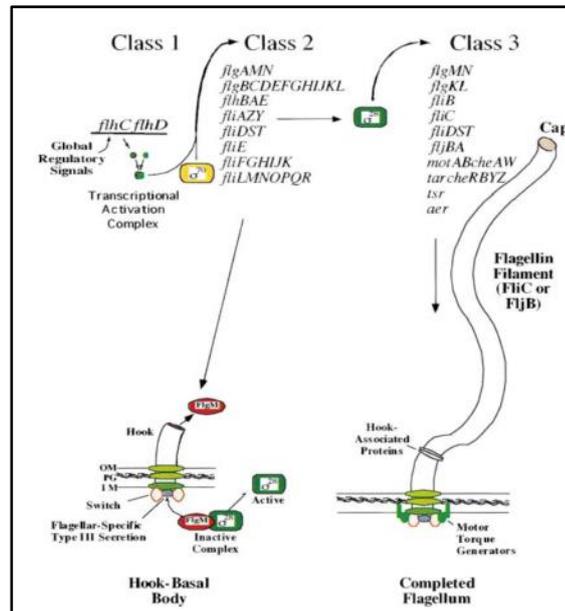


Figura 2 - Transcrição hierárquica dos genes flagelares. O complexo proteico formado pelas proteínas FlhD e FlhC permite a transcrição dos genes de classe II de uma forma dependente do factor de transcrição σ^{70} . Os genes de classe II codificam proteínas envolvidas na formação do complexo HBB, assim como para as proteínas antagonistas FlgM e FliA (σ^F). A proteína FliA permite a transcrição dos genes de classe III, cujos produtos são necessários apenas na fase tardia da biogénese flagelar. A proteína FlgM através de interacção directa com a proteína FliA impede a transcrição dos genes de classe III até a estrutura HBB estar formada. Após a formação desta estrutura a proteína FlgM é excretada permitindo que a transcrição destes genes ocorra. Adaptado de [52].

Adicionalmente, duas formas de regulação contribuem para a coordenação inversa entre a motilidade bacteriana e a formação de biofilme. A proteína reguladora de classe II FliZ regula negativamente a transcrição de um conjunto de genes dependentes do factor de transcrição σ^S , através da ligação específica aos seus promotores [71]. A proteína YhjH tem também um importante papel neste balanço, sendo uma das responsáveis pela degradação da molécula sinalizadora c-di-GMP, a qual contribui para a regulação positiva do gene *csgD*, o regulador principal da cascata de síntese de fímbrias [76]. Ao regular negativamente os níveis deste metabolito, a proteína YhjH previne ainda a interacção da proteína YcgR com o motor flagelar, a qual é estimulada por ligação de c-di-GMP ao seu domínio PilZ [14,80].

A síntese de c-di-GMP é mediada pelas enzimas diguanilato ciclasas (DGC), sendo este metabolito selectivamente degradado por enzimas denominadas fosfodiesterases (PDE), como por exemplo a proteína YhjH anteriormente referida [79].

A sobre-expressão de certas DGC interfere de forma negativa com a motilidade, activando fortemente a expressão de genes que codificam para a formação de fímbrias e celulose, enquanto a sobre-expressão de certas PDE origina o fenótipo oposto [70]. As enzimas DGC tipicamente contêm um domínio GGDEF na região C-terminal que cataliza a produção de c-di-GMP e um domínio N-terminal responsável pela regulação do domínio catalítico [14]. Por sua vez, as enzimas PDE são caracterizadas por conterem um domínio EAL na região C-terminal, responsável pela degradação de c-di-GMP e um domínio N-terminal associado ao controlo do domínio catalítico [14]. A bactéria *E. coli* possui um extraordinário número de genes que codificam ambas as enzimas DGC/PDE, muitos cuja regulação é dependente da proteína RpoS [99].

1.5.2 Motor Flagelar

Como já referido, o sistema flagelar bacteriano é constituído por três componentes principais: o filamento proeminente, o corpo basal e o gancho. O corpo basal, que permite a ligação do flagelo ao invólucro celular, engloba o motor flagelar e o sistema de secreção tipo III, estando este último envolvido no efluxo de proteínas. Por sua vez, a estrutura denominada de gancho permite a conexão entre o corpo basal e o filamento [92] (Fig. 3).

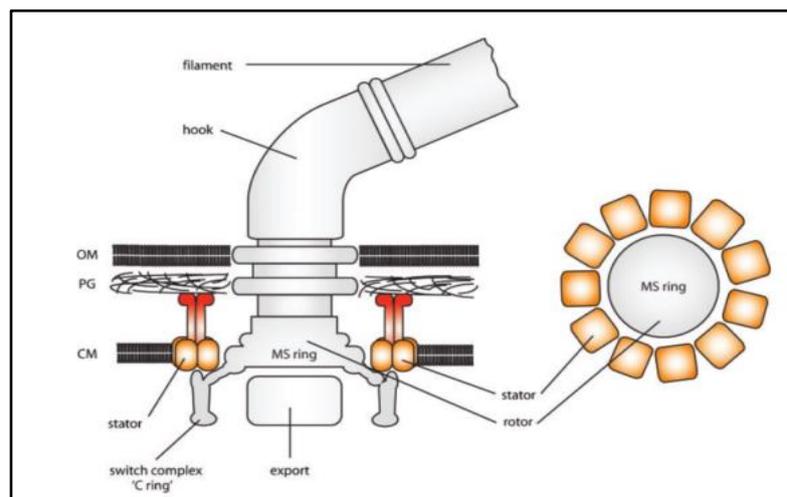


Figura 3 - Principais componentes constituintes do flagelo. Modelo simplificado do corpo basal flagelar e seus componentes principais, incluindo a estrutura gancho e filamento. À direita encontra-se ilustrado o complexo rotor-estator. As proteínas constituintes do estator circundam o anel MS, o qual é constituído por uma única proteína, FliF. OM – Membrana externa; PG – Peptidoglicano; CM – Membrana citoplasmática. Adaptado de [92].

O motor que impulsiona a rotação flagelar é um complexo molecular “alimentado” por gradientes iónicos transmembranares que permitem o movimento do rotor e conseqüentemente do filamento [92]. Enquanto alguns motores flagelares impulsionam a rotação apenas de forma unidireccional outros, como em *E. coli*, permitem uma rotação bidireccional [92]. Apesar de algumas diferenças, em particular relativamente às complexas estruturas proteicas constituintes do corpo basal, certas características parecem ser partilhadas entre todos os sistemas flagelares.

De uma forma geral, os sistemas flagelares necessitam de dois componentes principais para conversão de fluxo iónico em binário, permitindo assim a impulsão da rotação flagelar. Um destes componentes, o anel C, é o rotor do sistema flagelar, sendo composto por múltiplas cópias das proteínas FliG, FliM e FliN [16]. A interacção entre este complexo proteico e os sistemas químico-sensoriais bacterianos permite a modulação da actividade e direcção rotacional [92]. O segundo componente é o sistema estator, constituído em *E. coli* por duas subunidades proteicas, MotA e MotB, as quais interagem formando canais iónicos (Fig. 3) [19]. A proteína MotB possui um domínio transmembranar e um motivo de ligação ao peptidoglicano localizado na região C-terminal, que permite a ligação do complexo estator à parede celular. A proteína MotA possui quatro domínios transmembranares e interage directamente com a proteína FliG permitindo não só a rotação do motor como também a ligação do estator ao rotor [47,63].

A interacção entre as proteínas constituintes do rotor e do estator permite impulsionar e regular a rotação flagelar. O fluxo de prótons atravessa o canal iónico formado pelas proteínas MotA e MotB ligando-se ao resíduo aspártico da última. Subseqüentemente ocorre uma mudança conformacional na proteína MotA que estimula a interacção electroestática entre esta e a proteína FliG, gerando binário e movendo o rotor. Porém, as interacções rotor-estator parecem ser extremamente dinâmicas [47]. O número de complexos estator é dependente de cada espécie bacteriana. Em *E. coli*, doze complexos estator podem funcionar sincronizadamente. No entanto, um único complexo proteico activo é suficiente para impulsionar a rotação flagelar [92]. Estudos evidenciam o facto de um complexo estator poder associar e desassociar-se do motor sem interromper a rotação flagelar [56]. No entanto, embora o dinamismo entre motor-estator seja evidente, não é clara a razão da alta taxa de troca entre estatores.

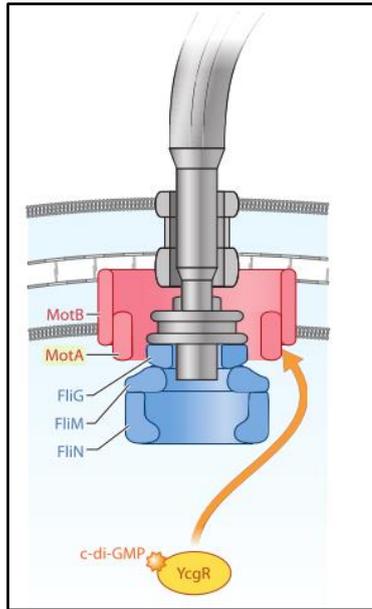


Figura 4 - Interação da proteína YcgR com o motor flagelar. A proteína YcgR, após activação mediada pela ligação de c-di-GMP ao seu domínio PilZ, interage directamente com a proteína MotA constituinte do estator celular. Esta interacção interfere com as interacções electrostáticas entre as proteínas MotA e FliG, que permitem a geração de binário e o movimento do rotor. Adaptado de [17].

A proteína YcgR, como já referido, tem a capacidade de interagir com o motor flagelar, de uma forma dependente de c-di-GMP [14]. Esta proteína, em resposta à ligação de c-di-GMP, interage directamente com a proteína constituinte do motor flagelar MotA (Fig. 4).

Tal associação quebra as interacções electrostáticas entre MotA e a proteína do rotor FliG, impedindo assim a geração de binário e, conseqüentemente o movimento do rotor [14]. A proteína YcgR faz assim parte da complexa cascata de regulação induzida em fase estacionária de crescimento, a qual permite a transição entre o estado celular planctónico e a formação de biofilmes. Esta transição envolve mecanismos extremamente dinâmicos e complexos que envolvem inúmeros factores, representando assim um fascinante tópico no estudo de diversos aspectos biológicos.

1.6 Desenvolvimento de Biofilmes como Mecanismo de Adaptação ao Stresse

Os sistemas sensoriais permitem às bactérias detectar e responder a ambientes em constante alteração e coordenar mudanças adaptativas tanto a nível metabólico como fisiológico, sendo a formação de biofilmes uma possível via adaptativa [16]. A relevância da formação de biofilmes bacterianos tem emergido gradualmente desde a sua primeira descrição [104] e do reconhecimento da sua ubiquidade [26].

Como já referido, o gene *bolA*, em *E. coli*, é induzido em resposta a stresse alterando a morfologia celular para uma forma arredondada, diminuindo assim a superfície de exposição em relação ao volume celular a condições desfavoráveis [2,84]. A expressão do gene *bolA* e a formação de biofilmes são dois eventos relacionados com situações de stresse como por exemplo a fase estacionária de crescimento bacteriano [54,96]. De facto, foi observada uma diminuição da densidade celular em cerca de 50% aquando da formação de biofilmes numa estirpe delectante no gene *bolA* [95]. Em determinadas condições de stresse, particularmente em condições de carência de nutrientes e stresse oxidativo, a expressão da proteína Bola aumentou em 5 vezes a espessura dos biofilmes quando comparado com uma estirpe delectante neste gene [95]. Além disso, a expressão do gene *bolA* é negativamente regulada por H-NS, uma proteína envolvida na biossíntese de flagelos [11]. Uma vez que a motilidade é um passo essencial na etapa de adesão na formação de biofilmes [101] e o gene *bolA* estar implicado na formação dos mesmos [95], este poderá estar envolvido na regulação da transição entre a motilidade bacteriana e a formação de biofilmes. No entanto, este mecanismo compreende uma rede complexa, dependente da coordenação da interacção de diversos componentes de forma a induzir uma resposta biológica apropriada.

A formação de biofilmes constitui uma forma de crescimento bacteriana distinta, frequentemente mais vantajosa do que a vida celular planctónica, uma vez que estes aumentam a habilidade de sobrevivência em períodos de stresse [46]. Os biofilmes são definidos como uma comunidade bacteriana revestida por uma matriz [86], a qual é composta por substâncias poliméricas extracelulares (EPS) constituídas maioritariamente por polissacáridos, proteínas, ácidos nucleicos e lípidos [42]. Além da estabilidade mecânica que confere aos biofilmes, a matriz extracelular medeia a adesão bacteriana, permitindo a conexão e imobilização das células em biofilme [42]. No desenvolvimento de biofilmes, a bactéria *E. coli* expressa fibras extracelulares denominadas de fímbrias, as quais constituem o principal componente dos mesmos, tomando um papel principal tanto na adesão a uma superfície como na subsequente interacção celular [74]. A biogénese de estruturas que promovem a formação de biofilmes é complexa, sendo a sua compreensão determinante no desenvolvimento de terapêuticas que previnam tanto a sua formação como a colonização do hospedeiro [7]. Existem diversas condições envolvidas na indução de genes com relevância na

formação de fímbrias, entre as quais, temperaturas inferiores a 30°C [6], tendo já sido, no entanto, verificada a expressão dos mesmos a 37°C em isolados clínicos de *E. coli* [12]. Além da temperatura, também outros factores estão envolvidos neste mecanismo de síntese, tais como a limitação de nutrientes como azoto, fosfato, ferro e carência em oxigénio [36,76]. Um conjunto de polímeros polissacáridos, como ácido colânico e celulose, estão também envolvidos na formação de biofilme e adesão de complexos multicelulares a superfícies [66,73]. A co-produção destes polissacáridos com fímbrias está descrita como necessária para a eficiência da formação destas comunidades bacterianas [74].

Os genes envolvidos na formação de fímbrias estão organizados em dois operões adjacentes: *csgBA*, que codifica componentes estruturais e *csgDEFG*, que codifica proteínas envolvidas no transporte e modificações estruturais de fímbrias [60].

São múltiplos os factores de transcrição que interagem com ambos os promotores dos operões *csg*, conferindo uma regulação fina e complexa da síntese de fímbrias em resposta à fase de crescimento e alterações ambientais.

No centro desta complexa via de regulação está a proteína CsgD, um regulador transcricional da família FixJ/UhpA [40], que modula a expressão não apenas do operão *csg* como também de um conjunto de genes envolvidos na adaptação da fisiologia celular na condição de biofilme [20,25]. A proteína CsgD regula positivamente a expressão do operão *csgBA* [40], sendo absolutamente necessária à sua actividade [7]. A proteína RpoS, encontra-se também envolvida na complexa regulação de genes que codificam para a formação de fímbrias, tanto de forma directa como indirecta [5,68]. Os genes envolvidos na síntese de fímbrias são maioritariamente expressos durante a fase estacionária, sendo a sua expressão dependente do factor de transcrição RpoS [5]. Em *E. coli*, a proteína Crl, cuja expressão e estabilidade é superior a baixas temperatura [15], interage com a proteína RpoS facilitando a sua ligação à região promotora do operão *csgBA*, sendo desta forma necessária para este mecanismo de expressão [6]. A proteína RpoS modula ainda a formação de fímbrias através da activação da expressão da proteína MlrA, um regulador transcricional positivo do gene *csgD* [21]. A expressão do gene *csgD* é também regulada, de forma negativa, pelos sRNAs RprA, GcvB e McaS, através de uma interacção *antisense* entre sRNA e mRNA [50].

Os sistemas regulatórios *two-component* OmpR/EnvZ, CpxA/R e Rcs estão também envolvidos na regulação de genes que codificam para a formação de fímbrias. Destes três sistemas regulatórios, o sistema OmpR/EnvZ é o que tem maior impacto na regulação desta via [7]. A proteína EnvZ é um sensor cinase que em resposta a alterações osmóticas se autofosforila transferindo um grupo fosfato para o factor transcricional OmpR [45]. Por sua vez, a proteína OmpR na sua forma fosforilada regula, de forma positiva, a expressão do gene *csgD* [45,78]. Curiosamente, a activação constitutiva da expressão do gene *ompR* tem um efeito repressor na expressão do gene *csgD*, facto que tem sido atribuído à ligação da proteína OmpR a múltiplos locais de baixa afinidade na região promotora do gene *csgD* [35]. A proteína OmpR regula ainda de forma positiva a expressão dos sRNAs, OmrA e OmrB. Esta via compreende um controlo em *feedback* da síntese de fímbrias, uma vez que estes sRNA regulam negativamente a tradução do mRNA dos genes *ompR* e *csgD* [75] (Fig. 5).

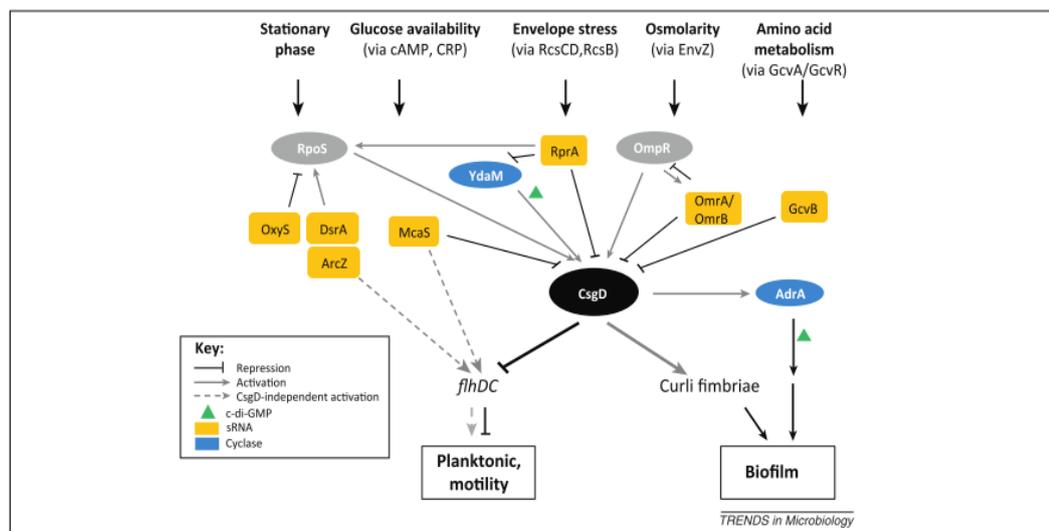


Figura 5 - Rede regulatória envolvida no controlo da expressão do gene *csgD* e seu efeito na formação de biofilmes e na motilidade. A expressão do gene *csgD* é regulada a nível transcricional de forma directa pelas proteínas RpoS e OmpR e de forma indirecta pela proteína YdaM. A nível pós-transcricional a expressão do gene *csgD* é controlada, de forma directa e indirecta, por diversos sRNAs cuja expressão é afectada por uma ampla gama de factores ambientais. A activação da expressão do gene *csgD* inibe a expressão de genes associados ao estado celular planctónico, aumentando a expressão de genes que codificam para a formação de fímbrias e polissacáridos. Adaptado de [23].

Ambos os sistemas CpxA/R e Rcs regulam negativamente a expressão do gene *csgD* [7]. Curiosamente, o sistema regulatório Rcs regula positivamente a expressão de genes que codificam para a síntese de ácido colânico, um componente da matriz extracelular [7]. Assim, este sistema parece ter um papel importante nas fases tardias do desenvolvimento dos biofilmes, visto promover a formação de uma matriz rica em exopolissacaridos e, por outro lado, regular negativamente a expressão do gene *csgD* [29,51]. Adicionalmente, este facto pode indicar a importância da formação de fímbrias apenas na fase de adesão, sendo em seguida a expressão das mesmas inactivada. Por outro lado, são activadas em simultâneo as vias regulatórias CpxA/R e Rcs durante o processo de maturação de biofilmes [75] (Fig. 6).

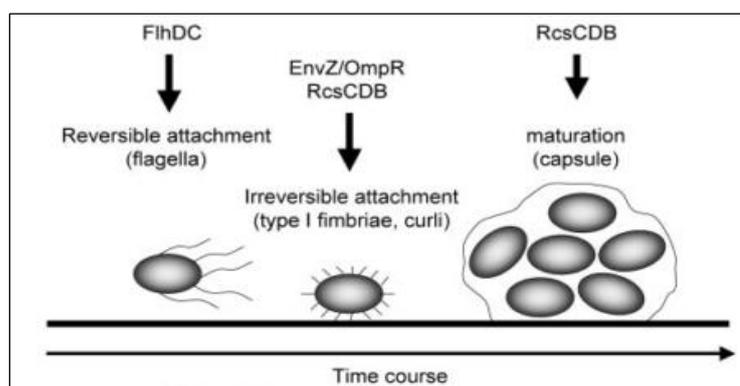


Figura 6 - Regulação da formação de biofilmes por FlhDC, OmpR/EnvZ e RcsCDB. Representação das fases iniciais da formação de biofilmes (adesão celular reversível, adesão celular irreversível e maturação) e concomitante expressão dos reguladores FlhDC, OmpR/EnvZ e RcsCDB na sua regulação. Adaptado de [75].

A complexa via de regulação da formação de fímbrias envolve ainda a molécula c-di-GMP que, como referido acima, contribui positivamente para a regulação do gene *csgD* [70]. Em fase estacionária de crescimento a indução da expressão de DGC é mediada pela proteína RpoS, levando a um aumento dos níveis de c-di-GMP. Por sua vez, este metabolito estimula a regulação positiva da expressão do gene *csgD*, contribuindo para a regulação negativa da expressão de genes envolvidos na biogénese flagelar [50] (Fig. 7). Embora o aumento dos níveis de c-di-GMP pareça ser um factor determinante na transição entre o estado celular planctónico e a formação de biofilmes,

esta via envolve um surpreendente número de proteínas que constituem uma rede de regulação extremamente complexa [17].

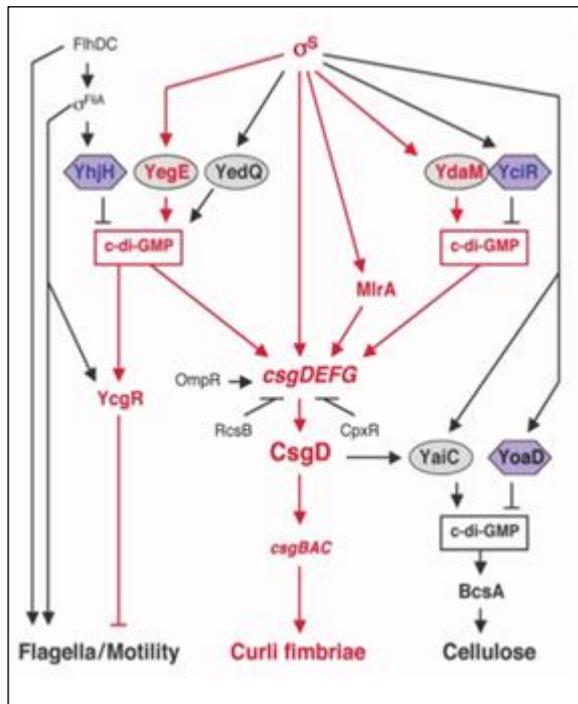


Figura 7 – Função da molécula sinalizadora c-di-GMP na regulação da expressão do gene *csgD*. A molécula sinalizadora c-di-GMP quando em níveis elevados regula de forma positiva a expressão de genes que codificam para a síntese de fímbrias e celulose e de forma negativa a expressão de genes envolvidos na motilidade celular. As enzimas DGC (representadas no interior de círculos) e PDE (representadas no interior de hexágonos) são responsáveis pela síntese e degradação de c-di-GMP, respectivamente. Adaptado de [58].

O processo de formação de biofilmes compreende fases distintas de desenvolvimento: i. adesão celular reversível, ii. adesão celular irreversível, iii. primeira fase de maturação, iv. segunda fase de maturação e v. dispersão [86]. Cada uma destas fases depende de uma reprogramação da expressão génica, que ocorre em resposta a mudanças do meio envolvente [73]. A adesão inicial envolve a presença de flagelos, os quais permitem o acesso de células planctónicas a uma superfície biótica ou abiótica. Por outro lado, a adesão irreversível envolve a perda de flagelos e a simultânea produção de fímbrias, que promovem a interação com a superfície de adesão. As fases de maturação compreendem a produção de uma matriz extracelular, bem como a formação de uma estrutura tridimensional característica de biofilmes maduros. Por fim ocorre dispersão celular a partir do biofilme maduro para o meio envolvente, havendo um retorno ao modo planctónico [43] (Fig. 8).

A competição por nutrientes, bem como por outros factores de crescimento é um factor importante no desenvolvimento de biofilmes [57]. O aumento da densidade celular favorece a comunicação entre células através de sinais químicos [98]. A

expressão celular individual de diferentes adesinas, receptores e componentes exopoliméricos numa “comunidade” em biofilme pode contribuir para um desenvolvimento global [97]. Muitas bactérias têm a capacidade de usar mecanismos de *quorum sensing* na regulação da formação de biofilmes, gerando um comportamento multicelular coordenado através de pequenas moléculas sinalizadoras [69]. Embora o papel do *quorum sensing* no desenvolvimento de biofilmes, assim como o modo como é activado seja amplamente desconhecido, através deste as bactérias podem beneficiar de acções colectivas e cooperadas face a variadas condições impostas pelo meio envolvente [98].

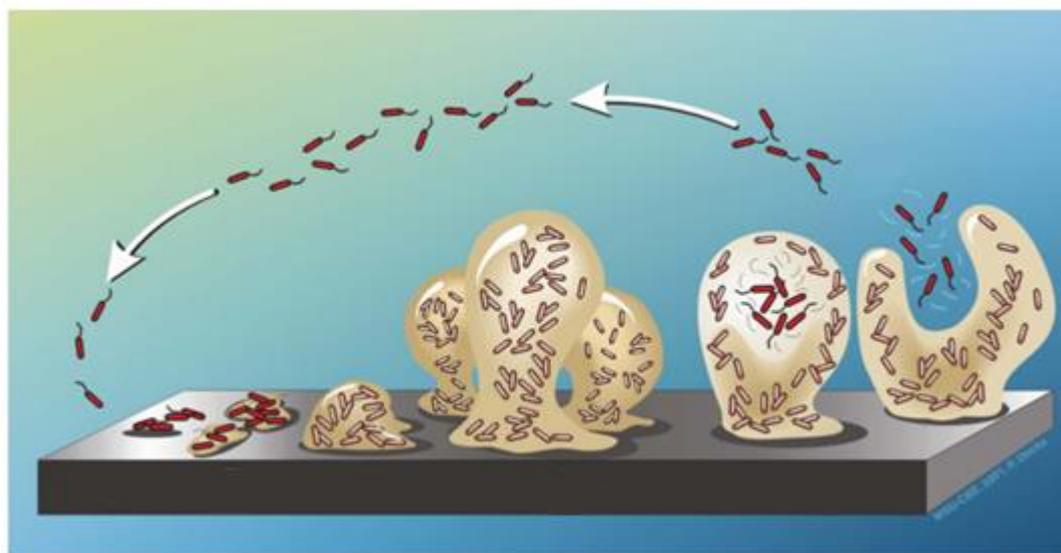


Figura 8 - Etapas do desenvolvimento de biofilmes. O desenvolvimento de biofilmes compreende diferentes fases: adesão celular reversível, adesão celular irreversível, primeira e segunda fase de maturação e dispersão. Cada uma destas fases compreende mecanismos extremamente dinâmicos e complexos que envolvem inúmeros factores. Adaptado de [43].

A transição entre o estado celular planctónico e a formação de biofilmes abrange fases distintas de desenvolvimento, as quais compreendem uma rede de regulação extremamente complexa. O conhecimento mais aprofundado da base genética e molecular da formação de biofilmes constitui um ponto-chave na identificação de alvos terapêuticos essenciais no controlo de infecções. Uma vez que o gene *bolA* está envolvido na formação de biofilmes [95], este poderá constituir um interessante objecto de estudo na análise dos reguladores das vias de síntese de fímbrias e flagelos, tendo em conta a sua presença ou ausência na célula.



MATERIAIS E MÉTODOS

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os materiais e reagentes estão descritos no Anexo I (tabela 11).

2.1 Estirpes e Crescimentos Bacterianos

As estirpes bacterianas usadas neste trabalho estão descritas no Anexo II (tabela 12). Para todas as culturas bacterianas foi utilizado o meio de cultura Luria Broth (LB). Com exceção de alguns casos particulares que serão referidos, todos os crescimentos bacterianos foram efectuados a 37°C e 180 rpm. Quando necessário, o meio de cultura foi suplementado com antibiótico (s), arabinose, c-di-GMP e/ou IPTG. Todos os stocks de longa duração foram feitos em glicerol 10% e armazenados a -80°C.

2.2 Construção de estirpes bacterianas

O delectante no gene *ycgR* foi construído por recombinação homóloga mediada por λ Red [27]. Foram desenhados oligonucleótidos que permitiram a amplificação de uma marca de resistência ao cloranfenicol, de forma a ser possível a selecção dos recombinantes positivos. De forma a promover a recombinação, estes mesmos oligonucleótidos continham uma sequência (40pb) homóloga à região 5' e 3' do gene *ycgR*, bem como 30pb referentes à região inicial e final da ORF do mesmo. Os oligonucleótidos usados foram rnm123 e rnm124 (tabela 14, anexo III).

O fragmento linear a transformar, contendo a cassette de resistência ao cloranfenicol flanqueada por regiões homólogas ao gene *ycgR*, foi amplificado por PCR, usando como molde o DNA genómico (gDNA) da estirpe de *E. coli* MG1655. De forma a minimizar os erros que ocorrem durante qualquer amplificação de DNA por PCR, a reacção foi efectuada com uma polimerase de alta fidelidade com actividade de *proofreading*, a polimerase de DNA *Phusion* (Finnzymes). A mistura de reacção e programa de PCR usados estão descritos na tabela 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1 - Mistura de reacção para amplificação do gene *cm^R*.

Componente	Volume (µl)
DNA molde	1µl
Oligonucleótido rnm123 (10pmol)	1,5µl
Oligonucleótido rnm124 (10pmol)	1,5µl
dNTPs (10µM)	1µl
<i>Buffer Phusion GC 5x</i>	10µl
DMSO	1,5µl
DNA polimerase <i>Phusion</i>	0,6µl
ddH ₂ O	32,9µl
Volume final	50µl

Tabela 2 - Programa de PCR.

Ciclo	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	94°C	5min	1
Desnaturação	94°C	30seg	
<i>Annealing</i>	50°C	30seg	30
Extensão	72°C	1min	

Após amplificação, o produto de PCR foi analisado por electroforese em gel de agarose de concentração 1,5%. A banda correspondente ao tamanho esperado de amplificação foi excisada e purificada com o kit NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel), segundo as instruções do fabricante. A transformação do fragmento obtido foi realizada por electroporação em células electrocompetentes da estirpe bacteriana AB330. Esta estirpe contém parte do plasmídeo termosensível pKD46 integrado no seu genoma, o que permite a expressão da recombinase λ Red, essencial para a recombinação. A preparação de células electrocompetentes e subsequente transformação foi realizada como descrito em 2.5. e 2.6., respectivamente. A mistura de transformação foi plaqueada em meio LA, suplementado com cloranfenicol (50mg/ml), o que permitiu a selecção de clones positivos pela presença do gene de resistência no cromossoma.

De forma a confirmar o resultado da clonagem, o gDNA da estirpe AB330 Δ *ycgR*, foi extraído com o kit Citogene[®] DNA Cell & Tissue (segundo as instruções do

fabricante (Citomed)), e uma pequena região contendo a alteração cromossômica inserida foi amplificada por PCR de acordo com a reação e programa de PCR descritos na tabela 3 e 2, respectivamente.

Tabela 3 - Mistura de reação para amplificação da região a sequenciar.

Componente	Volume (μ l)
gDNA AB330 Δ <i>ycgR</i>	1 μ l
Oligonucleótido rnm135 (10pmol)	1 μ l
Oligonucleótido rnm136 (10pmol)	1 μ l
dNTPs (10 μ M)	1 μ l
<i>Dream taq Buffer 5X</i>	5 μ l
<i>Dream taq Polymerase</i>	0,25 μ l
ddH ₂ O	40,75 μ l
Volume final	50 μl

O produto de PCR específico foi excisado a partir de gel de agarose com uma concentração de 1,5% e purificado com o kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel), segundo as instruções do fabricante. A sequenciação foi realizada pela STAB Vida, usando o oligonucleótido rnm135 (tabela 15, anexo III).

Procedeu-se em seguida à transdução do gDNA da estirpe AB330 Δ *ycgR* para as estirpes de *E. coli* de interesse como descrito em 2.7. Os transductantes foram seleccionados por adição de cloranfenicol (50mg/ml) ao meio LA.

A estirpe bacteriana MG1655 *bolA*::3xFLAG-*kan*^R foi obtida usando o método descrito por Uzzau *et al.* (2001), em que a sequência codificante 3xFLAG e o gene *kan*^R presentes no plasmídeo pSUB11 foram clonados na extremidade 3' do gene *bolA* [93]. Para amplificação do fragmento utilizado para recombinação homóloga, foi desenhado um par de oligonucleótidos tendo em conta diversos factores. O oligonucleótido complementar à cadeia codificante de DNA é constituído por uma região complementar ao gene *bolA* e outra complementar à extremidade 5' do gene que codifica a cauda 3xFLAG. Por sua vez, o oligonucleótido complementar à cadeia não codificante engloba uma pequena região desta vez complementar à zona imediatamente a 3' do códon TAA do gene *bolA* e uma outra à região 3' do gene *kan*^R. Os oligonucleótidos

usados foram rnm112 e rnm114 (tabela 16, anexo III). A sequência codificante de 3xFLAG e do gene *kan^R* foi amplificada por PCR, utilizando como molde o plasmídeo pSUB11 e como polimerase, a enzima de alta fidelidade *Phusion* (Finnzymes). A mistura de reacção e programa de PCR usados estão descritos na tabela 4 e 2, respectivamente.

Tabela 4 - Mistura de reacção para amplificação da sequência codificante de 3xFLAG e *kan^R*.

Componente	Volume (µl)
pSUB11	0,5µl
Oligonucleótido rnm112 (10pmol)	1,5µl
Oligonucleótido rnm114 (10pmol)	1,5µl
dNTPs (10 µM)	1µl
<i>Buffer Phusion GC 5x</i>	10µl
DMSO	1,5µl
DNA polimerase <i>Phusion</i>	0,6µl
ddH ₂ O	33,4µl
Volume final	50µl

O produto de PCR foi visualizado por electroforese em gel de agarose de concentração 1,5%. A banda correspondente ao tamanho esperado de amplificação foi excisada e purificada com o kit NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel), segundo as instruções do fabricante. O produto purificado foi utilizado para transformação por electroporação. Para a selecção de transformantes positivos, estes foram inoculados em meio LA suplementado com canamicina (50mg/ml).

De forma a confirmar o resultado da clonagem, o gDNA da estirpe AB330 *bolA::3xFLAG-kan^R*, foi extraído com o kit Citogene[®] DNA Cell & Tissue (segundo as instruções do fabricante (Citomed)), e uma pequena região contendo a alteração cromossómica foi amplificada por PCR de acordo com a reacção e programa descritos nas tabelas 5 e 2, respectivamente.

Tabela 5 - Mistura de reacção para amplificação da região *bolA::3xFLAG-kan^R*.

Componente	Volume (μ l)
gDNA AB330 <i>bolA::3xFLAG-kan^R</i>	1 μ l
Oligonucleótido rnm115 (10 μ mol)	1 μ l
Oligonucleótido rnm109 (10 μ mol)	1 μ l
dNTPs (10 μ M)	1 μ l
<i>Dream taq Buffer 5x</i>	5 μ l
<i>Dream taq Polymerase</i>	0,25 μ l
ddH ₂ O	40,75 μ l
Volume final	50 μ l

O produto de PCR específico foi excisado a partir de gel de agarose a 1,5% e purificado com o kit NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel), segundo as instruções do fabricante. A sequenciação foi realizada pela STAB Vida, utilizando o oligonucleótido X9 (tabela 18, anexo III).

A construção efectuada foi transferida da estirpe AB330 *bolA::3xFLAG-kan^R* para a estirpe MG1655 como descrito em 2.7. Para selecção dos transductantes positivos adicionou-se canamicina (50mg/ml) ao meio de crescimento.

2.3 Preparação de Células Competentes

Uma cultura em fase estacionária foi diluída para uma OD₆₀₀ igual a 0,1 em meio fresco e incubada até atingir uma OD₆₀₀ entre 0,3 e 0,5. Ao atingir a OD₆₀₀ pretendida a cultura foi centrifugada durante 10min a 3824g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células suavemente ressuscitado em 1ml de CaCl₂ 0,1M. A suspensão foi incubada em gelo durante 30min e novamente centrifugada sob as condições acima referidas. O sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado de células ressuscitado em 200 μ l de CaCl₂ 0,1M. As células competentes resultantes foram imediatamente transformadas com o DNA de interesse.

2.4 Transformação de Células Competentes

O DNA a transformar foi adicionado a 200µl de células competentes (2.3). A mistura de transformação foi incubada 30min em gelo, sendo em seguida sujeita, durante 2min, a um choque térmico a 42°C. Imediatamente após o choque térmico foram adicionados 600µl de meio LB e as amostras foram incubadas a 37°C durante 1h. As células foram plaqueadas em meio LA, suplementado com o respectivo antibiótico de selecção, e incubadas durante 16h a 37°C.

2.5 Preparação de Células Electrocompetentes

Um pré-inóculo foi preparado em 10ml de meio SOC e incubado a 30°C, com agitação. Após 16h de crescimento a cultura de células foi diluída para uma OD₆₀₀ igual a 0,05 em 200ml de meio SOC fresco e incubada, sob as mesmas condições, até atingir uma OD₆₀₀ de aproximadamente 0,5. Ao atingir a OD₆₀₀ pretendida a cultura de células foi incubada durante 30min em gelo. Seguidamente, foram realizadas quatro centrifugações a 4°C, durante 15min a 4640g cada, entre as quais o precipitado de células foi ressuscitado em 200ml de H₂O estéril, 100ml de H₂O estéril e 4ml de glicerol 10%, sendo que todas as soluções utilizadas estavam a 4°C. Após a última centrifugação o precipitado foi ressuscitado em 500µl de glicerol 10% a 4°C, sendo as células competentes distribuídas em alíquotas de 50µl e congeladas imediatamente a -80°C.

2.6 Transformação por Electroporação

O DNA de interesse foi adicionado às células electrocompetentes (2.5), previamente descongeladas em gelo, num volume máximo correspondente a 10% do volume total de células competentes a electroporar. A suspensão foi transferida para uma cuvette de electroporação (Biorad), previamente colocada em gelo. O equipamento utilizado para electroporação foi o Gene Pulsar Xcell™ (Biorad). Os parâmetros

utilizados foram: 25 μ F, 2,5kV e 200 Ω . As células foram imediatamente incubadas em 800 μ l de meio SOC, suplementado com 0,4% glucose, a 30°C durante 1h. Após a fase de recuperação as células foram plaqueadas em meio LA, suplementado com o respectivo antibiótico de selecção, e incubadas durante 16h a 30°C.

2.7 Transdução Generalizada

A transferência de gDNA (DNA genómico) de interesse, da estirpe dadora para a receptora, foi realizada por transdução generalizada, usando o bacteriófago P1.

Um pré-inóculo, referente à estirpe dadora, foi preparado em 5ml de meio LB e incubado durante 16h, a 37°C com agitação. Após 16h de crescimento, 50 μ l do pré-inóculo foram diluídos em 5ml de meio fresco, suplementado com 0,4% glucose e 0,01M CaCl₂. A cultura bacteriana foi em seguida incubada durante 30min, a 37°C com agitação. Após 30min, adicionou-se 100 μ l de bacteriófago P1 à cultura e incubou-se durante 2h a 37°C, com agitação. Posteriormente, adicionou-se 100 μ l de clorofórmio (Sigma), sendo a cultura homogeneizada vigorosamente com auxílio do vortex, de forma a favorecer a lise. Seguiu-se um passo de centrifugação a 4°C, durante 10min a 19357g, recolhendo-se posteriormente o sobrenadante ao qual se adicionou 12 μ l de clorofórmio, armazenando-se o lisado resultante a 4°C. O procedimento descrito foi repetido mais duas vezes, de forma a obter um segundo e terceiro lisado. Assim, para obtenção do segundo lisado, a uma nova cultura proveniente do pré-inóculo, foram adicionados 200 μ l do bacteriófago P1 obtido durante o procedimento do primeiro lisado. A obtenção do terceiro lisado foi realizada por adição de 400 μ l do bacteriófago P1 obtido no passo anterior. A transdução do gDNA de interesse para a estirpe receptora foi realizado utilizando a população de bacteriófagos obtidos a partir do terceiro lisado.

A transdução para a estirpe receptora foi efectuada como se segue: 2ml de cultura de um pré-inóculo referente à estirpe receptora foram centrifugados 10min a 1500g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células ressuspendido em 1ml de meio LB suplementado com 0,01M MgSO₄ e 0,005M CaCl₂. Posteriormente, 100 μ l de células da estirpe receptora foram inoculados com 10 μ l, 50 μ l, 100 μ l e 200 μ l do terceiro lisado, obtido no passo anterior. Após incubação, a 37°C durante 30min, foi adicionado a cada uma das amostras 300 μ l de citrato de sódio 1M, seguindo-se uma segunda

incubação a 37°C durante 1h. Após o tempo de incubação as amostras foram centrifugadas 3min a 3000g e o precipitado de células foi ressuspensionado em 100µl de sobrenadante. Os transdutantes foram plaqueados em meio LA, suplementado com o respectivo antibiótico de selecção, e incubados 16h a 37°C.

2.8 Determinação de Curvas de Crescimento Bacterianas

Um pré-inóculo foi diluído para uma OD₆₀₀ igual a 0,1 num volume final de 20ml de meio LB. O inóculo foi incubado a 37°C, com agitação igual a 180rpm, sendo as OD₆₀₀ recolhidas a cada 30 e/ou 60min, até ser atingida a fase estacionária de crescimento.

2.9 Microscopia de Contraste de Fase

Para a observação de células por microscopia, teve-se como base as curvas de crescimento obtidas para as diferentes estirpes bacterianas. Assim, foram previamente determinados tempos de interesse de acordo com a fase de crescimento das células. Para cada tempo, foi recolhido 1 volume de cultura, o qual foi diluído em 4 volumes de PBS 1X (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8,1mM Na₂HPO₄, 1,47mM KH₂PO₄), sendo 5µl desta diluição colocados entre lâmina e lamela. De forma a fixar a amostra, a lâmina foi previamente revestida com uma solução aquosa com 1% de agarose. As imagens foram obtidas usando o Microscópio DMRB (Leica) numa óptica de contraste de fase, com o software Leica.

2.10 Ensaios de Motilidade Bacteriana

Para os testes de motilidade bacteriana, uma cultura em fase estacionária de crescimento foi diluída em 5ml de meio LB suplementado, quando necessário, com antibiótico e/ou 1µM de c-di-GMP, e incubada a 37°C com agitação até atingir uma OD₆₀₀ de aproximadamente 0,45. Ao ser atingida a fase exponencial de crescimento, 1µl

de cultura foi inoculado em meio semi-sólido de Triptona (1% Triptona, 0,5% NaCl, 0,35% agar) [4] e incubado a 37°C.

Fotografias foram recolhidas no sistema ChemiDoc™ XRS+ (Biorad).

2.11 Extração de RNA Total

Uma cultura de células em fase estacionária de crescimento foi diluída para uma OD₆₀₀ de 0,1 e incubada com agitação a 37°C. Foram recolhidos 2ml de cultura quando as estirpes atingiram a fase exponencial e estacionária de crescimento. As células foram centrifugadas a 4°C, durante 10min a 14000g. De seguida o precipitado celular foi ressuspenso em 1ml de Trizol (Sigma) e transferido para um novo tubo com 0,4g de *Glass beads* (Sigma). A suspensão foi homogeneizada vigorosamente durante 45seg usando o FastPrep®-24 (Zymo Research), de forma a promover a lise. Após a lise celular a amostra foi centrifugada 5min a 14000g e o sobrenadante transferido para um novo tubo com 1ml de Etanol 100%.

A extração de RNA foi efectuada utilizando o kit Direct-zol™ RNA MiniPrep (Zymo Research), segundo as instruções do fabricante. O RNA total foi eluído em 50µl de H₂O RNase Free (Zymo Research) e quantificado no aparelho Nanodrop 1000 (Thermo).

De forma a confirmar a ausência de gDNA na amostra, foi realizado PCR usando a amostra de RNA total extraída como molde e um par de oligonucleótidos dirigidos para a região codificante dos genes de interesse. A mistura de reacção e programa de PCR usados estão descritos na tabela 6 e 2, respectivamente. O produto de PCR foi visualizado por electroforese em gel de agarose de concentração 1,5%. Nos casos em que se verificou a amplificação de gDNA contaminante foi realizado o tratamento da amostra com o kit Turbo DNA-free™ (Ambion), segundo as instruções do fabricante. Resumidamente, a 5µg da amostra de RNA total foram adicionados 2,5µl de tampão Turbo DNase 10X (Ambion) e 0,5µl da enzima Turbo DNase (Ambion). A mistura foi incubada a 37°C durante 1h. Procedeu-se em seguida à inactivação da enzima por adição de 2,8µl de tampão DNase *inactivation* (Ambion) e incubou-se durante 5min à temperatura ambiente. Por fim, a amostra foi centrifugada durante 5min a 10000g, sendo 20µl do sobrenadante recuperados para um novo tubo.

Tabela 6 - Mistura de reacção para confirmar a pureza das amostras de RNA total.

Componente	Volume (μl)
RNA	1 μ l
Oligonucleótido (10 μ mol)	1 μ l
Oligonucleótido (10 μ mol)	1 μ l
dNTPs (10 μ M)	1 μ l
<i>Dream taq Buffer, 5X</i>	5 μ l
<i>Dream taq Polymerase</i>	0,25 μ l
ddH ₂ O	40,75 μ l
Volume final	50μl

2.12 Transcrição Reversa

A transcrição reversa das amostras de RNA em cDNA (DNA complementar) foi realizada com o kit Quantitect® Reverse Transcription (Quiagen). Este kit permite a realização de um passo adicional de eliminação de gDNA por incubação da amostra de RNA em *gDNA Wipeout Buffer 7X*, como descrito na tabela 7, durante 2min a 42°C.

Tabela 7 - Mistura de reacção para eliminação de gDNA.

Componente	Volume
<i>gDNA Wipeout Buffer 7X</i>	2 μ l
RNA	1 μ g
H ₂ O RNase Free	x μ l
Volume total de reacção	14μl

Após a eliminação de gDNA, procedeu-se à transcrição reversa das amostras de RNA, como descrito na tabela seguinte:

Tabela 8 - Mistura de reacção para Transcrição Reversa.

Componente	Volume
<i>Quantiscript Reverse Transcriptase</i>	1µl
<i>Quantiscript RT Buffer 5X</i>	4µl
<i>RT Primer Mix</i>	1µl
RNA	14µl*
Volume total de reacção	20µl

*Volume total da mistura de reacção para eliminação de gDNA.

A reacção foi efectuada a 42°C durante 30min, seguida de inactivação da enzima RT a 95°C durante 3min. O cDNA obtido foi guardado a -20°C.

2.13 PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

O PCR quantitativo foi realizado com o kit SensiFAST™SYBR (Bioline), segundo as normas do fabricante. O cDNA foi utilizado como molde para amplificação de DNA dos genes de interesse descritos na tabela 19 (anexo III). Na mesma tabela encontram-se descritos os oligonucleótidos usados para a amplificação do respectivo gene. Os volumes utilizados em cada reacção estão descritos na tabela 9.

Tabela 9 - Mistura de reacção para realização de qRT-PCR.

Componente	Volume
<i>2x SensiFast Mix</i>	10µl
Oligonucleótido <i>Forward</i> (10pmol)	0,5µl
Oligonucleótido <i>Reverse</i> (10pmol)	0,5µl
H ₂ O	xµl
cDNA	50ng
Volume total de reacção	20µl

O PCR em tempo real foi efectuada no aparelho Rotor-Gene 3000 (Corbett) nas condições descritas na tabela 10.

Tabela 10 - Programa utilizado na amplificação quantitativa de cDNA.

Etapa do ciclo	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	95°C	2min	1
Desnaturação	95°C	5seg	
<i>Annealing</i>	60°C	10seg	40
Extensão	72°C	20seg	
<i>Melt</i>	72°-95°C	5min	1

O nível de expressão génica foi calculado a partir do Método Comparativo C_T . Este método, também designado de $\Delta\Delta C_T$ baseia-se numa fórmula aritmética que compara o valor C_T do gene de interesse com o gene de referência [59]:

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{-(C_{T_{\text{Calibrador}}} - C_{T_{\text{Gene de referência}}}) - (C_{T_{\text{gene alvo}}} - C_{T_{\text{Gene de referência}}})}$$

C_T representa o ciclo em que se inicia a amplificação exponencial do gene de interesse.

2.14 Imunoprecipitação da Cromatina e Sequenciação

(*Chromatin Immunoprecipitation Sequencing, ChIP-seq*)

Um pré-inóculo referente às estirpes MG1655 *bolA::3xFLAG-kan^R* e MG1655 Δ *bolA* foi diluído em 15ml de meio LB fresco para uma OD_{600} igual a 0,1 e incubado até ser atingida uma OD_{600} de aproximadamente 0,5. Ao ser atingida a fase exponencial foi adicionado tampão Fosfato de Sódio e Formaldeído (Sigma), para uma concentração final de 10mM e 1%, respectivamente. As amostras foram incubadas 10min à temperatura ambiente e de seguida 30min em gelo, seguindo-se uma centrifugação de 30min a 1301g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células ressuscitado em 20ml de PBS 1X. Procedeu-se a uma segunda centrifugação nas mesmas condições e mais uma vez o precipitado de células foi ressuscitado em 20ml de PBS 1X. Após a última centrifugação as células foram ressuscitadas em 450 μ l de tampão TES (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 100mM NaCl), adicionando-se em seguida 20 μ l de Solução de Lise (250U/ μ l Lisozima, 25% Glicerol, 50mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 1mM DTT, 0,1% Triton X-100). A solução foi suavemente homogeneizada e incubada 5min à

temperatura ambiente. Adicionou-se 10µl de *Complete EDTA Free Protease* (Roche) e homogeneizou-se suavemente a amostra, a qual foi incubada 10min à temperatura ambiente. Por fim, foram adicionados 550µl de tampão ChIP (1,1% Triton X-100, 1,2mM EDTA, 16,7mM Tris-HCl, 167mM NaCl, 20µg/ml Inibidor de Protease) e incubou-se a amostra 10min a 37°C.

O lisado obtido foi processado utilizando um sonicador (Sonicador UP200S-Hirlscher), de forma a serem obtidos fragmentos de DNA, em média, com 100 a 700pb. Os parâmetros utilizados foram: 55% de amplitude e um pulso de 0,45seg; sendo realizados cinco ciclos de sonicação durante 10seg, entre os quais, as amostras foram colocadas 50seg em gelo, de forma a evitar o seu sobreaquecimento. De seguida, as amostras foram centrifugadas a 4°C, durante 3min a 20000g e o sobrenadante recuperado para um novo tubo.

As *beads* (*a-Flag-agarose beads* (Sigma)) utilizadas para a purificação dos complexos proteína-DNA foram tratadas da seguinte forma: foram realizadas duas lavagens com TBS 1X (50mM Tris Base, 150mM NaCl), entre e após as quais, foi efectuada uma centrifugação de 1min a 20000g. De seguida, ressuspendeu-se em 120µl de tampão ChIP, adicionando-se em seguida 1,3mg/ml tRNA, de forma a evitar possíveis ligações inespecíficas, e 1,5mg/ml de BSA. A mistura foi incubada durante 1h a 4°C, com suave agitação. As *beads* saturadas foram centrifugadas 1min a 20000g, recuperando-se apenas o precipitado. Em seguida foi adicionado o DNA obtido anteriormente e a mistura foi incubada durante 16h a 4°C, com agitação suave. Após 16h realizou-se uma centrifugação de 5min a 20000g, descartando-se o sobrenadante e prosseguindo-se com cinco lavagens consecutivas e intervaladas com centrifugações da mistura *beads*+proteína-DNA, utilizando 1ml de cada um dos seguintes tampões de lavagem:

- Tampão de baixa concentração salina (0,1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl, 150mM NaCl) a 4°C;
- Tampão de alta concentração salina (0,1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl, 500mM NaCl) a 4°C;
- Tampão LiCl (25mM LiCl, 1% NP-40, 1% *Deoxycholate*, 1mM EDTA, 10mM Tris-HCl) a 4°C;

- Tampão TE (10mM Tris-HCl , 1mM EDTA) a 4°C;
- Tampão TE à temperatura ambiente.

Procedeu-se à eluição do complexo proteína-DNA das *beads* por adição de 250µl de tampão de eluição (1% SDS, 100mM NaHCO₃), incubando-se durante 15min à temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada 5min a 20000g e o sobrenadante recolhido para um novo tubo. O processo de eluição foi repetido e ao volume total de eluído foram adicionados 0,3M NaCl, incubando-se durante 16h a 65°C, de forma a reverter o *cross-link* proteína-DNA. Após 16h, adicionou-se 0,004M EDTA, 0,04M Tris-HCl (pH 6.5) e 0,04mg/ml Proteinase K (Sigma) e a amostra foi incubada 2h a 45°C.

A extracção de DNA foi realizada por adição de 1ml de Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico (25:24:1 (Sigma)) à amostra, a qual foi homogeneizada e incubada 5min à temperatura ambiente. Seguiu-se uma centrifugação de 5min a 10000g, após a qual a fase aquosa, contendo o DNA, foi recolhida. Foram adicionados 20µg de Glicogénio e 0,1 volumes de NaAc 3M (pH 5.2). A amostra foi homogeneizada e 2 volumes de Etanol 100% foram adicionados, incubando-se durante 2h a -80°C. A amostra foi centrifugada 5min a 20000g e o sobrenadante descartado, sendo realizada uma lavagem com Etanol 75%, seguida de centrifugação nas mesmas condições. Por fim, o precipitado de DNA foi ressuscitado em 50µl de H₂O (Sigma) e a concentração da amostra medida no aparelho Nanodrop 1000 (Thermo).

Por fim, as amostras foram enviadas para a Fasteris SA, Suíça, empresa que efectuou a sequenciação de DNA e respectivo tratamento bioinformático.

2.15 Extracção de proteína total

Para obtenção de extractos totais proteicos foram recolhidos 2ml de cultura. As amostras recolhidas foram centrifugadas a 4°C, durante 10min a 20000g, sendo o precipitado celular ressuscitado em 100µl de reagente Bugbuster (Novagen) e homogeneizando-se vigorosamente de forma a favorecer a lise. A suspensão foi incubada 10min à temperatura ambiente e centrifugada sob as mesmas condições. O

sobrenadante foi recolhido e a concentração dos extractos totais proteicos quantificados no aparelho Nanodrop 1000 (Thermo).

2.16 Western Blot

Para análise por *Western Blot*, 40µg de extracto total proteico contendo *Protein Loading Buffer* (suplementado com 0,2M DTT) foram aplicados num gel de Poliacrilamida 10% após desnaturação durante 5min a 100°C. A migração electroforética foi realizada em tampão de corrida SDS-PAGE (0,1% SDS, 25mM Tris Base, 192mM Glicina), a 150V durante 1h.

As proteínas separadas em gel de SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare) em tampão de transferência (0,1% SDS, 25mM Tris Base, 190mM Glicina, 20% Metanol) durante 30min a 15V, no sistema Trans-Blot®SD Cell (BioRad). De forma a garantir que a transferência foi completa, o gel de SDS-PAGE foi corado com Azul de *Comassie*.

Procedeu-se ao bloqueio da membrana de nitrocelulose, de forma a prevenir possíveis interacções inespecíficas, incubando-se a mesma em PBS 1X contendo 5% de leite, durante 1h com agitação. A solução de bloqueio foi descartada, sendo adicionado anticorpo primário anti-Bola (anexo IV), numa diluição de 1:150 em PBS 1X. Como controlo do *loading* proteico simultaneamente à adição de anticorpo anti-Bola foi adicionado anticorpo anti-GroEL (Abcam) numa diluição de 1:10000 em PBS 1X. Após 1h de incubação com agitação, foram realizadas duas lavagens com PBS 1X, durante 10min, sob as mesmas condições. De seguida a membrana foi incubada durante 1h, com agitação, com anticorpo secundário, anti-Mouse (GE Healthcare) conjugado com fosfatase alcalina, numa diluição de 1:10000 em PBS 1X. Após incubação com o anticorpo secundário, foram realizadas duas lavagens com PBS 1X durante 10min, nas condições acima referidas. A membrana foi incubada, durante 1min à temperatura ambiente, com a mistura de reagentes do kit *Western Lightning Plus ECL* (PerkinElmer), num rácio de 1:1, procedendo-se, por fim, à sua visualização com o sistema ChemiDoc™ XRS+ (BioRad).

2.17 Quantificação dos níveis intracelulares de c-di-GMP

Uma cultura em fase estacionária de crescimento foi diluída para uma OD₆₀₀ igual a 0,1 em meio fresco e incubada até atingir uma OD₆₀₀ de aproximadamente 0,5. Ao ser atingida a OD₆₀₀ pretendida foi adicionada à cultura 0,15% de arabinose e incubou-se novamente a 37°C, com agitação. Após 3h a OD₆₀₀ da cultura foi determinada e 5ml da mesma foram recolhidos e centrifugados a 2500g durante 20min, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células ressuscitado em 1ml de meio fresco. A suspensão foi centrifugada nas mesmas condições, sendo o precipitado celular ressuscitado em 300µl de solução de extracção (Acetonitrilo, Metanol, H₂O 2:2:1 (v/v/v)) e incubado 15min em gelo. Seguiu-se uma incubação durante 10min a 95°C, após a qual a suspensão foi arrefecida em gelo e centrifugada a 20800g durante 10min, a 4°C. O sobrenadante foi recolhido para o novo tubo, repetindo-se em seguida o processo de extracção duas vezes. Para tal o precipitado celular foi ressuscitado em 200µl de solução de extracção e incubado durante 15min em gelo, seguindo-se uma centrifugação a 20800g durante 10min a 4°C, após a qual o sobrenadante foi recolhido. A amostra resultante dos três passos de extracção foi incubada a -20°C durante 16h. Por fim a amostra foi centrifugada nas condições acima mencionadas e o sobrenadante transferido para um novo tubo.

Os extractos finais foram desidratados no aparelho Speed Vac Concentrator (Savant) e quantificados por *Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry* (LC-MS/MS) no *Research Core Unit Mass Spectrometry – Metabolics*, Hannover.



RESULTADOS

3. RESULTADOS

A proteína Bola de *E. coli* tem sido descrita pelos seus efeitos pleiotrópicos que afectam diversas funções celulares. Estudos anteriores realizados no nosso laboratório estimaram o impacto fisiológico desta proteína, em fase exponencial de crescimento, através da análise global de transcritos por *microarrays*. Esta análise foi efectuada através da comparação de duas estirpes de *E. coli*, ambas com uma deleção cromossomal no gene *bola* e, uma das quais, cuja expressão deste mesmo gene se encontra sob o controlo de um promotor presente no plasmídeo pBAD, indutível pela adição de arabinose ao meio de cultura. Em condições favoráveis de crescimento, como em fase exponencial, os efeitos da proteína Bola não são perceptíveis ou tão acentuados como em fase estacionária. Contudo, face a uma situação de stresse, mesmo que em fase exponencial, este gene é induzido de forma equivalente a células em fase estacionária de crescimento[84]. Assim, de forma a simular uma resposta a stresse em fase exponencial, a expressão do gene *bola* foi induzida no início desta fase de crescimento. Os resultados obtidos demonstraram, nas condições testadas, a expressão diferencial de diferentes classes de genes envolvidos em múltiplas funções celulares. Curiosamente, a análise bioinformática dos *microarrays* revelou, de forma significativa, que quando os níveis de Bola aumentam, há uma regulação negativa de vários genes envolvidos na motilidade celular, uma grande parte dos quais envolvidos na síntese de flagelos (Fig. 9).

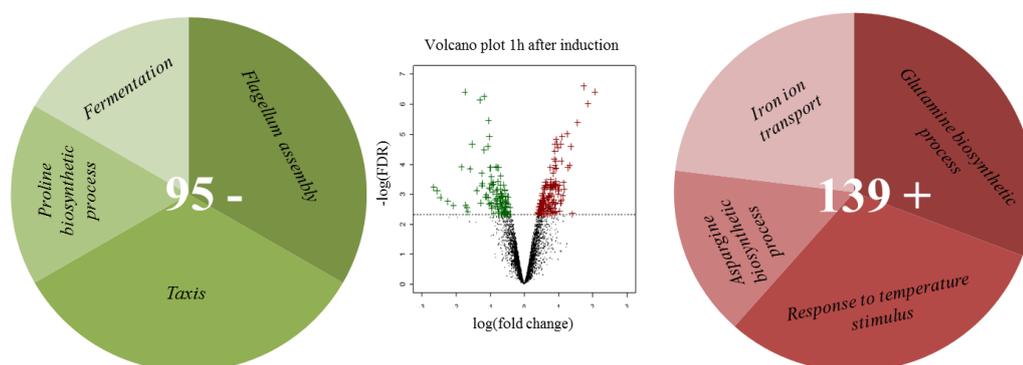


Figura 9 - Representação da análise global de transcritos por *microarrays*. A análise bioinformática dos *microarrays* demonstrou que 1h após a indução da sobre-expressão do gene *bola* em fase exponencial de crescimento a expressão diferencial de diferentes classes de genes é modulada transcricionalmente de uma forma dependente da proteína Bola. Os gráficos circulares verde e vermelho representam, respectivamente, as classes de genes regulados negativa e positivamente pela proteína Bola, de forma significativa.

3.1 A proteína Bola afecta a motilidade bacteriana

O padrão de regulação obtido a partir da análise do transcriptoma sugere o potencial papel do gene *bolA* na regulação da motilidade celular. De forma a elucidar o papel deste gene na síntese e função flagelar em *E. coli*, foram realizados ensaios de motilidade (*swimming*) em meio semi-sólido de Triptona. Nestes ensaios, a capacidade de *swimming* de uma estirpe *wt* de *E. coli* (MG1655) foi comparada com uma estirpe delectante no gene *bolA* (MG1655 $\Delta bolA$), bem como com duas estirpes que sobre-expressam este mesmo gene. Na primeira, o gene *bolA* e os seus promotores foram clonados num plasmídeo de médio número de cópias (MG1655+pMAK580). Na segunda foi utilizado o plasmídeo mencionado acima na experiência de *microarrays* (MG1655+pBAD-*bolA*).

Quando comparadas com a estirpe *wt*, as estirpes MG1655+pMAK580 e MG1655+pBAD-*bolA* revelaram uma diminuição da motilidade, sendo esta diminuição mais acentuada na última estirpe referida (Fig. 10). Este resultado indica um papel do gene *bolA* na regulação negativa da motilidade celular em *E. coli*, o qual vai de encontro aos resultados obtidos na análise do transcriptoma. Inesperadamente, a estirpe delectante no gene *bolA*, quando comparada com a estirpe *wt*, demonstrou um fenótipo semelhante ao verificado na presença de elevados níveis de expressão deste gene, reduzindo a motilidade celular (Fig. 10).

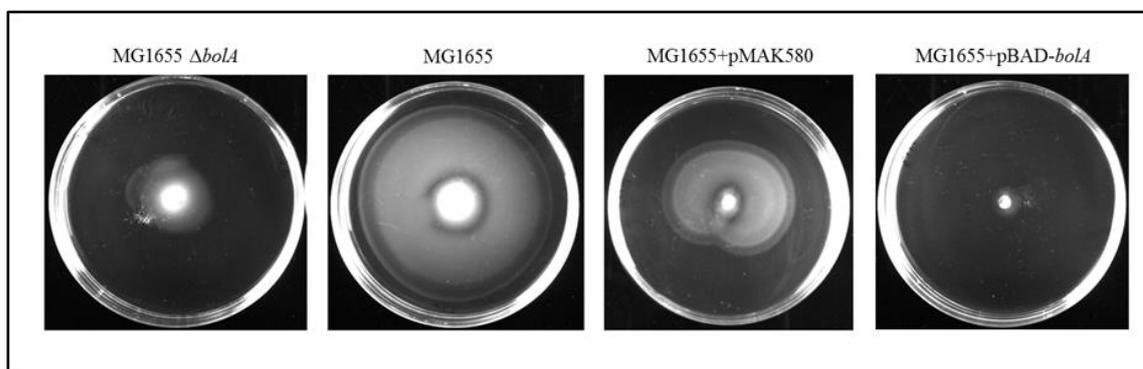


Figura 10 - A expressão diferencial do gene *bolA* afecta a motilidade em *E. coli*. Análise da capacidade de *swimming* face a diferentes níveis de expressão do gene *bolA*. As placas contendo 0,35% de agar foram inoculadas com 1 μ l de cultura e incubadas a 37°C durante aproximadamente 16h.

A inibição da motilidade celular, na presença de elevados níveis da proteína BolA, poderá estar relacionada quer com a regulação negativa da biogénese flagelar como com um estado não funcional dos flagelos, ou seja, a cascata de síntese flagelar não é afectada mas, por outro lado, poderá haver uma não funcionalidade ao nível da rotação flagelar. Analisando de forma mais pormenorizada os resultados da análise bioinformática do transcriptoma verifica-se que a expressão de muitos dos genes envolvidos na síntese de flagelos é negativamente regulada aquando da sobre-expressão do gene *bolA* (Fig. 11). Com principal destaque verifica-se que na presença de níveis elevados da proteína BolA, a expressão do principal regulador da biogénese flagelar, o complexo proteico FlhDC, é significativamente reprimida. Verificou-se ainda uma variação negativa na expressão de importantes genes de classe II e III na presença de elevados níveis desta proteína, como o gene *fliA*, o qual codifica o factor de transcrição σ^F , crucial na expressão de genes de classe III [24]. É ainda importante realçar o facto da expressão dos genes que codificam para as proteínas FliG, FliM e FliN, constituintes do rotor flagelar [16], variar de forma negativa. Posto isto, esta análise vai de encontro aos resultados obtidos nos ensaios de motilidade acima mencionados, nos quais se observou uma capacidade de motilidade celular diminuída na presença de níveis elevados da proteína BolA, relativamente à estirpe *wt*.

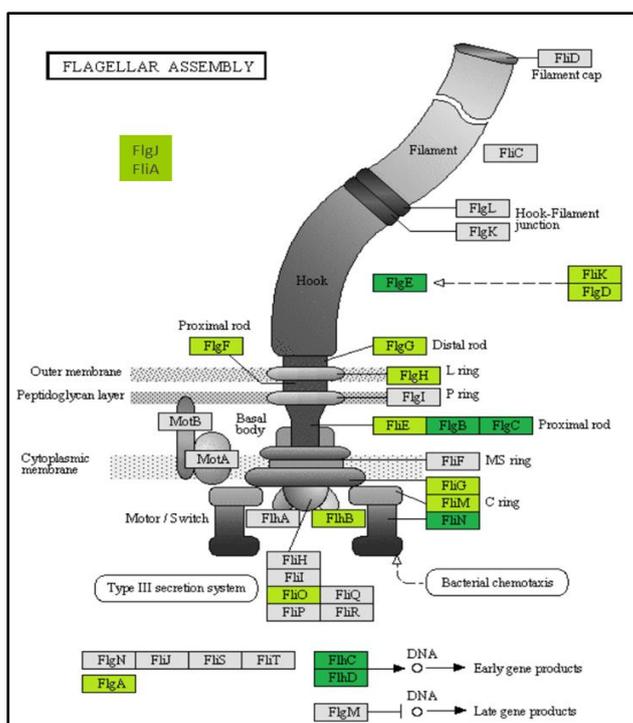


Figura 11 - Cascata de biogénese flagelar acoplada aos resultados obtidos na análise do transcriptoma. A análise de transcritos por *microarrays* revela a regulação negativa da expressão de genes de classe I, II e III envolvidos na biogénese flagelar face a elevados níveis da proteína BolA. Os genes cuja expressão variou, nas condições referidas, encontram-se marcados a verde claro e escuro, sendo a variação da expressão dos últimos considerada estatisticamente significativa. Adaptado de <http://www.genome.jp/kegg/>.

No entanto, como já referido, é curioso o facto da estirpe delectante no gene *bolA* ter revelado um fenótipo de motilidade semelhante à estirpe que sobre-expressa este mesmo gene (Fig. 10).

3.2 Construção do delectante simples no gene *ycgR* e duplo nos genes *bolA* e *ycgR*

Diversos estudos demonstram a importância da proteína YcgR ao nível da funcionalidade do motor flagelar [14]. Posto isto, de forma a verificar se a proteína BolA está a influenciar a expressão desta proteína conferindo consequentemente uma alteração do fenótipo de motilidade, procedeu-se à construção de um delectante duplo nos genes *bolA* e *ycgR*.

A estirpe delectante no gene *ycgR* foi construída através da amplificação por PCR do gene de resistência ao cloranfenicol flanqueado por regiões homólogas ao gene a delectar (Fig. 12A).

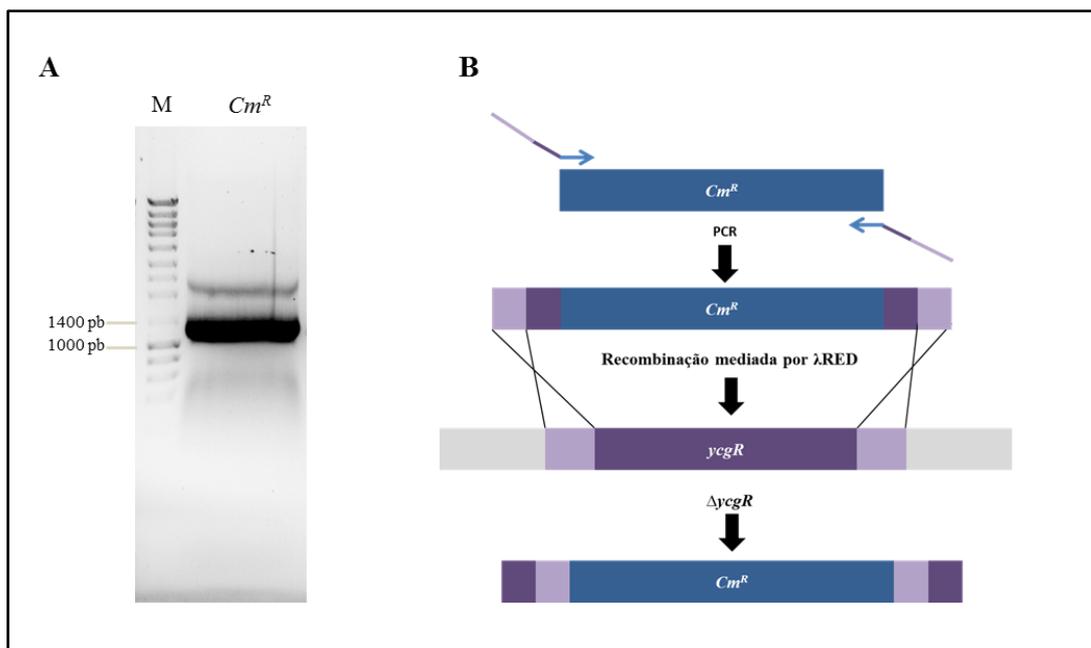


Figura 12 – Esquematização da construção da estirpe MG1655 Δ *ycgR*. A - Produto de amplificação do gene *cm^R* flanqueado por regiões homólogas ao gene *ycgR*. A visualização do produto de amplificação (\approx 1400 pb) foi realizada em gel de agarose de concentração 1,5%, usando brometo de etídio como corante. (M) Marcador de peso molecular comercial NZYDNA Ladder III (Nzytech). B – A construção da estirpe delectante no gene foi realizada pela recombinação homóloga mediada por λ Red entre os genes *cm^R* e *ycgR* [27].

O produto de PCR foi transformado e integrado no cromossoma da estirpe AB330, a qual possui parte do plasmídeo termosensível pKD46 integrado no seu genoma, permitindo a expressão da recombinase λ Red. O gDNA, delectante no gene *ycgR*, foi transferido para as estirpes MG1655 e MG1655 Δ *bolA* por transdução generalizada utilizando o bacteriófago P1, sendo os clones positivos seleccionados por resistência ao cloranfenicol (Fig. 12B).

3.3 Velocidade relativa de *swimming* entre as estirpes MG1655 e MG1655 Δ *ycgR*

Com base em dados publicados, sabe-se que a proteína YcgR reduz gradualmente a velocidade de *swimming* através da interacção directa com a proteína MotA, constituinte do motor flagelar [14]. De forma a verificar se a estirpe delectante no gene *ycgR* produz o fenótipo esperado, foram realizados ensaios de motilidade, em meio semi-sólido de triptona, nos quais se comparou a velocidade de *swimming* desta mesma estirpe com uma estirpe *wt* de *E. coli*. Para realização dos ensaios cada estirpe foi inoculada, em fase exponencial de crescimento, tanto isoladamente, como em conjunto na mesma placa. De forma a avaliar a velocidade relativa de *swimming* as placas foram incubadas a 37°C até uma das referidas estirpes preencher toda a sua área, processo que decorreu num total de 22h.

O resultado dos ensaios de motilidade revelou o fenótipo esperado, em que a estirpe MG1655 Δ *ycgR*, sob as mesmas condições e período de incubação, demonstrou uma velocidade de *swimming* superior, quando comparada com a estirpe *wt*, MG1655 (Fig. 13). A avaliação da velocidade relativa de motilidade entre as duas estirpes inoculadas na mesma placa permitiu verificar que as alterações fenotípicas observadas não se devem a diferenças do meio de *swimming*.

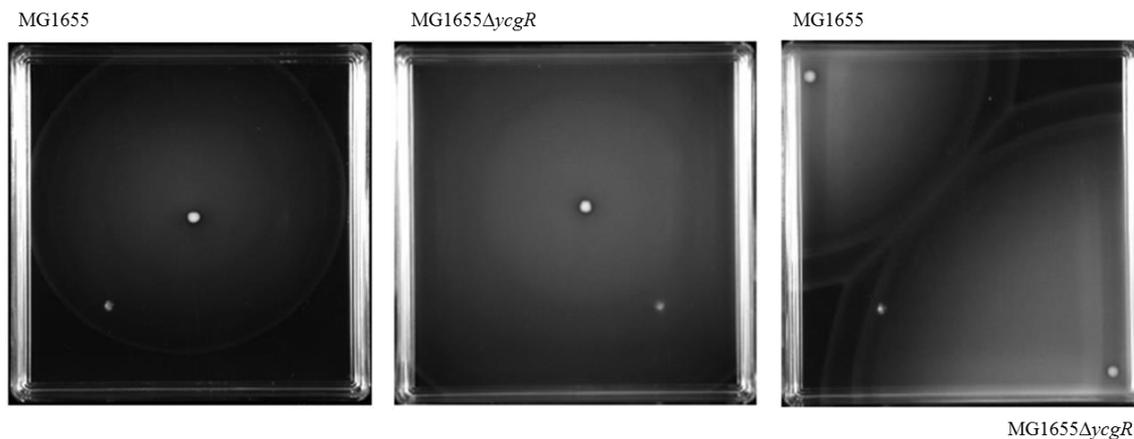


Figura 13 - Comparação da velocidade de *swimming* entre as estirpes de *E. coli* MG1655 e MG1655 $\Delta ycgR$. As placas de *swimming* contendo 0,35% de agar foram inculadas com 1 μ l de cultura e incubadas a 37°C até uma das estirpes preencher toda a área da placa.

3.4 A regulação da expressão do gene *ycgR* é independente da proteína Bola

Tendo como base os resultados obtidos na secção 3.1, que demonstram um fenótipo de motilidade semelhante entre a estirpe delectante no gene *bolA* e a que sobre-expressa este mesmo gene, foi colocada a hipótese da proteína Bola poder estar a influenciar a funcionalidade do motor flagelar, via YcgR. Visando elucidar esta hipótese foram realizados ensaios de motilidade, comparando a estirpe delectante no gene *bolA* (MG1655 $\Delta bolA$) com o delectante duplo nos genes *bolA* e *ycgR* (MG1655 $\Delta bolA \Delta ycgR$).

Os ensaios de motilidade foram realizados em meio semi-sólido de triptona no qual as estirpes foram inoculadas em extremidades opostas da mesma placa e incubadas a 37°C durante aproximadamente 24h. No caso da hipótese colocada ser verdadeira seria de esperar que o fenótipo de motilidade observado na estirpe delectante no gene *bolA* fosse revertido pelo delectante duplo. No entanto, os resultados obtidos (dados não apresentados) não demonstraram reprodutibilidade, revelando por vezes o delectante duplo um fenótipo semelhante à estirpe delectante no gene *bolA*, impossibilitando a sua compreensão. Contudo, os resultados do transcriptoma indicam que a proteína Bola não

influencia os níveis de expressão do gene *ycgR* e, como tal, poderá estar a afectar a rotação flagelar por uma outra via.

3.5 O aumento dos níveis intracelulares de c-di-GMP altera a motilidade da estirpe *wt* para um fenótipo similar a Δ *bolA*

A proteína YcgR, como já referido, constitui um importante elemento na regulação da motilidade bacteriana. No entanto, a regulação mediada por esta proteína é dependente de c-di-GMP que, quando em níveis elevados se liga ao domínio PilZ da mesma, estimulando a sua interacção com o motor flagelar [14]. Posto isto e, uma vez que, segundo a análise do transcriptoma o gene *bolA* parece não regular os níveis de expressão do gene *ycgR*, foi colocada a hipótese da proteína BOLA estar a influenciar a síntese e/ou degradação de c-di-GMP, o qual possui um papel fundamental na regulação da motilidade bacteriana.

Tendo como base a teoria de que a inibição da motilidade bacteriana na ausência da proteína BOLA possa ser atribuída a uma influência da mesma na síntese e/ou degradação de c-di-GMP, foram realizados ensaios de motilidade em meio semi-sólido de triptona. Na realização destes ensaios foi comparada a capacidade de *swimming* entre uma estirpe *wt* de *E. coli*, MG1655, e uma estirpe delectante no gene *bolA*, MG1655 Δ *bolA*, face à adição de c-di-GMP ao meio de crescimento.

Os resultados demonstram que, face à adição de c-di-GMP ao meio de crescimento, a estirpe MG1655 apresenta um fenótipo de motilidade similar à estirpe MG1655 Δ *bolA* (Fig. 14). Este facto poderá indicar que a ausência deste gene poderá implicar uma diminuição da degradação ou um aumento da síntese de c-di-GMP, aumentando os seus níveis intracelulares e, como tal, inibindo a motilidade bacteriana.

O resultado obtido a partir da realização deste ensaio de motilidade permitiu ainda verificar que a célula bacteriana é permeável ao c-di-GMP, uma vez que a adição deste metabolito ao meio de cultura alterou o fenótipo de motilidade na estirpe *wt*.

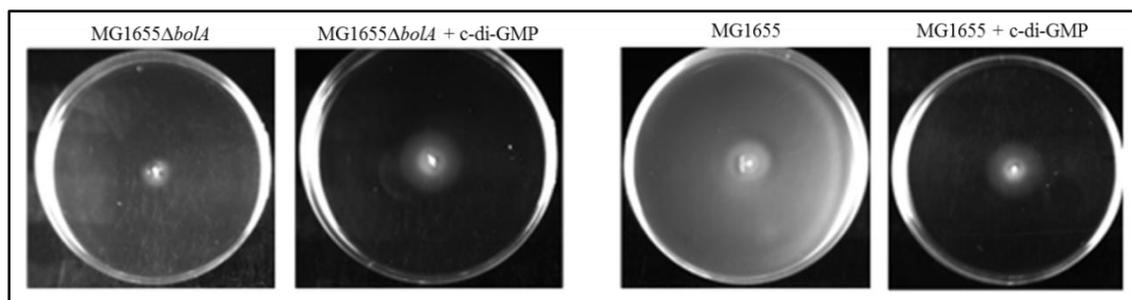


Figura 14 - Comparação do fenótipo de motilidade entre as estirpes MG1655 e MG1655 Δ *bolA* face à adição de c-di-GMP ao meio de crescimento. A placas de *swimming* contendo 0,35% de agar foram inoculadas com 1 μ l de cultura, à qual foi adicionada c-di-GMP numa concentração final de 1 μ M, e incubadas a 37°C durante aproximadamente 16h.

3.6 A proteína BolA regula os níveis intracelulares de c-di-GMP

A importância dos níveis intracelulares de c-di-GMP na transição entre o estado celular móvel e imóvel está fortemente documentada na literatura. Com base em estudos publicados, sabe-se que elevadas concentrações deste metabolito promovem a formação de biofilme [88].

Com o objectivo de elucidar o possível papel da proteína BolA na síntese e/ou degradação de c-di-GMP, foi realizada a quantificação dos níveis intracelulares deste metabolito por *Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry* (LC-MS/MS). Os níveis intracelulares de c-di-GMP foram comparados entre estirpes com diferentes níveis de expressão de gene *bolA*, a partir das quais se extraíram amostras em fase estacionária de crescimento.

Os resultados obtidos demonstram que os níveis intracelulares de c-di-GMP são cerca de duas vezes superiores na estirpe delectante no gene *bolA*, quando comparado com a estirpe *wt* MG1655. Contudo, de maior relevância é o facto de se verificar uma diminuição de cerca de três vezes nos níveis intracelulares deste metabolito na estirpe que sobre-expressa o gene *bolA* quando comparada com a estirpe delectante neste mesmo gene. Este resultado indica assim uma tendência decrescente dos níveis intracelulares deste metabolito concomitantemente com o aumento da expressão da proteína BolA (Fig. 15).

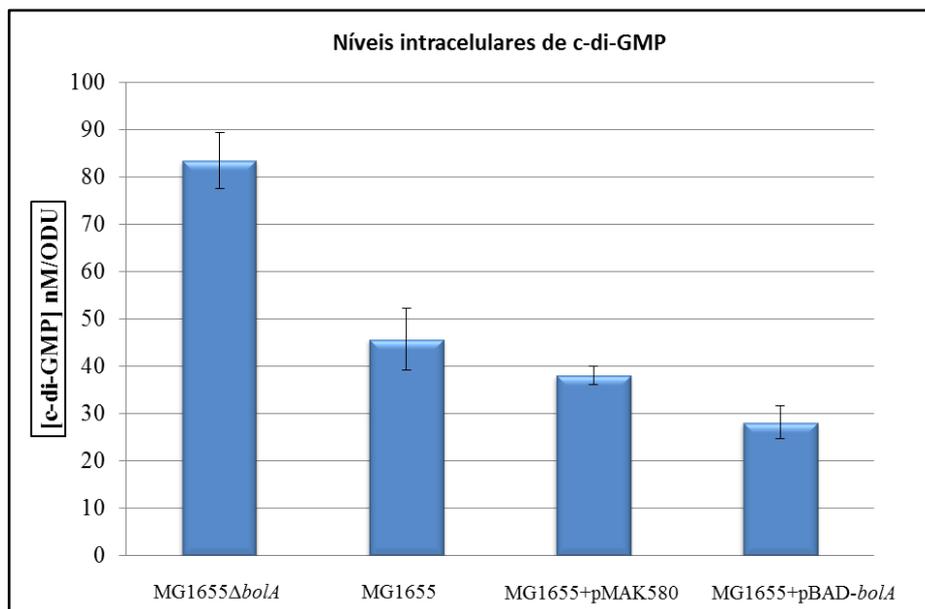


Figura 15 - Quantificação dos níveis intracelulares de c-di-GMP em estirpes de *E. coli* com diferentes níveis de expressão de gene *bolA*. A quantificação foi realizada em triplicado por *Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry* a partir de amostras recolhidas em fase estacionária de crescimento provenientes de culturas independentes. Os níveis de c-di-GMP quantificados (representados com respectivas barras de erro referentes ao desvio padrão) foram normalizados a partir da OD de cada uma das culturas, 3h após a indução com 0,15% de arabinose, momento no qual a extracção de metabolitos foi realizada.

3.7 Níveis transcricionais e traducionais do gene *bolA* são modulados por c-di-GMP

Com base nos resultados supracitados, procedeu-se à quantificação relativa dos níveis de expressão do gene *bolA* face à adição de c-di-GMP ao meio de crescimento, de forma a verificar se este metabolito poderá estar a influenciar os seus níveis transcricionais. Com tal propósito, foi efectuada a extracção de RNA total de culturas em fase exponencial de crescimento, com e sem a adição de 1μM de c-di-GMP, seguida de transcrição reversa. Os níveis de expressão do gene *bolA* foram quantificados utilizando a técnica de qRT-PCR, a qual permite a monitorização da amplificação de cDNA pela detecção e quantificação de um sinal fluorescente. Como repórter foi usado o agente intercalante de DNA de cadeia dupla, SYBR Green, cuja fluorescência emitida aumenta de forma directamente proporcional à quantidade de produto de PCR presente na reacção [81].

Os ensaios foram realizados pelo menos três vezes a partir de dois replicados biológicos diferentes. Tal como esperado os resultados obtidos demonstram que na estirpe MG1655+pMAK580, os níveis de expressão do gene *bolA* são cerca de 110 vezes superiores relativamente à estirpe MG1655. Por outro lado, face à adição de c-di-GMP ao meio de crescimento, verifica-se uma diminuição significativa dos níveis transcricionais do gene *bolA* na estirpe MG1655+pMAK580 havendo, neste caso, um aumento de apenas 16 vezes, relativamente à estirpe *wt* (Fig. 16A/B). Também na estirpe MG1655, face à adição de c-di-GMP ao meio de crescimento, se verificou uma diminuição dos níveis transcricionais do gene *bolA*, neste caso de 15% (Fig. 16A).

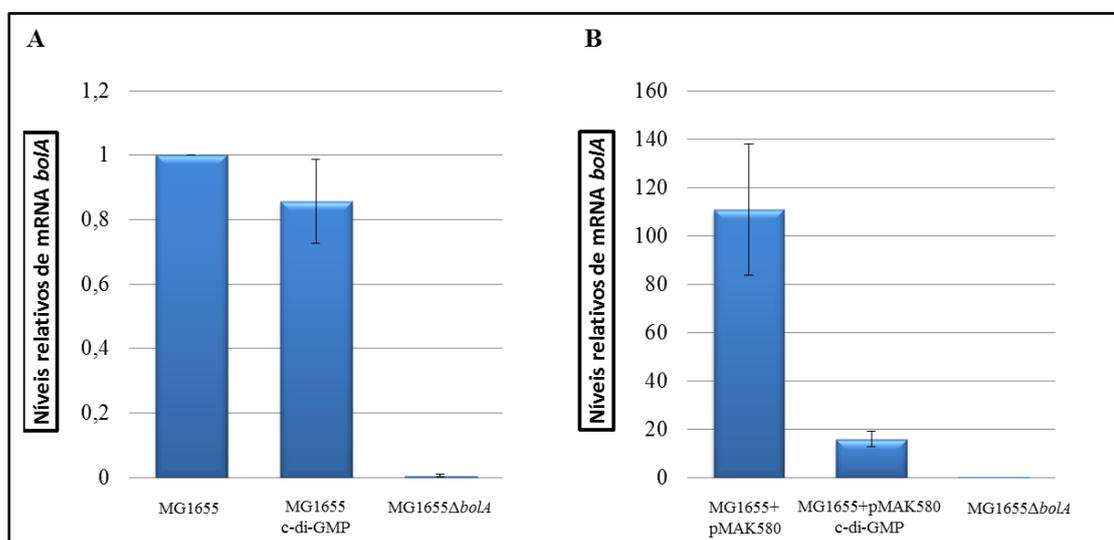


Figura 16 - Influência do metabolito c-di-GMP nos níveis de expressão do gene *bolA*. Os níveis transcricionais do gene *bolA* foram avaliados por qRT-PCR. Os ensaios foram realizados pelo menos três vezes, representando ambos os gráficos a média dos resultados obtidos e respectivas barras de erro referentes ao desvio padrão. O gene *cysG* foi usado como gene de referência e a estirpe MG1655 Δ *bolA* como controlo negativo. Os níveis de expressão transcricional do gene *bolA* foram calculados por normalização com os níveis de expressão referentes ao gene *cysG*, relativamente à estirpe *wt* de *E. coli*, MG1655.

De forma a verificar se a diminuição dos níveis de mRNA do gene *bolA* face à adição de c-di-GMP poderá ter influência nos níveis proteicos celulares finais, a expressão da proteína Bola foi analisada nas mesmas condições, em fase exponencial e estacionária de crescimento. A determinação relativa dos níveis traducionais da proteína Bola face à adição de c-di-GMP foi realizada utilizando a técnica de *Western Blot*, a qual permite a identificação e quantificação de proteínas específicas.

Na realização desta quantificação foram usados extractos proteicos totais, obtidos em fase exponencial e estacionária de crescimento, os quais foram separados por SDS-PAGE e, posteriormente, transferidos para uma membrana de nitrocelulose. Para detecção da proteína BolA foi usado o anticorpo anti-BolA. Como controlo negativo foram usados extractos proteicos totais obtidos da estirpe de *E. coli* delectante no gene *bolA*. A proteína GroEL foi utilizada como controlo, garantindo que as alterações observadas não se devem a uma diferença da quantidade de extracto total proteico aplicado no gel. A intensidade relativa de cada banda foi quantificada por análise de imagem com o programa Image Lab 4.0.1. (Biorad).

Embora a análise por *Western Blot* tenha sido realizada em fase exponencial e estacionária de crescimento, em fase exponencial os níveis da proteína BolA não foram detectáveis e, como tal, não constam nos resultados. No entanto, em fase estacionária de crescimento, observou-se uma diminuição de cerca de 55% nos níveis da proteína BolA face à adição de c-di-GMP na estirpe MG1655+pMAK580 (Fig. 17). Estes resultados, juntamente com a observação da diminuição dos níveis intracelulares de c-di-GMP face ao aumento da expressão do gene *bolA*, sugerem a existência de um mecanismo de regulação em *feedback* entre a expressão deste gene e os níveis de expressão deste metabolito.

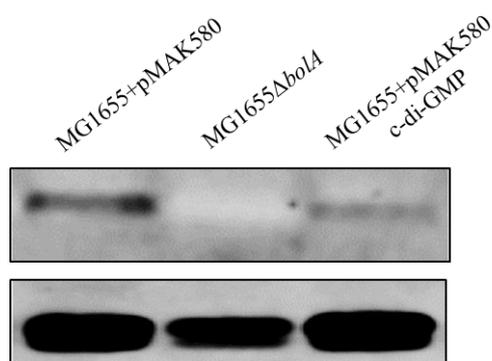


Figura 17 - Quantificação relativa dos níveis da proteína BolA, em fase estacionária, face à adição de c-di-GMP ao meio de crescimento. A estirpe MG1655 Δ *bolA* foi usada como controlo negativo. Os níveis relativos de proteína BolA foram normalizados a partir da quantificação dos níveis de proteína GroEL.

3.8 A proteína Bola regula a expressão de enzimas DGC e PDE por interacção directa com a sequência promotora dos seus respectivos genes

Tal como referido, a proteína Bola encontra-se envolvida no controlo de numerosos processos celulares, tendo um importante impacto a nível da adaptação do estado fisiológico celular bacteriano. Por outro lado, a molécula c-di-GMP tem sido relacionada com numerosas funções celulares, sendo os seus níveis intracelulares modulados pela actividade oposta de duas classes de enzimas, diguanilato ciclases (DGC) e fosfodiesterases (PDE), as quais desempenham um papel central na regulação do processo de formação de biofilmes [90].

Estudos publicados revelam a capacidade da proteína Bola de actuar como regulador transcricional de diferentes genes, reprimindo ou aumentando a sua expressão, por interacção directa com a sua região promotora [9,31].

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, que indicam uma diminuição dos níveis intracelulares de c-di-GMP concomitantemente com o aumento da expressão do gene *bolA*, foi colocada a hipótese da proteína Bola estar envolvida na expressão das enzimas que sintetizam e degradam este metabolito. Assim, com o propósito de elucidar de que forma a proteína Bola está a influenciar os níveis intracelulares de c-di-GMP foi realizado *Chromatin Immunoprecipitation* seguido de sequenciação (ChIP-seq). Neste estudo, uma estirpe delectante no gene *bolA* foi comparada, em fase exponencial de crescimento, com uma estirpe *wt* de *E. coli* à qual foi adicionada uma sequência 3xFLAG na extremidade 3' do gene *bolA*, MG1655 *bolA::3xFLAG-kan^R* (a construção da estirpe MG1655 *bolA::3xFLAG-kan^R* encontra-se descrita em 3.9).

A técnica de ChIP-seq constitui a forma mais directa de identificar sequências de ligação de uma determinada proteína, permitindo obter, *in vivo*, um amplo quadro de regulação transcricional [33]. De forma breve, foi realizado o *crosslinking* das ligações proteína-DNA através do tratamento das células com formaldeído, tratando-se posteriormente o DNA através de sonicação. Após a sonicação, de forma a verificar se o DNA possuía o tamanho requerido, entre 100 e 700pb, as amostras foram analisadas por electroforese em gel de agarose 1,5% (Fig. 18A). A imunoprecipitação do DNA de interesse foi realizada utilizando anticorpos anti-FLAG[®]M2 específicos para a cauda 3xFLAG codificada acopladamente ao gene *bolA*. Por fim, o *crosslinking* foi revertido e

o DNA de interesse extraído e sequenciado [28]. Antes do processo de sequenciação foi realizado um passo adicional, visando verificar o êxito da imunoprecipitação e extração do DNA de interesse. Uma vez que a proteína Bola regula transcricionalmente a expressão do gene *mreB* através da ligação directa à sua região promotora [31], este último foi utilizado como controlo positivo desta técnica. Este controlo foi efectuado através da amplificação por PCR da região promotora do gene *mreB* (oligonucleótidos descritos na tabela 20, anexo III), usando como molde o DNA imunoprecipitado de ambas as estirpes acima mencionadas. Os resultados revelaram a amplificação específica de um produto cujo tamanho é referente à região promotora do gene *mreB*, apenas na estirpe MG1655 *bolA::3xFLAG-kan^R*, indicando assim, o sucesso no processo de imunoprecipitação (Fig. 18B).

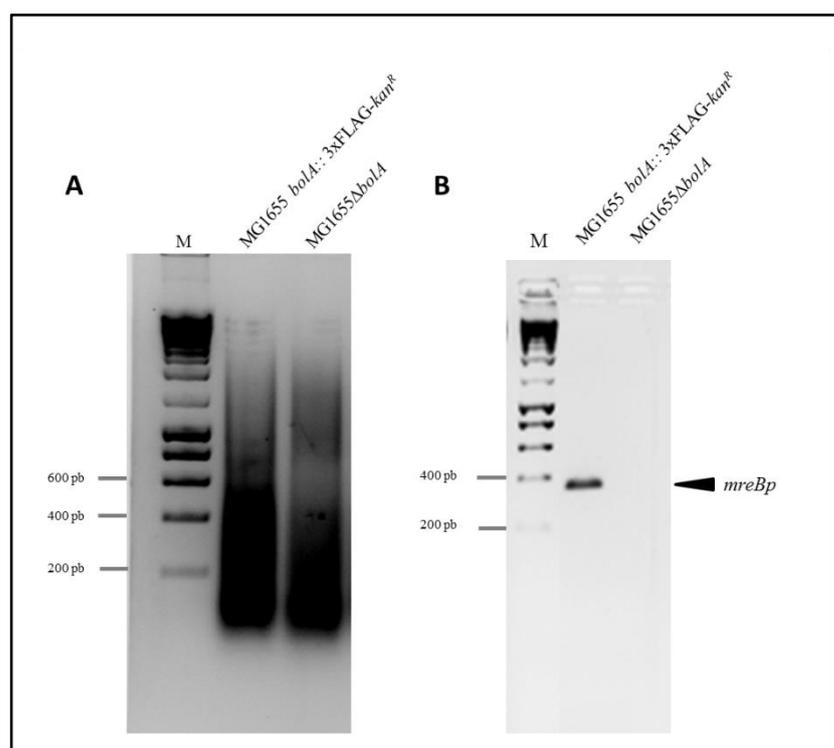


Figura 18 - Análise das amostras de DNA obtidas a partir da técnica de ChIP. A – Análise das amostras de DNA após sonicação. A análise do DNA referente às estirpes MG1655 *bolA::3XFLAG* e MG1655 Δ *bolA* a partir de electroforese em gel de agarose permitiu visualizar que o mesmo se encontrava no intervalo de tamanho pretendido, entre 100 e 700pb. O DNA foi fragmentado, utilizando o Sonicador UP200S (Hirscher) com uma amplitude de 55% e um pulso de 0,45seg., em cinco ciclos de sonicação de 10seg. B – Controlo positivo da imunoprecipitação do DNA de interesse através da amplificação por PCR da sequência promotora do gene *mreB*. (M) Marcador de peso molecular comercial NZYDNA Ladder III (Nzytech).

Usando um *p-value* de 1×10^{-12} , a análise por ChIP-seq demonstrou a interacção directa da proteína BolA com 79 genes envolvidos em diversas funções celulares. Com principal destaque e nível superior de significância, verifica-se a interacção directa da proteína BolA com diversos genes envolvidos na biogénese flagelar, comportando-se como factor transcricional de genes de classe II e III constituintes desta via (Fig. 19).

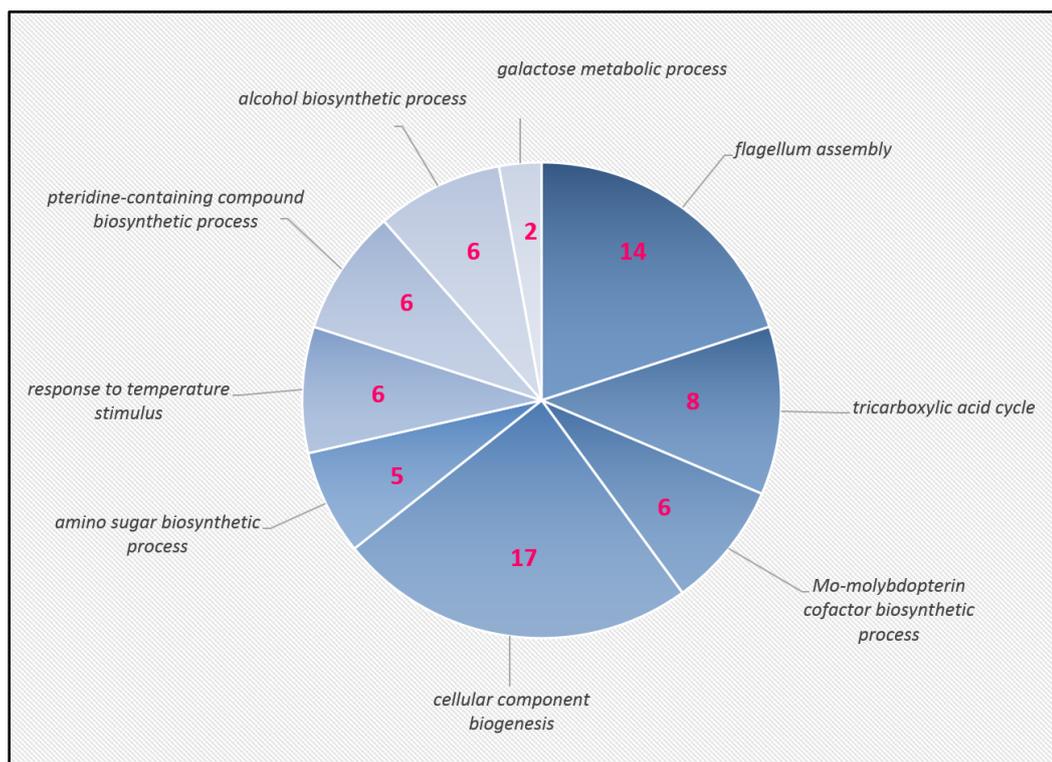


Figura 19 - Resultado representativo da análise por ChIP-seq. A proteína BolA regula, de forma directa, a expressão de 79 genes envolvidos em diversas funções celulares. Esta análise foi realizada definindo como estatisticamente significativas as diferenças entre amostras com um *p-value* igual ou inferior a 1×10^{-12} .

A análise bioinformática detalhada dos resultados obtidos por ChIP-seq revelou ainda a interacção directa da proteína BolA com a região promotora de genes que codificam enzimas DGC (*yliF* e *ydaM*) e PDE (*yliE*, *yciR* e *ycgG* (Fig. 20)). Nesta análise a significância estatística dos resultados foi determinada usando um *p-value* igual ou inferior a 1×10^{-9} . Este resultado é consistente com os resultados que indicam a diminuição dos níveis de c-di-GMP concomitantemente com o aumento da expressão do gene *bolA*. Este facto indica que este gene poderá estar envolvido na regulação dos

níveis deste metabolito por interacção e regulação de genes que codificam para enzimas envolvidas na sua síntese e degradação.

Consistente com os resultados obtidos na análise do transcriptoma que indicam o papel da proteína BolA na regulação da expressão de diversos genes envolvidos da motilidade celular, a análise por CHIP-seq sugere um papel central do mesmo como factor de transcrição de diversos genes envolvidos nesta via.

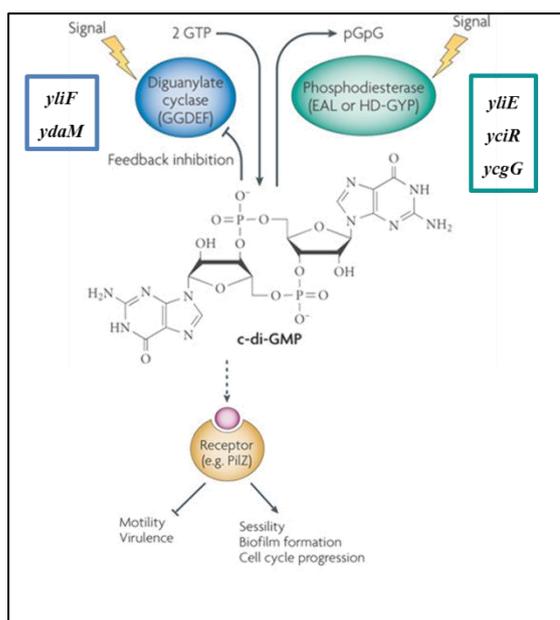


Figura 20 - Enzimas DGC e PDE cuja expressão é afectada a nível transcricional pela proteína BolA. A proteína BolA interage directamente com a sequência promotora dos genes que codificam as fosfodiesterases YliF e YdaM (rectângulo azul) e as diguanilato ciclases YliE, YciR e YcgG (rectângulo verde). Adaptado de [87].

3.9 Construção da fusão *bolA::3xFLAG-kan^R*

A fusão cromossomal da cauda 3xFLAG à região C-terminal da proteína BolA foi realizada através da amplificação por PCR da sequência codificante 3xFLAG e do gene *kan^R* utilizando o plasmídeo pSUB11 como molde (Fig. 21A). O produto de PCR foi transformado e integrado no cromossoma da estirpe AB330. A fusão *bolA::3xFLAG-kan^R*, foi posteriormente transferida para a estirpe MG1655 por transdução generalizada utilizando o bacteriófago P1. Os clones positivos foram seleccionados por resistência à canamicina (Fig. 21B).

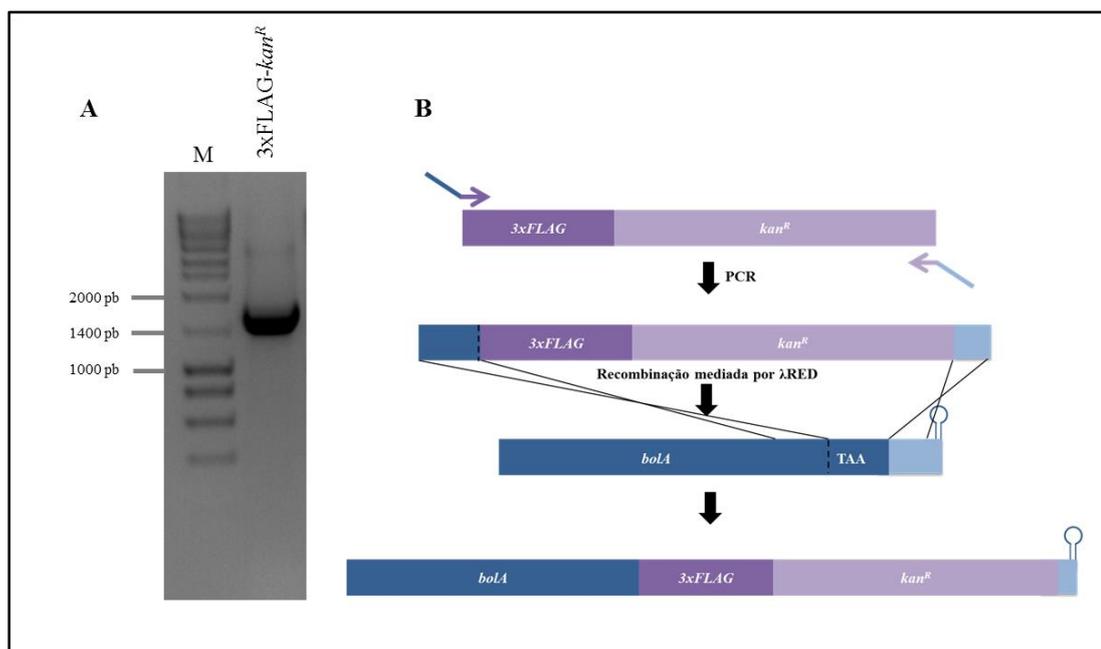


Figura 21 – Esquemática das etapas de construção da estirpe MG1655 *bolA::3xFLAG-kan^R*. A – Produto de amplificação da sequência *3xFLAG-kan^R*. A visualização do produto de amplificação (≈ 1400 pb) foi realizada em gel de agarose de concentração 1,5%, usando brometo de etídio como corante. (M) Marcador de peso molecular comercial NZYDNA Ladder III (Nzytech). B – A fusão *bolA::3xFLAG-kan^R* foi obtida por recombinação homóloga entre a sequência *3xFLAG-kan^R* amplificada em (A) e o gene *bolA* presente no cromossoma da estirpe MG1655.

De forma a verificar se a adição da cauda 3xFLAG no cromossoma de *E. coli* não estaria a afectar o crescimento celular, a expressão do gene *bolA*, ou mesmo a função da proteína, procedeu-se à realização de curvas de crescimento e microscopia de contraste de fase para as estirpes MG1655 *bolA::3xFLAG-kan^R* e MG1655 (Fig.22 e 23). Ao analisarmos as imagens obtidas por microscopia de contraste de fase verificou-se que não existem alterações morfológicas significativas entre as duas estirpes de *E. coli*. Em ambas as estirpes foi observado o encurtamento das células bacterianas, característico de fase estacionária de crescimento, quando há elevados níveis de expressão do gene *bolA* [85], o que indica que a adição da sequência 3xFLAG não alterou a expressão deste gene (Fig. 23).

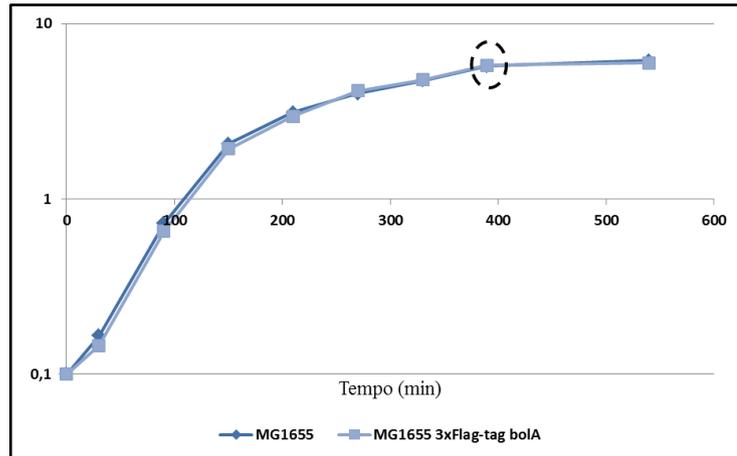


Figura 22 - Análise do crescimento bacteriano de MG1655 *bolA::3xFLAG-kan^R* relativamente a MG1655. Na determinação da curva de crescimento bacteriana a OD₆₀₀ de cada estirpe foi determinada de hora a hora até ser atingida a fase estacionária de crescimento. O tempo referente ao qual 1 volume de cultura de cada uma das estirpes foi recolhido para observação através de microscopia de contraste de fase, encontra-se assinalado com um círculo.

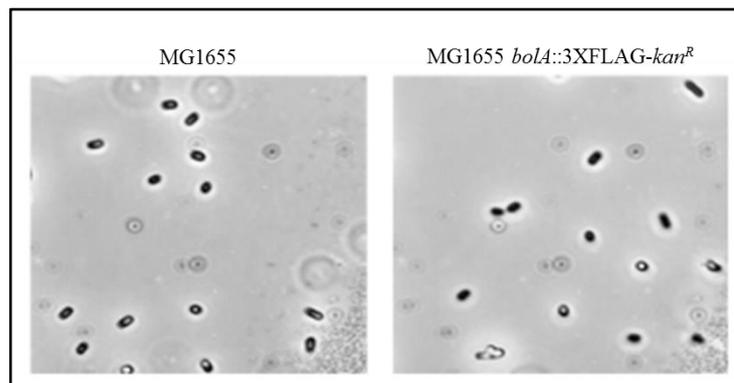


Figura 23 - Análise fenotípica da expressão de gene *bolA* nas estirpes MG1655 e MG1655 *bolA::3xFLAG-kan^R*. A morfologia das células bacterianas foi visualizada em fase estacionária de crescimento, aos 390min da curva de crescimento bacteriana, por microscopia de contraste de fase.



DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A célula bacteriana é um sistema extremamente dinâmico e adaptável, capaz de activar diferentes respostas face a diversas condições de stresse. Os genes envolvidos na resposta ao stresse, como o gene *bolA* de *E. coli*, são geralmente induzidos quando as células necessitam de se adaptar e sobreviver a condições desfavoráveis [95].

O gene *bolA* foi descrito pela primeira vez, em culturas de células bacterianas crescidas em laboratório, como um gene envolvido na adaptação e sobrevivência em fases de crescimento tardias, isto é, fase estacionária [1]. No entanto, os seus efeitos são pleiotrópicos e integram diversas vias complexas, sendo o estudo da sua função a nível celular de extrema importância. No trabalho apresentado nesta dissertação, foi estudado o envolvimento da proteína BolA na regulação e coordenação de duas importantes vias de adaptação bacteriana ao meio envolvente, nomeadamente a possibilidade de alternar entre viver em estado planctónico ou biofilme.

A motilidade celular mediada por flagelos constitui uma estratégia essencial na adaptação das células bacterianas ao meio envolvente. Esta proporciona a capacidade da célula prospectar por ambientes com condições favoráveis, resultando numa vantagem significativa para a sua propagação e sobrevivência [3]. A transição entre o estado celular planctónico e de biofilme é regulada por duas cascatas antagonistas, a cascata FlhDC- σ^{70} - σ^F e a cascata σ^S -MlrA-CsgD, as quais são activadas em fase exponencial tardia e fase estacionária, respectivamente [61]. No entanto, estas duas vias estão ligadas entre si e complementam-se, sendo que a motilidade é essencial na fase inicial de formação de biofilme [101]. A regulação destas duas cascatas envolve mecanismos extremamente dinâmicos e complexos, onde a interacção de inúmeros factores contribui para a adaptação celular. Os resultados obtidos através da análise transcriptómica revelaram uma ampla gama de genes cuja expressão é modulada de uma forma dependente da proteína BolA, entre os quais, genes relacionados com a cascata de biogénese flagelar. Esta análise acoplada às interacções directas proteína-DNA determinadas por ChIP-seq demonstram que a proteína BolA regula negativamente, de forma directa ou indirecta, a expressão de diversos genes envolvidos na síntese flagelar (Fig. 24).

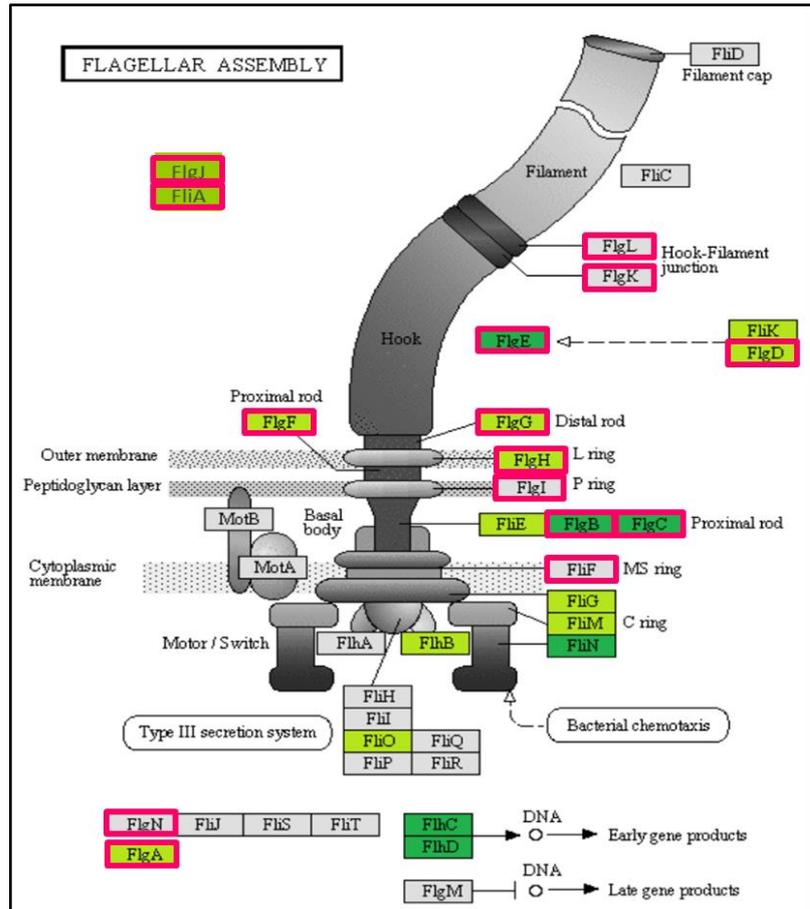


Figura 24 – A proteína BolA actua como factor de transcrição de genes envolvidos na síntese flagelar. Representação dos resultados obtidos na análise do transcriptoma e ChIP-seq na cascata de biogénese flagelar. As proteínas cujo nível de expressão do respectivo gene demonstrou variar de uma forma dependente da proteína BolA estão representadas a verde, podendo distinguir-se as variações que são (verde escuro) ou não (verde claro) estatisticamente significativas. Os alvos de interacção directa BolA-DNA estão representados com um rectângulo cor-de-rosa. Adaptado de <http://www.genome.jp/kegg/>.

Os resultados obtidos no transcriptoma permitiram ainda observar que ambas as classes I e II de genes constituintes da cascata flagelar são modulados negativamente de uma forma dependente da proteína BolA. Com principal destaque verifica-se a regulação negativa da expressão dos genes que codificam o complexo proteico FlhDC, o qual tem um papel principal na regulação positiva da cascata de biogénese flagelar [67]. O aumento da sua expressão ocorre em fase exponencial tardia permitindo à célula bacteriana adoptar uma estratégia que beneficie a sua condição nutricional através da motilidade mediada por flagelos [103]. O complexo proteico FlhDC controla a

expressão do factor de transcrição σ^F , codificado pelo gene *fliA*, que por sua vez permite a expressão de genes de classe III, ambos essenciais para a síntese de flagelos [61]. Uma vez que este complexo proteico é responsável pela regulação dos níveis de expressão dos restantes genes que fazem parte da cascata de biogénese flagelar e que elevados níveis de expressão da proteína BolA modulam de forma negativa a sua expressão, é possível especular sobre os efeitos transcricionais causados por esta proteína ao nível de toda a cascata de síntese flagelar. Embora a proteína BolA não regule de forma directa os níveis transcricionais deste operão, os nossos resultados indicam que esta modulação poderá ocorrer via HdfR. Em estirpes selvagens de *E. coli* esta proteína modula de forma negativa a expressão do operão *flhDC* [53]. De acordo com os resultados experimentais obtidos nesta dissertação, a proteína BolA interage directamente com a região promotora do gene que codifica a proteína HdfR, regulando a sua expressão de forma positiva. Posto isto, esta proteína poderá representar um elo de ligação entre a expressão do gene *bolA* e a diminuição dos níveis transcricionais do operão *flhDC*. Por sua vez, o factor de transcrição H-NS está também envolvido na regulação positiva da expressão do gene *hdfR* [53]. Recentemente, este factor de transcrição foi descrito como um regulador negativo da expressão do gene *bolA* [62]. Dado não existirem evidências experimentais que demonstrem que a proteína H-NS regula de forma directa a expressão do gene *hdfR*, esta modulação poderá ser consequência da repressão dos níveis transcricionais do gene *bolA* que por sua vez irá afectar positivamente a expressão deste gene.

Através dos resultados obtidos nesta dissertação, foi também observada a regulação negativa e directa da expressão do gene *flgE* pela proteína BolA. Este gene codifica a proteína constituinte do gancho flagelar, crucial na conexão entre o corpo basal e o filamento [64,92]. Ao reprimir a sua expressão, a proteína BolA poderá ter uma influência negativa na expressão de genes de classe III, a qual é desencadeada pela formação do complexo HBB (estrutura composta pelo corpo basal e gancho) [44]. Os nossos resultados revelaram ainda que a proteína BolA reprime de forma directa a expressão dos genes *flgB*, *flgC* e de forma indirecta o gene *fliN*. Os dois primeiros genes referidos codificam proteínas constituintes do corpo basal, enquanto o gene *fliN* codifica a proteína do rotor FliN que, juntamente com FliG e FliM, controla a rotação flagelar [47]. A modulação destes genes indica que a proteína BolA afecta a cascata de síntese

flagelar não só através da regulação da expressão de genes envolvidos na codificação de componentes estruturais flagelares, como também através da modulação de genes que codificam proteínas envolvidas na funcionalidade do motor. De forma a clarificar os efeitos da proteína BolA nesta cascata, seria interessante observar através de microscopia de fluorescência ou electrónica, a presença ou ausência de corpos flagelares em células extraídas de culturas em condições semelhantes às utilizadas na análise transcriptómica.

Em conjunto, estes resultados revelam não só o importante papel da proteína BolA como regulador negativo da síntese flagelar, como também o facto da mesma integrar esta complexa via regulatória como um factor de transcrição que afecta a expressão de um surpreendente número de genes. De referir é ainda que os resultados dos ensaios de motilidade realizados demonstram o impacto da regulação da expressão de genes que codificam proteínas envolvidas na síntese flagelar. Em concordância com os resultados da análise do transcriptoma, estes ensaios demonstraram que as estirpes que sobre-expressam o gene *bolA* possuem uma capacidade de motilidade inferior à observada na estirpe selvagem. Uma vez que a fase de adesão celular irreversível envolve a inibição de toda a cascata de síntese flagelar, o fenótipo observado poderá estar directamente relacionado com a formação de biofilmes [70]. De acordo com esta análise e com estudos que demonstram a importância da proteína BolA no desenvolvimento de biofilmes [95] seria expectável que na ausência desta proteína a capacidade de motilidade fosse semelhante ou superior à observada na estirpe selvagem. No entanto, os ensaios de motilidade revelaram que na ausência do gene *bolA* a motilidade bacteriana diminui de uma forma semelhante à observada na estirpe que sobre-expressa este mesmo gene. Como já referido, a análise do transcriptoma revelou que quando comparada com uma estirpe delectante no gene *bolA* a estirpe que sobre-expressa este gene regula negativamente a expressão de diversos genes constituintes da cascata de síntese flagelar. Assim, com base nesta análise foi colocada a hipótese da origem do fenótipo observado na estirpe delectante no gene *bolA* ser devida a uma não funcionalidade ao nível do motor flagelar, reforçando a hipotética ideia de que a célula para ser 100% funcional necessita de um balanço equilibrado da expressão da proteína BolA.

Um regulador chave na transição entre a motilidade celular e a formação de biofilmes é a molécula sinalizadora c-di-GMP. Dada à sua importância na regulação da motilidade e ao facto de elevados níveis deste metabolito poderem inibir completamente a motilidade sem afectar a síntese flagelar [105], foi colocada a hipótese da proteína BolA estar a regular a sua síntese e/ou degradação. Numa primeira análise, a realização de ensaios de motilidade revelou que, aquando da adição de c-di-GMP ao meio de crescimento, a estirpe selvagem demonstrou um fenótipo de motilidade semelhante ao observado na estirpe delectante no gene *bolA*. Este resultado deu origem à hipótese de que na estirpe delectante no gene *bolA* os níveis intracelulares de c-di-GMP poderiam estar mais elevados, havendo consequentemente uma diminuição da motilidade celular. Esta observação foi subsequentemente confirmada por LC-MS/MS, onde se verificou uma tendência decrescente dos níveis intracelulares de c-di-GMP concomitantemente com o aumento da expressão da proteína BolA. É ainda importante referir o facto de ocorrer uma diminuição de cerca de três vezes nos níveis deste metabolito na estirpe que sobre-expressa o gene *bolA* relativamente à estirpe delectante neste mesmo gene. Estes resultados podem indicar que o fenótipo de motilidade observado na estirpe delectante no gene *bolA* se deve ao aumento dos níveis intracelulares de c-di-GMP nesta condição. Com base em dados bibliográficos, sabe-se que níveis elevados deste metabolito podem inibir completamente a motilidade sem afectar a síntese flagelar [105]. O fenótipo observado na ausência da proteína BolA é muito provavelmente resultado da excessiva interacção da proteína YcgR com o motor flagelar, mediada pelos níveis elevados de c-di-GMP. O facto da proteína BolA estar envolvida na regulação dos níveis intracelulares deste metabolito revela que o seu papel, tanto no controlo da via de síntese de flagelos como na via que origina fímbrias, poderá ser surpreendentemente complexo. Adicionalmente, a análise do transcriptoma e das interacções directas proteína-DNA obtidas por ChIP-seq permitiu verificar que esta modulação se deve à regulação diferencial de diversos genes que codificam as enzimas DGC e PDE, envolvidas na síntese e degradação de c-di-GMP [77]. Especificamente, a proteína BolA tem a capacidade de actuar como factor de transcrição de genes que codificam a expressão das DGC YliF e YdaM e das PDE YliE e YcgG, regulando ainda, de forma indirecta a expressão das DGC YfiN, YneF, YhjK, YdeH e YcdT e das PDE YdjV e YhjH. Para algumas das enzimas referidas, a função de DGC ou PDE é

ainda putativa, pelo que seria interessante analisar e confirmar quais os processos celulares nos quais se encontram envolvidas, revelando conseqüentemente o impacto da proteína BolA na sua regulação. No entanto, é de realçar que a proteína BolA regula de forma diferencial a expressão de genes que codificam enzimas descritas como essenciais para a manutenção dos níveis intracelulares de c-di-GMP, como a DGC YdaM e a PDE YhjH. A DGC YdaM tem um papel crucial na regulação dos níveis de c-di-GMP e na expressão do gene *csgD* [70]. Resultados experimentais recentemente publicados demonstram que esta enzima integra uma cascata em *feedback* na qual o metabolito c-di-GMP medeia a regulação positiva do gene *csgD* [58]. Na presença de baixos níveis deste metabolito a PDE YciR interage directamente com a DGC YdaM, inibindo a sua actividade. No entanto, o aumento dos níveis de c-di-GMP promove não só a regulação negativa da motilidade celular mas também o bloqueio da inibição da DGC YdaM por parte da PDE YciR [58]. Com base nestes dados e, integrando os resultados que demonstram uma repressão dos níveis desta DGC (YdaM) por parte da proteína BolA, é assim de esperar uma interferência com a regulação em *feedback* referida acima, observando-se conseqüentemente a diminuição dos níveis intracelulares de c-di-GMP. Adicionalmente, também os níveis de expressão do gene que codifica a PDE YhjH demonstraram ser regulados pela proteína BolA. Esta PDE regula negativamente os níveis de c-di-GMP de uma forma dependente do factor de transcrição σ^F , sendo conseqüentemente inactivada aquando da repressão da cascata flagelar, resultando no aumento dos níveis deste metabolito [70]. No entanto, os nossos resultados demonstram que a proteína BolA regula positivamente a expressão do gene *yjh* simultaneamente com a redução da expressão de genes envolvidos na síntese flagelar. Este facto poderá indicar que no momento em que a proteína BolA reprime a biogénese flagelar os níveis de c-di-GMP aumentam de uma forma gradual. Porém, seria interessante realizar a quantificação de c-di-GMP não só nas condições apresentadas nesta dissertação, como também ao longo de todo o crescimento bacteriano.

Como já mencionado, a análise transcriptómica revelou ainda a regulação positiva, por parte da proteína BolA, das DGC YfiN, YdeH e YcdT, as quais se encontram envolvidas na síntese de c-di-GMP. Seria de esperar que a regulação positiva destas DGC resultasse no aumento dos níveis de c-di-GMP na presença da proteína

BolA. No entanto, os nossos resultados confirmam o contrário, sendo necessário ter em conta que a síntese e degradação de c-di-GMP, processos responsáveis pelo balanço dos níveis intracelulares deste metabolito, não são processos lineares que possam ser exclusivamente descritos pela proporção do número de DGC e PDE funcionais.

Uma vez que os resultados apresentados demonstram que os níveis de c-di-GMP variam de uma forma dependente da expressão de BolA e que ambos quando em níveis elevados originam fenótipos semelhantes, decidimos verificar se a expressão do gene *bolA* seria afectada de uma forma dependente dos níveis deste metabolito. A quantificação obtida por qRT-PCR demonstrou, tal como esperado, um aumento dos níveis de expressão do gene *bolA* em cerca de 110 vezes na estirpe que sobre-expressa este gene relativamente à estirpe selvagem. Por sua vez, aquando da adição de c-di-GMP ao meio de crescimento, ocorreu uma diminuição significativa dos níveis transcricionais do gene *bolA* na estirpe que o sobre-expressa, verificando-se um aumento de apenas 16 vezes relativamente à estirpe selvagem. Também na estirpe selvagem o aumento dos níveis de c-di-GMP causaram uma diminuição dos níveis de expressão do gene *bolA*. Esta regulação negativa, dependente de c-di-GMP, revelou ser ainda reflectida nos níveis da proteína BolA. Em fase estacionária de crescimento, a análise por *Western Blot* demonstrou uma diminuição em cerca de 55% nos níveis desta proteína face ao aumento deste metabolito. Esta observação, juntamente com o facto dos níveis intracelulares de c-di-GMP diminuírem concomitantemente com o aumento da expressão do gene *bolA*, sugere a existência de um mecanismo de regulação em *feedback* entre a expressão deste gene e os níveis intracelulares deste metabolito. Apesar de, nas condições experimentais utilizadas, a presença de elevados níveis da proteína BolA estar associada a baixos níveis da molécula c-di-GMP e vice-versa, tanto os os níveis elevados da proteína como deste metabolito revelaram o mesmo impacto ao nível do fenótipo de motilidade. Esta observação sugere que a regulação da transição entre o estado planctónico e imóvel poderá ser dependente do balanço destes dois importantes reguladores. Por sua vez, a importância deste balanço poderá indicar que estes dois reguladores são factores determinantes em diferentes fases da formação de biofilmes. Assim, seria interessante analisar os efeitos fenotípicos da presença simultânea de elevados níveis de c-di-GMP e da proteína BolA nas células. No entanto, mais estudos serão necessários para o esclarecimento da intrigante regulação entre a proteína BolA e

a molécula sinalizadora c-di-GMP. Um passo determinante na compreensão deste *feedback* seria sem dúvida o estudo do mecanismo pelo qual este metabolito regula os níveis de expressão do gene *bolA* e quais os elementos envolvidos na mesma. É importante referir o facto dos nossos resultados demonstrarem que, tal como a molécula c-di-GMP, a proteína BolA tem um papel chave na transição entre o estado celular planctónico e imóvel. Adicionalmente, a proteína BolA demonstrou integrar a regulação desta complexa via como um importante factor de transcrição de um surpreendente número de genes. Posto isto, como perspectiva futura seria de máximo interesse identificar e caracterizar quais os motivos envolvidos nesta interacção, assim como determinar uma sequência nucleotídica consenso para estabelecer ligações proteína-DNA.

É surpreendente o facto da proteína BolA regular negativamente tanto a expressão de genes envolvidos na síntese flagelar como os níveis intracelulares de c-di-GMP. Como tal, colocamos a hipótese desta proteína poder ser o “interruptor” que determina qual o momento específico no qual ocorre a promoção da regulação positiva de genes que codificam a sínteses de fímbrias, cuja expressão é dependente de c-di-GMP.

De forma a aprofundar o conhecimento do papel de BolA no controlo destas duas vias antagonistas, seria ainda interessante analisar o papel desta proteína na regulação da expressão de genes que codificam sRNAs. Os sRNAs estão envolvidos numa ampla gama de processos fisiológicos celulares [61] tendo sido associados à regulação da expressão de proteínas envolvidas na síntese flagelar e na formação de biofilmes [50,55]. Posto isto, a análise por *deep-sequencing* (RNA-seq) entre uma estirpe selvagem e uma estirpe delectante no gene *bolA* será essencial para decifrar o papel da proteína BolA no controlo da expressão de sRNAs. Adicionalmente, para uma melhor compreensão das vias celulares que podem ser reguladas pela proteína BolA e dada a envolvência de diversos sRNAs tanto na resposta a stresse como na regulação de diversos factores de virulência [37], seria interessante caracterizar o papel desta proteína em modelos procariotas patogénicos, como *Salmonella enterica*.

Nesta dissertação, foram apresentados resultados que possibilitam um importante avanço na caracterização das funções da proteína BolA de *E. coli*. Os dados obtidos reforçam de forma considerável o papel desta proteína como um factor chave na

adaptação celular a situações de stresse, revelando ainda que a sua função envolve um vasto quadro de regulação transcricional. Este estudo permitiu concluir que a proteína BolA tem um papel determinante na transição entre dois estilos de vida bacterianos distintos, o modo celular planctónico e o desenvolvimento de biofilmes. Assim, a compreensão destes mecanismos juntamente com a caracterização molecular da proteína BolA poderão ser de extrema importância a nível industrial e no desenvolvimento de terapêuticas que previnam a colonização do hospedeiro.



REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] M. Aldea, T. Garrido, M. Vicente, R. Kushner, Induction of a growth-phase-dependent promoter triggers transcription of *bolA*, an *Escherichia coli* morphogene., *EMBO J.* 8 (1989) 3923–3931.
- [2] M. Aldea, C. Hernández-Chico, a G. de la Campa, S.R. Kushner, M. Vicente, Identification, cloning, and expression of *bolA*, an *ftsZ*-dependent morphogene of *Escherichia coli*., *Journal of Bacteriology.* 170 (1988) 5169–76.
- [3] J.P. Armitage, Bacterial tactic responses., *Advances in Microbial Physiology.* 41 (1999) 229–89.
- [4] J.B. Armstrong, J. Adler, M.M. Dahl, Nonchemotactic mutants of *Escherichia coli*., *Journal of Bacteriology.* 93 (1967) 390–8.
- [5] A. Arnqvist, A. Olsén, S. Normark, Sigma S-dependent growth-phase induction of the *csgBA* promoter in *Escherichia coli* can be achieved in vivo by sigma 70 in the absence of the nucleoid-associated protein H-NS., *Molecular Microbiology.* 13 (1994) 1021–32.
- [6] A. Arnqvist, A. Olsén, J. Pfeifer, D.G. Russell, S. Normark, The Crl protein activates cryptic genes for curli formation and fibronectin binding in *Escherichia coli* HB101., *Molecular Microbiology.* 6 (1992) 2443–52.
- [7] M.M. Barnhart, M.R. Chapman, Curli biogenesis and function., *Annual Review of Microbiology.* 60 (2006) 131–47.
- [8] M. Barth, C. Marschall, a Muffler, D. Fischer, R. Hengge-Aronis, Role for the histone-like protein H-NS in growth phase-dependent and osmotic regulation of sigma S and many sigma S-dependent genes in *Escherichia coli*., *Journal of Bacteriology.* 177 (1995) 3455–64.
- [9] I. Batista, R.G. Matos, P. Freire, C.M. Arraiano, *BolA* Affects Cell Growth, and Binds to the Promoters of Penicillin-Binding Proteins 5 and 6 and Regulates

- Their Expression., *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 21 (2011) 243–251.
- [10] T. Bergmiller, R. Peña-Miller, A. Boehm, M. Ackermann, Single-cell time-lapse analysis of depletion of the universally conserved essential protein YgjD., *BMC Microbiology*. 11 (2011) 118.
- [11] P. Bertin, E. Terao, E.H. Lee, P. Lejeune, C. Colson, a Danchin, et al., The H-NS protein is involved in the biogenesis of flagella in *Escherichia coli*., *Journal of Bacteriology*. 176 (1994) 5537–40.
- [12] Z. Bian, A. Brauner, Y. Li, S. Normark, Expression of and cytokine activation by *Escherichia coli* curli fibers in human sepsis., *The Journal of Infectious Diseases*. 181 (2000) 602–12.
- [13] F.R. Blattner, G. Plunkett, C.A. Bloch, N.T. Perna, V. Burland, M. Riley, et al., The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12., *Science (New York, N.Y.)*. 277 (1997) 1453–62.
- [14] A. Boehm, M. Kaiser, H. Li, C. Spangler, C.A. Kasper, M. Ackermann, et al., Second messenger-mediated adjustment of bacterial swimming velocity., *Cell*. 141 (2010) 107–16.
- [15] A. Bougdour, C. Lelong, J. Geiselman, Crl, a low temperature-induced protein in *Escherichia coli* that binds directly to the stationary phase sigma subunit of RNA polymerase., *The Journal of Biological Chemistry*. 279 (2004) 19540–50.
- [16] C.D. Boyd, G. a O’Toole, Second messenger regulation of biofilm formation: breakthroughs in understanding c-di-GMP effector systems., *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 28 (2012) 439–62.
- [17] C.D. Boyd, G. a O’Toole, Second messenger regulation of biofilm formation: breakthroughs in understanding c-di-GMP effector systems., *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 28 (2012) 439–62.

- [18] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding., *Analytical Biochemistry*. 72 (1976) 248–54.
- [19] T.F. Braun, L.Q. Al-Mawsawi, S. Kojima, D.F. Blair, Arrangement of core membrane segments in the MotA/MotB proton-channel complex of *Escherichia coli*., *Biochemistry*. 43 (2004) 35–45.
- [20] E. Brombacher, A. Baratto, C. Dorel, P. Landini, Gene Expression Regulation by the Curli Activator CsgD Protein: Modulation of Cellulose Biosynthesis and Control of Negative Determinants for Microbial Adhesion., *Journal of Bacteriology*. 188 (2006) 2027–2037.
- [21] P.K. Brown, C.M. Dozois, C.A. Nickerson, A. Zuppardo, J. Terlonge, R. Curtiss, MlrA, a novel regulator of curli (AgF) and extracellular matrix synthesis by *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium., *Molecular Microbiology*. 41 (2001) 349–63.
- [22] M.S. Chadsey, J.E. Karlinsey, K.T. Hughes, The flagellar anti-sigma factor FlgM actively dissociates *Salmonella typhimurium* sigma28 RNA polymerase holoenzyme., *Genes & Development*. 12 (1998) 3123–36.
- [23] J.R. Chambers, K. Sauer, Small RNAs and their role in biofilm formation., *Trends in Microbiology*. 21 (2012) 39–49.
- [24] F.F. V Chevance, K.T. Hughes, Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine., *Nature Reviews. Microbiology*. 6 (2008) 455–65.
- [25] N.T. Chirwa, M.B. Herrington, CsgD, a regulator of curli and cellulose synthesis, also regulates serine hydroxymethyltransferase synthesis in *Escherichia coli* K-12., *Microbiology (Reading, England)*. 149 (2003) 525–35.
- [26] J.W. Costerton, G.G. Geesey, K.J. Cheng, How bacteria stick., *Scientific American*. 238 (1978) 86–95.

- [27] KA Datsenko, B.L. Wanner, One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97 (2000) 6640–5.
- [28] P.J. Farnham, Insights from genomic profiling of transcription factors., *Nature Reviews. Genetics*. 10 (2009) 605–16.
- [29] L. Ferrières, D.J. Clarke, The RcsC sensor kinase is required for normal biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 and controls the expression of a regulon in response to growth on a solid surface., *Molecular Microbiology*. 50 (2003) 1665–82.
- [30] P. Freire, J.D. Amaral, J.M. Santos, C.M. Arraiano, Adaptation to carbon starvation: RNase III ensures normal expression levels of *bolA1p* mRNA and σ (S)., *Biochimie*. 88 (2006) 341–6.
- [31] P. Freire, R.N. Moreira, C.M. Arraiano, BolA Inhibits Cell Elongation and Regulates MreB Expression Levels, *Journal of Molecular Biology*. 385 (2009) 1345–1351.
- [32] P. Freire, H.L. a Vieira, A.R. Furtado, M. a de Pedro, C.M. Arraiano, Effect of the morphogene *bolA* on the permeability of the *Escherichia coli* outer membrane., *FEMS Microbiology Letters*. 260 (2006) 106–11.
- [33] T.S. Furey, ChIP-seq and Beyond: new and improved methodologies to detect and characterize protein-DNA interactions., *Nat Rev Genet*. 13 (2013) 840–852.
- [34] D.R. Gentry, V.J. Hernandez, L.H. Nguyen, D.B. Jensen, M. Cashel, Synthesis of the stationary-phase sigma factor sigma s is positively regulated by ppGpp., *Journal of Bacteriology*. 175 (1993) 7982–9.
- [35] U. Gerstel, C. Park, U. Römling, Complex regulation of *csgD* promoter activity by global regulatory proteins., *Molecular Microbiology*. 49 (2003) 639–54.

- [36] U. Gerstel, U. Römling, Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate *agfD* promoter activity and expression of the multicellular morphotype in *Salmonella typhimurium*., *Environmental Microbiology*. 3 (2001) 638–48.
- [37] S. Gottesman, Stealth regulation: biological circuits with small RNA switches., *Genes & Development*. 16 (2002) 2829–42.
- [38] M. Guillier, S. Gottesman, Remodelling of the *Escherichia coli* outer membrane by two small regulatory RNAs., *Molecular Microbiology*. 59 (2006) 231–47.
- [39] S.B. Guttenplan, D.B. Kearns, Regulation of flagellar motility during biofilm formation., *FEMS Microbiology Reviews*. (2013).
- [40] M. Hammar, A. Arnqvist, Z. Bian, A. Olsén, S. Normark, Expression of two *csg* operons is required for production of fibronectin- and congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12., *Molecular Microbiology*. 18 (1995) 661–70.
- [41] K.J. Harder, H. Nikaido, M. Matsubishi, Mutants of *Escherichia coli* that are resistant to certain beta-lactam compounds lack the *ompF* porin., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 20 (1981) 549–52.
- [42] S. Haussler, C. Fuqua, *Biofilms 2012: New Discoveries and Significant Wrinkles in a Dynamic Field*., *Journal of Bacteriology*. (2013).
- [43] R. Van Houdt, C.W. Michiels, Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation., *Research in Microbiology*. 156 (2005) 626–33.
- [44] K.T. Hughes, K.L. Gillen, M.J. Semon, J.E. Karlinsey, Sensing structural intermediates in bacterial flagellar assembly by export of a negative regulator., *Science (New York, N.Y.)*. 262 (1993) 1277–80.

- [45] M. Inouye, Reverse Phosphotransfer from OmpR to EnvZ in a Kinase/Phosphatase Mutant of EnvZ, a Bifunctional Signal Transducer of *Escherichia coli*, *Journal of Biological Chemistry*. 271 (1996) 1424–1429.
- [46] J.W. Costerton, Z. Lewandowski, D.E. Caldwell, D.R. Korber, HM Lappin-Scott, Microbial biofilms, *Annu Rev Microbiol*. 49 (1995) 711-745.
- [47] K.F. Jarrell, M.J. McBride, The surprisingly diverse ways that prokaryotes move., *Nature Reviews. Microbiology*. 6 (2008) 466–76.
- [48] J. Jasiacki, G. Wegrzyn, Growth-rate dependent RNA polyadenylation in *Escherichia coli*., *EMBO Reports*. 4 (2003) 172–7.
- [49] L.J. Jones, R. Carballido-López, J. Errington, Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*., *Cell*. 104 (2001) 913–22.
- [50] M.G. Jørgensen, J.S. Nielsen, A. Boysen, T. Franch, J. Møller-Jensen, P. Valentin-Hansen, Small regulatory RNAs control the multi-cellular adhesive lifestyle of *Escherichia coli*., *Molecular Microbiology*. 84 (2012) 36–50.
- [51] G. Jubelin, A. Vianney, C. Beloin, J.-M. Ghigo, J.-C. Lazzaroni, P. Lejeune, et al., CpxR/OmpR interplay regulates curli gene expression in response to osmolarity in *Escherichia coli*., *Journal of Bacteriology*. 187 (2005) 2038–49.
- [52] J.E. Karlinsey, J. Lonner, K.L. Brown, K.T. Hughes, Translation/secretion coupling by type III secretion systems., *Cell*. 102 (2000) 487–97.
- [53] M. Ko, C. Park, H-NS-Dependent regulation of flagellar synthesis is mediated by a LysR family protein., *Journal of Bacteriology*. 182 (2000) 4670–2.
- [54] R. Lange, R. Hengge-Aronis, Growth phase-regulated expression of *bolA* and morphology of stationary-phase *Escherichia coli* cells are controlled by the novel sigma factor sigma S., *Journal of Bacteriology*. 173 (1991) 4474–81.

- [55] N. De Lay, S. Gottesman, A complex network of small non-coding RNAs regulate motility in *Escherichia coli*., *Molecular Microbiology*. 86 (2012) 524–538.
- [56] M.C. Leake, J.H. Chandler, G.H. Wadhams, F. Bai, R.M. Berry, J.P. Armitage, Stoichiometry and turnover in single, functioning membrane protein complexes., *Nature*. 443 (2006) 355–8.
- [57] Y.-H. Li, X. Tian, Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms., *Sensors (Basel, Switzerland)*. 12 (2012) 2519–38.
- [58] S. Lindenberg, G. Klauck, C. Pesavento, E. Klauck, R. Hengge, The EAL domain protein YciR acts as a trigger enzyme in a c-di-GMP signalling cascade in *E. coli* biofilm control., *The EMBO Journal*. (2013) 1–14.
- [59] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$ Method., *Methods (San Diego, Calif.)*. 25 (2001) 402–8.
- [60] H. Loferer, M. Hammar, S. Normark, Availability of the fibre subunit CsgA and the nucleator protein CsgB during assembly of fibronectin-binding curli is limited by the intracellular concentration of the novel lipoprotein CsgG., *Molecular Microbiology*. 26 (1997) 11–23.
- [61] F. Mika, R. Hengge, Small Regulatory RNAs in the Control of Motility and Biofilm Formation in *E. coli* and *Salmonella*., *International Journal of Molecular Sciences*. 14 (2013) 4560–79.
- [62] R.N. Moreira, C. Dressaire, S. Domingues, C.M. Arraiano, A new target for an old regulator: H-NS represses transcription of *bolA* morphogene by direct binding to both promoters., *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 411 (2011) 50–5.

- [63] Y. V Morimoto, S. Nakamura, K.D. Hiraoka, K. Namba, T. Minamino, Distinct roles of highly conserved charged residues at the MotA-FliG interface in bacterial flagellar motor rotation., *Journal of Bacteriology*. 195 (2013) 474–81.
- [64] N. Moriya, T. Minamino, K. Imada, K. Namba, Genetic analysis of the bacterial hook-capping protein FlgD responsible for hook assembly., *Microbiology (Reading, England)*. 157 (2011) 1354–62.
- [65] H. Nikaido, Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited., *Microbiol Mol Biol Rev*. 67 (2003) 593–656.
- [66] H. Ogasawara, K. Yamada, A. Kori, K. Yamamoto, A. Ishihama, Regulation of the *Escherichia coli* *csgD* promoter: interplay between five transcription factors., *Microbiology (Reading, England)*. 156 (2010) 2470–83.
- [67] H. Ogasawara, K. Yamamoto, A. Ishihama, Role of the biofilm master regulator CsgD in cross-regulation between biofilm formation and flagellar synthesis., *Journal of Bacteriology*. 193 (2011) 2587–97.
- [68] A. Olsén, A. Arnqvist, M. Hammar, S. Sukupolvi, S. Normark, The RpoS sigma factor relieves H-NS-mediated transcriptional repression of *csgA*, the subunit gene of fibronectin-binding curli in *Escherichia coli*., *Molecular Microbiology*. 7 (1993) 523–36.
- [69] M.R. Parsek, E.P. Greenberg, Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms., *Trends in Microbiology*. 13 (2005) 27–33.
- [70] C. Pesavento, G. Becker, N. Sommerfeldt, A. Possling, N. Tschowri, A. Mehrlis, et al., Inverse regulatory coordination of motility and curli-mediated adhesion in *Escherichia coli*., *Gene Dev*. 22 (2008) 2434–2446.
- [71] C. Pesavento, R. Hengge, The global repressor FliZ antagonizes gene expression by σ S-containing RNA polymerase due to overlapping DNA binding specificity., *Nucleic Acids Research*. 40 (2012) 4783–93.

- [72] T.L. Povolotsky, R. Hengge, “Life-style” control networks in *Escherichia coli*: signaling by the second messenger c-di-GMP., *Journal of Biotechnology*. 160 (2012) 10–6.
- [73] C. Prigent-combaret, E.V.A. Brombacher, O. Vidal, A. Ambert, P. Lejeune, P. Landini, et al., Complex Regulatory Network Controls Initial Adhesion and Biofilm Formation in *Escherichia coli* via Regulation of the *csgD* Gene., *Journal of Bacteriology*. 183 (2001) 7213–7223.
- [74] C. Prigent-Combaret, G. Prensier, T.T. Le Thi, O. Vidal, P. Lejeune, C. Dorel, Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid., *Environmental Microbiology*. 2 (2000) 450–64.
- [75] B.M. Prüss, C. Besemann, A. Denton, A.J. Wolfe, A complex transcription network controls the early stages of biofilm development by *Escherichia coli*., *Journal of Bacteriology*. 188 (2006) 3731–9.
- [76] U. Römling, Z. Bian, M. Hammar, W.D. Sierralta, S. Normark, Curli fibers are highly conserved between *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation., *Journal of Bacteriology*. 180 (1998) 722–31.
- [77] U. Römling, M. Gomelsky, M.Y. Galperin, C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system., *Molecular Microbiology*. 57 (2005) 629–39.
- [78] U. Römling, W.D. Sierralta, K. Eriksson, S. Normark, Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter., *Molecular Microbiology*. 28 (1998) 249–64.
- [79] P. Ross, R. Mayer, M. Benziman, Cellulose biosynthesis and function in bacteria., *Microbiological Reviews*. 55 (1991) 35–58.
- [80] D.A. Ryjenkov, R. Simm, U. Römling, M. Gomelsky, The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: the PilZ domain protein YcgR

- controls motility in enterobacteria., *The Journal of Biological Chemistry*. 281 (2006) 30310–4.
- [81] J. Sambrook, M. Green, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Fourth Edition, 2012.
- [82] J.M. Santos, D. Drider, P.E. Marujo, P. Lopez, C.M. Arraiano, Determinant role of *E. coli* RNase III in the decay of both specific and heterologous mRNAs., *FEMS Microbiology Letters*. 157 (1997) 31–8.
- [83] J.M. Santos, P. Freire, F.S. Mesquita, F. Mika, R. Hengge, C.M. Arraiano, Poly(A)-polymerase I links transcription with mRNA degradation via sigmaS proteolysis., *Molecular Microbiology*. 60 (2006) 177–88.
- [84] J.M. Santos, P. Freire, M. Vicente, C.M. Arraiano, The stationary-phase morphogene *bolA* from *Escherichia coli* is induced by stress during early stages of growth., *Molecular Microbiology*. 32 (1999) 789–98.
- [85] J.M. Santos, M. Lobo, A.P. a Matos, M. a De Pedro, C.M. Arraiano, The gene *bolA* regulates *dacA* (PBP5), *dacC* (PBP6) and *ampC* (AmpC), promoting normal morphology in *Escherichia coli*., *Molecular Microbiology*. 45 (2002) 1729–40.
- [86] K. Sauer, A.K. Camper, G.D. Ehrlich, J.W. Costerton, D.G. Davies, *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm., *Journal of Bacteriology*. 184 (2002) 1140–54.
- [87] T. Schirmer, U. Jenal, Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signalling., *Nature Reviews. Microbiology*. 7 (2009) 724–35.
- [88] R. Simm, M. Morr, A. Kader, M. Nimtz, U. Römling, GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility., *Molecular Microbiology*. 53 (2004) 1123–34.

- [89] B.G. Spratt, A.B. Pardee, Penicillin-binding proteins and cell shape in *E. coli.*, *Nature*. 254 (1975) 516–7.
- [90] V. Stelitano, A. Brandt, S. Fericola, S. Franceschini, G. Giardina, A. Pica, et al., Probing the activity of diguanylate cyclases and c-di-GMP phosphodiesterases in real-time by CD spectroscopy., *Nucleic Acids Research*. (2013) 1–9.
- [91] A. Sterkenburg, E. Vlegels, J.T. Wouters, Influence of nutrient limitation and growth rate on the outer membrane proteins of *Klebsiella aerogenes* NCTC 418., *Journal of General Microbiology*. 130 (1984) 2347–55.
- [92] K.M. Thormann, A. Paulick, Tuning the flagellar motor., *Microbiology (Reading, England)*. 156 (2010) 1275–83.
- [93] S. Uzzau, N. Figueroa-Bossi, S. Rubino, L. Bossi, Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98 (2001) 15264–9.
- [94] M. Vicente, S.R. Kushner, T. Garrido, M. Aldea, The role of the “gearbox” in the transcription of essential genes., *Molecular Microbiology*. 5 (1991) 2085–91.
- [95] H.L.A. Vieira, P. Freire, C.M. Arraiano, Effect of *Escherichia coli* Morphogene *bolA* on Biofilms Effect of *Escherichia coli* Morphogene *bolA* on Biofilms., *Applied and Environmental Microbiology*. 70 (2004) 5682-5684.
- [96] H. Vlamakis, R. Kolter, and Daniel López, Biofilms., *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. (2010) 1–11.
- [97] P. Watnick, R. Kolter, Biofilm, city of microbes., *Journal of Bacteriology*. 182 (2000) 2675–9.
- [98] J.S. Webb, M. Givskov, S. Kjelleberg, Bacterial biofilms: prokaryotic adventures in multicellularity., *Current Opinion in Microbiology*. 6 (2003) 578–85.

- [99] H. Weber, C. Pesavento, A. Possling, G. Tischendorf, R. Hengge, Cyclic-di-GMP-mediated signalling within the sigma network of *Escherichia coli*., *Molecular Microbiology*. 62 (2006) 1014–34.
- [100] A.J. Wolfe, K.L. Visick, Get the message out: cyclic-Di-GMP regulates multiple levels of flagellum-based motility., *Journal of Bacteriology*. 190 (2008) 463–75.
- [101] T.K. Wood, A.F. González Barrios, M. Herzberg, J. Lee, Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*., *Applied Microbiology and Biotechnology*. 72 (2006) 361–7.
- [102] K. Yamamoto, R. Nagura, H. Tanabe, N. Fujita, a Ishihama, R. Utsumi, Negative regulation of the *bolA1p* of *Escherichia coli* K-12 by the transcription factor *OmpR* for osmolarity response genes., *FEMS Microbiology Letters*. 186 (2000) 257–62.
- [103] K. Zhao, M. Liu, R.R. Burgess, Adaptation in bacterial flagellar and motility systems: from regulon members to “foraging”-like behavior in *E. coli*., *Nucleic Acids Research*. 35 (2007) 4441–52.
- [104] E. Zobell, D. Quentin, Observations on the multiplication of the bacteria in different volumes of stored sea water and the influence of oxygen tension and solid surfaces., (1901) 324–342.
- [105] V. Zorraquino, B. García, C. Latasa, M. Echeverz, A. Toledo-Arana, J. Valle, et al., Coordinated cyclic-di-GMP repression of *Salmonella* motility through *YcgR* and cellulose., *Journal of Bacteriology*. 195 (2013) 417–28.



ANEXOS

ANEXO I

MATERIAIS

Tabela 11 - Meios de cultura, soluções e géis.

Meio LB	Meio LA
1% Triptona	1% Triptona
0,5% Extracto de Levedura	0,5% Extracto de Levedura
170mM NaCl	170mM NaCl
	1,5% Agar
Meio SOC	Ampicilina
2% Triptona	100 mg/ml em H ₂ O MQ
0,5% Extracto de Levedura	Esterilizar com filtro de 0,2 µm
10mM NaCl	
2,5mM de KCl	
10mM MgCl ₂	
Canamicina	Cloranfenicol
50mg/ml em H ₂ O MQ	50mg/ml em Etanol
Esterilizar com filtro de 0,2 µm	Esterilizar com filtro de 0,2 µm
Meio de Triptona	PBS 1X
1% Triptona	137mM NaCl
0,5% NaCl	2,7mM KCl
0,35% Agar	8,1mM Na ₂ HPO ₄
	1,47mM KH ₂ PO ₄
TBE 1X	Solução de extracção
89mM Tris Base	Acetonitrilo, Metanol, H ₂ O: 2:2:1 (v/v/v)
89mM Ácido Bórico	
2mM EDTA	

DNA Loading Buffer Orange G 6X	Solução de Lise 1X
10mM Tris-HCl, pH 7,6	250U/μl Lisozima
0,15% <i>Orange G</i>	25% Glicerol
60% Glicerol	50mM Tris-HCl
60mM EDTA	100mM NaCl
	1mM DTT
	0,1% Triton X-100
Tampão Fosfato de Sódio 1X	TBS 1X
42,25ml Na ₂ HPO ₄ 1M	50mM Tris Base
7,75ml NaH ₂ PO ₄ .1M	150mM NaCl
Perfazer o volume para 50ml com H ₂ O MQ	
Ajustar o pH para 7.6	
Tampão TES 1X	Tampão ChIP 1X
10mM Tris-HCl	1,1% Triton X-100
1mM EDTA	1,2mM EDTA
100mM NaCl	16,7mM Tris-HCl
	167mM NaCl
	20μg/ml Inibidor de Protease
Tampão de baixa concentração salina 1X	Tampão de alta concentração salina 1X
0,1% SDS	0,1% SDS
1% Triton X-100	1% Triton X-100
2mM EDTA	2mM EDTA
20mM Tris-HCl	20mM Tris-HCl
150mM NaCl	500mM NaCl
Tampão LiCl	Tampão TE
25mM LiCl	10mM Tris-HCl
1% NP-40	1mM EDTA
1% <i>Deoxycholate</i>	
1mM EDTA	
10mM Tris-HCl	

Tampão de eluição	Complete EDTA Free-Protease
1% SDS 100mM NaHCO ₃	Dissolver 1 comprimido em 1ml H ₂ O MQ.
Tampão de transferência 1X	Protein Loading Buffer 5X
0,1% SDS 25mM Tris Base 192mM Glicina 20% Metanol	0,3M Tris-HCl pH 6,8 12% SDS 12% Azul de Bromofenol
Tampão de corrida SDS-PAGE 1X	Gel Stacking
0,1% SDS 25mM Tris Base 192mM Glicina	5% Poliacrilamida (Bio-Rad) 0,2M Tris-HCl (pH 6.8) 0,1% SDS 0,05% APS 0,17% TEMED
Gel Resolving	Azul de Coomassie
10% Poliacrilamida (Bio-Rad) 0,4M Tris-HCl (pH 8.8) 0,1% SDS 0,03% APS 0,13% TEMED	0,05% Azul de Coomassie 10% Ácido acético 50% Metanol
Tampão A	Tampão B
20mM Fosfato de sódio 0,5M NaCl 20mM Imidazole pH7,4	20mM Fosfato de sódio 0,5M NaCl 50mM Imidazoli pH 7,4
Tampão C	
20mM Fosfato de sódio 0,5M NaCl 1mM DTT pH 7,4	

ANEXO II

ESTIRPES BACTERIANAS

Tabela 12 - Estirpes bacterianas usadas neste estudo.

Estirpes	Genótipo Relevante	Referência
DH5α	F' <i>fhuA2</i> Δ(<i>argF-lacZ</i>) <i>U169 phoA glnV44 φ80</i> Δ(<i>lacZ</i>)M15 <i>gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1</i> <i>hsdR17a</i>	Estirpe Comercial
AB330	<i>lac+</i> <i>gal490 cI857 (cro-bioA)</i>	[10]
MG1655	F- λ- <i>ilvG rfb-50 rph-1 fnr-267</i>	[13]
MG1655 Δ <i>bolA</i>	MG1655 delectante no gene <i>bolA</i>	Dressaire, C. <i>et al</i> ; Artigo em preparação
MG1655 Δ <i>ycgR</i>	MG1655 delectante no gene <i>ycgR</i>	Este estudo
MG1655 Δ <i>bolA</i> Δ <i>ycgR</i>	MG1655 com dupla delecção nos genes <i>bolA</i> e <i>ycgR</i>	Este estudo
MG1655 <i>bolA::3xFlag-kan^R</i>	MG1655 com fusão cromossomal da sequência 3xFLAG à região 3' do gene <i>bolA</i>	Este estudo
MG1655 + pMAK580	MG1655; sobre-expressão do gene <i>bolA</i> sob controlo dos promotores nativos no plasmídeo pMAK580	Dressaire, C. <i>et al</i> ; Artigo em preparação
MG1655Δ <i>bolA</i> +pBAD- <i>bolA</i>	MG1655 delectante no gene <i>bolA</i> ; sobre-expressão do gene <i>bolA</i> sob controlo do promotor indutível por arabinose presente no plasmídeo pBAD	Dressaire, C. <i>et al</i> ; Artigo em preparação
BL21 (DE3) + pPFA02	F- <i>ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ(DE3 [lacI</i> <i>lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]</i> Sobre-expressa <i>BolA</i> -(His) ₆ no plasmídeo pPFA02	[31]

PLASMÍDEOS

Tabela 13 – Plasmídeos usados neste estudo.

Plasmídeo	Características relevantes	Referência
pMAK580	Plasmídeo de médio número de cópias que contém o gene <i>bolA</i> sob a regulação dos promotores nativos, <i>bolAp1</i> e <i>bolAp2</i> ; ColE1; <i>amp^R</i> ; <i>cm^R</i> .	[2]
pBAD- <i>bolA</i>	Plasmídeo de elevado número de cópias. Contém o gene <i>bolA</i> clonado sob a regulação do promotor <i>araBAD</i> ; <i>amp^R</i> .	Dressaire, C. <i>et al</i> ; Artigo em preparação
pSUB11	<i>3xFLAG FRT ahp FRT bla R6KoriV</i>	[93]
pKD46	<i>araC</i> ; <i>bla</i> ; OriR101; λ Red recombinase	[27]

ANEXO III

OLIGONUCLEÓTIDOS

Tabela 14 - Oligonucleótidos usados na amplificação da cassette de resistência ao cloranfenicol.

Oligonucleótido	Sequência
rnm123	GATAAACCAAAGACAGTTTGTTCAGTCAGGAGTTTTTCCGCGTGAGTC ATTACCATGAGCAGTTCCTGAAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
rnm124	TATATCTACAAACTTGAGCAGGCACTGGACGCGATGTAAATCAGTC GCGCACTTTGTCCGCTTTTTCCCGCATATGAATATCCTCCTTAG

Tabela 15 - Oligonucleótidos usados na amplificação da região $\Delta ycgR:cm^R$.

Oligonucleótido	Sequência
rnm135	ATCGATGCTGGGCGTATGTC
rnm136	CGTAGCGGAAATCACCCCTG

Tabela 16 - Oligonucleótidos usados na amplificação da sequência codificante de 3xFLAG-*kan*^R.

Oligonucleótido	Sequência
rnm112	CTTTGCCTCTCCTCCCTGTTCGTGGAGCAGGAAGCATCGCGTTCGACT ACAAAGACCATGACGG
rnm114	GCAACATACTGGAAAAGCGCCGACAGTTGCAAATGCGTTTCATATG AATATCCTCCTTAG

Tabela 17 - Oligonucleótidos usados na amplificação da região codificante *bolA::3xFLAG-kan*^R.

Oligonucleótido	Sequência
rnm115	GGGTGAACGTTTTCTGAATCG
rnm109	GTAATCGTTACACGGCGGCAAGG

Tabela 18 - Oligonucleótido usado na sequenciação da região codificante *bolA-3xFLAG:kan^R*.

Oligonucleótido	Sequência
X9	CCAGACAAAACAAAACGGCCCG

Tabela 19 - Oligonucleótidos usados para qRT-PCR e respectivos genes de interesse.

Gene	Forward	Reverse
<i>bolA</i>	GGGTGAACGTTTTCTGAATCG	CAACCCTTCCCACTCCTTAATAG
<i>cysG</i> *	GACGCTGGTGTCTATATGGG	GGCATTCCGTGTTCAATCAG

*Gene de referência

Tabela 20 - Oligonucleótidos usados na amplificação do promotor do gene *mreB*.

Oligonucleótido	Sequência
<i>mreBfwa</i>	GGGGTACCGCCACTTGATACTAACGTG
<i>mreBrev</i>	CCATCGATGGGGCGGAAAAGAAAATC

Todos os oligonucleótidos usados neste estudo foram desenhados usando o programa Clone Manager Suite 7 e sintetizados pela STAB Vida, Portugal.

ANEXO IV

SOBRE-EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA BOLA PARA SÍNTESE DE ANTICORPOS POLICLONAIS

Para a purificação da proteína Bola, uma cultura em fase estacionária da estirpe BL21 (DE3) contendo o plasmídeo pPFA02 foi diluída para uma OD₆₀₀ igual a 0,1 em 250ml de meio fresco e incubada a 37°C até atingir uma OD₆₀₀ igual a 0,5. Ao ser atingida a OD₆₀₀ pretendida a sobre-expressão da proteína Bola foi induzida com 1mM IPTG e a cultura novamente incubada durante 2h a 37°C, com agitação. De seguida, a cultura foi centrifugada 10min a 3800g e o precipitado celular armazenado a -80°C. A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade usando as colunas HisTrap Chelating HP (GE Healthcare), no sistema AKTA (GE Healthcare). Para tal, as células foram descongeladas e ressuspensas em 3ml de tampão A (20mM Fosfato de Sódio, 0,5M NaCl, 20mM Imidazole, pH 7,4). Foi adicionado 1mM de PMSF à suspensão celular, procedendo-se em seguida à sua lise utilizando o sistema French Press (Thermo) com uma pressão de 9000psi. Após a lise o extracto proteico foi tratado com 0,04U/μl Benzonase (Sigma) e incubado 30min em gelo. Após o período de incubação a amostra foi centrifugada a 4°C, 30min a 10000g.

O sobrenadante obtido foi transferido para a coluna HisTrap Chelating HP (GE Healthcare) equilibrada em tampão A (20mM fosfato de sódio pH 7,4, 0,5M NaCl, 20mM imidazole). A eluição da proteína de interesse foi realizada a partir de um gradiente contínuo de tampão B (20mM Fosfato de Sódio, 0,5M NaCl, 500mM Imidazole, pH 7,4 (de 0% a 100%)) durante 20min. O conjunto das amostras de proteína foi transferido para um único tubo e procedeu-se à troca de tampão para o tampão C (20mM sodium phosphate, 0.5M NaCl, 1mM DTT, pH 7.4), utilizando uma coluna HiTrap Desalting (GE Healthcare) . Seguidamente, as fracções contendo a proteína purificada foram concentradas por centrifugação a 4°C em Amicon Ultra Centrifugal Filter Device (Millipore) com um *cutoff* de peso molecular de 10kDa. A concentração da proteína foi determinada utilizando o método de Bradford [18]. De forma breve, foi adicionado 1ml de Reagente Quick Start™ Bradford 1X (Biorad) a 10μl da amostra proteica, incubando-se 5min à temperatura ambiente. Foi determinada a OD₅₉₅ da

amostra e a concentração da proteína purificada calculada a partir da curva padrão de Bradford. A proteína BolA purificada foi visualizada em gel SDS-PAGE 10% corado com corante Azul de Coomassie. 400µg de proteína foram enviados para a Eurogentec para produção de anticorpos anti-BolA.