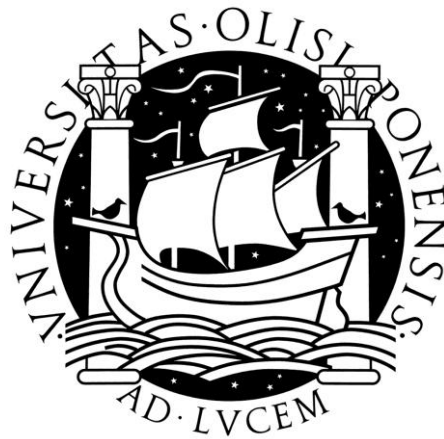


Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Química e Bioquímica



Estudo do gene *ric* de *Staphylococcus aureus*

Catarina Sofia Caetano Godinho

Dissertação

Mestrado em Bioquímica

Especialização em Bioquímica Médica

2012

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Química e Bioquímica



Estudo do gene *ric* de *Staphylococcus aureus*

Catarina Sofia Caetano Godinho

Dissertação

Mestrado em Bioquímica

Especialização em Bioquímica Médica

Orientadores:

Doutora Lígia M. Saraiva, Instituto de Tecnologia Química e Biológica, UNL

Professora Doutora Ana Ponces Freire, Faculdade de Ciência, UL

2012

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para que a realização deste trabalho fosse possível:

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à Doutora Lígia Saraiva por me ter acolhido no seu grupo de investigação e por todo o apoio e orientação que me deu ao longo deste ano de estágio.

Gostaria também de agradecer a todos os meus colegas de laboratório, que graças a todo o apoio e companheirismo tornaram este desafio muito mais fácil de ultrapassar, e em especial à Lígia Nobre por partilhar os seus conhecimentos e por estar sempre disponível para esclarecer qualquer dúvida. Todos vocês ficarão sempre na minha memória.

A todos os meus amigos de faculdade que tornaram os 5 anos de curso na FCUL os melhores anos da minha vida, e em especial à Orcy, uma amiga incondicional com quem sempre pude contar.

Às minhas colegas de casa e amigas, Belinha e Vanessa, por todos os bons momentos passados.

Para o Rodrigo um abraço especial por me aturar sempre com um sorriso e por todo o amor e apoio dado nos momentos mais tremidos.

E por último, mas não menos importante, à minha família por sempre acreditarem em mim e por estarem sempre presentes.

Um Grande Obrigado a Todos!!

Resumo

O patógeno humano *Staphylococcus aureus* possui uma elevada capacidade de infeção graças às inúmeras estratégias de que dispõe para sobreviver no interior de células fagocitárias do sistema imunitário inato. Dentro do hospedeiro, *S. aureus* é sujeito a concentrações elevadas de espécies reativas de oxigénio (ERO) e de azoto (ERA) que danificam componentes celulares vitais para a sobrevivência da bactéria. Contudo *S. aureus* dispõe de várias proteínas que permitem eliminar estas espécies reativas e reparar os danos sofridos durante a exposição a estes compostos. A Ric (*repair of iron centers*) de *S. aureus* é uma das proteínas cujo gene tem uma expressão aumentada durante a exposição das células de *S. aureus* a peróxido de hidrogénio (H₂O₂) e óxido nítrico (NO). Em estudos bioquímicos, foi mostrado que esta proteína é capaz de reparar centros de ferro-enxofre oxidados ou nitrosilados.

Neste estudo pretendeu-se estabelecer que sistemas de regulação controlam a expressão do gene *ric* em *S. aureus*. Um dos candidatos é o sistema de regulação SrrAB, que se encontra descrito como estando associado à expressão de genes induzidos por NO. Para investigar se SrrAB controla a expressão do gene *ric* tentou-se gerar uma estirpe de *S. aureus* mutada no operão *srrAB*. Para tal várias metodologias foram utilizadas, contudo a mutação não foi alcançada. O papel dos reguladores globais Fur e PerR, envolvidos na homeostase do ferro e nas respostas ao *stress* oxidativo, respetivamente, foi também avaliado. Para tal determinou-se, por ensaios semiquantitativos de RT-PCR, os níveis de transcrição do gene *ric* em mutantes de *S. aureus* Δfur e $\Delta perR$. Deste modo, mostrou-se que em *S. aureus* os reguladores Fur e PerR controlam positivamente a transcrição do gene *ric*.

Palavras-Chave:

Staphylococcus aureus, *ric*, regulação transcricional, SrrAB, PerR, Fur.

Abstract

Staphylococcus aureus is a Gram-positive coccus that can cause life-threatening diseases when invades the human body. Inside the host, this pathogen can easily evade the innate immune response thanks, in part, to its sophisticated systems which eliminate oxidative and nitrosative species and promote the repair of the damages inflicted. The *S. aureus* Ric (repair of iron centers) is one of the proteins whose gene is up-regulated when *S. aureus* cells are exposed to hydrogen peroxide (H₂O₂) and nitric oxide (NO). It has been shown that this protein has the ability to restore iron-sulfur clusters damaged by oxidation and nitrosylation. The goal of this study is to understand which transcription factors of *S. aureus* control the expression of *ric* gene. The two-component regulatory system SrrAB, which has been implicated in the control of genes induced by NO, is one of the regulators that may be involved in the *ric* expression. To address this question, the generation of a *S. aureus* strain with a silent *srrAB* operon was attempted through different methodologies. However, the successful mutation could not be achieved. The role of *S. aureus* Fur and PerR in *ric* expression was also investigated. These two proteins are well known transcription factors that control iron-homeostasis and inducible peroxide-defense genes, respectively. In this study, we performed RT-PCR semi-quantitative analyses of *ric* transcription in the *S. aureus* Δfur and $\Delta perR$ mutant strains and established that *ric* gene is positively controlled by both Fur and PerR.

Keywords:

Staphylococcus aureus, *ric*, gene regulation, SrrAB, Fur, PerR

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	v
Índice	vii
Índice de Figuras	ix
Índice de Quadros	xiii
Lista de Abreviaturas	xiv
Introdução Teórica	1
1. <i>Staphylococcus aureus</i>	3
2. Proteínas de ferro-enxofre	5
2.1 Mecanismos de formação dos centros ferro-enxofre.....	8
3. <i>Stress</i> oxidativo e nitrosativo e o combate contra bactérias patogénicas	11
4. Defesas bacterianas contra <i>stress</i> oxidativo e nitrosativo	14
4.1 Proteínas de destoxificação	14
4.2 As proteínas Ric e a reparação de centros Fe-S.....	15
5. Regulação das defesas	17
5.1 Fur	17
5.2 PerR.....	17
5.3 SrrAB	18
Materias e métodos	19
1. Estirpes bacterianas e condições de crescimento	23
2. Plasmídeos e <i>primers</i>	24
3. Enzimas	25
4. Kits	26
5. Outros reagentes	26
6. Técnicas gerais de clonagem.....	26
6.1 Ligações DNA plasmídico-fragmento de DNA	26
6.2 Preparação de células de <i>E. coli</i> DH5 α competentes pelo método TSS.....	26
6.3 Preparação de células de <i>E. coli</i> XL1-Blue competentes pelo método TB	27
6.4 Transformações em <i>E. coli</i> DH5 α e XL1-Blue pelo método do choque térmico.....	27
6.5 Análise do contido genético de colónias de <i>E. coli</i> para identificação de recombinantes – “PCR de colónias”	28
6.6 Desfosforilações de cadeias de DNA plasmídico lineares	29

6.7	<i>Stocks</i> de estirpes bacterianas	29
6.8	Sequenciações de cadeias de nucleótídicas	29
6.9	Eletroforese em gel de agarose.....	29
6.10	Quantificação de amostras de DNA e RNA	30
7.	Pesquisa de potências proteínicas da família NsrR em <i>S. aureus</i>	30
8.	Silenciamento dos genes <i>srrAB</i> e <i>ric</i> de <i>S. aureus</i> NCTC 8325.....	31
8.1	Construção do plasmídeo pSP64E/ <i>srrA</i>	31
8.2	Construção do plasmídeo pSP64E/ <i>ric</i>	32
8.3	Electrotransformação de <i>S. aureus</i> RN4220 com as plasmídeos recombinantes pSP64E/ <i>srrAB</i> e pSP64E/ <i>ric</i>	33
8.3.1	Preparação de células de <i>S. aureus</i> RN4220 competentes	33
8.3.2	Preparação do plasmídeo para eletroporação	33
8.3.3	Transformação de <i>S. aureus</i> RN4220 competentes por eletroporação.....	33
8.3.4	Identificação dos clones de <i>S. aureus</i> RN4220 mutantes	34
8.4	Mutações de <i>S. aureus</i> com o plasmídeo termosensível pMAD	34
8.4.1	Construção do plasmídeo recombinante pMAD/ <i>srrA</i> /kan	34
8.4.2	Construção do plasmídeo pMAD/ <i>ric</i> /kan	36
9.	Níveis de expressão do gene <i>ric</i> nas estirpes mutadas NCTC8325 Δfur e NCTC 8325 $\Delta perR$... 37	
9.1	Confirmação das mutações $\Delta perR$ e Δfur	37
9.2	Crescimentos celulares e recolha de células para isolamento de RNA total	38
9.3	Extração do RNA total e purificação.....	38
9.4	Síntese de cDNA e avaliação dos níveis de expressão do gene <i>ric</i>	39
	Resultados e Discussão.....	41
1.	Confirmação da sequência de nucleótidos do gene SAOUHSC_01732 de <i>S. aureus</i>	43
2.	Silenciamento dos genes <i>srrAB</i> de <i>S. aureus</i>	47
3.	Silenciamento do gene <i>ric</i> de <i>S. aureus</i>	54
4.	Níveis de expressão do gene Ric	58
4.1	Confirmação das mutações das estirpes em estudo	58
4.2	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i> (RT-PCR)	60
	Conclusão	63
	Bibliografia	67
	Anexos	75

Índice de Figuras

- Figura 1:** Imagem de microscopia eletrônica de bactérias *Staphylococcus aureus*. O seu aspeto esférico e organização em grupos é muitas vezes associado com um cacho de uvas. Imagem retirada de Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library (PHIL) #11157 3
- Figura 2:** Estruturas de quatro tipos de centro de ferro-enxofre. Fe – átomos de ferro; S – átomos de enxofre; Cys – ligandos de cisteína..... 5
- Figura 3:** Centro de ferro-enxofre do enzima aconitase. Três dos quatro ferros do centro de ferro-enxofre estão ligados a três resíduos de cisteína do enzima O quarto ferro liga-se ao substrato citrato. Deste modo, o centro de ferro-enxofre contribui para o posicionamento do substrato no centro ativo do enzima assim como para a sua catálise (Adaptado de [14]). 6
- Figura 4:** Mecanismo proposto para a oxidação e conseqüente conversão do centro de ferro-enxofre do regulador FNR. Quando o centro [4Fe-4S] dos monómeros de FNR são expostos a oxigénio, estes são rapidamente oxidados e convertidos na forma [2Fe-2S]. Acredita-se que esta conversão ocorra por intermédio de um centro [3Fe-4S] instável, que ao perder um átomo de Fe³⁺ e dois átomos de S²⁻ é convertido na forma de [2Fe-2S]. (Adaptado de [16]) 7
- Figura 5:** Operões que codificam os diferentes componentes dos sistemas de montagem de centros de ferro-enxofre Isc e Suf de *E. coli*. 9
- Figura 6:** Princípios comuns na síntese de centros de ferro-enxofre. O centro composto por átomos de ferro e enxofre é montado numa proteína *scaffold* sendo posteriormente transferidos para a apoproteína alvo (Adaptado de [10])..... 10
- Figura 7:** Formação de espécies reativas de oxigénio por redução sequencial da molécula de oxigénio. O₂ – molécula de oxigénio; O₂⁻ - anião radical superóxido; H₂O₂ – peróxido de hidrogénio; HO[•] – radical hidroxilo; OH⁻ - anião hidroxilo; e⁻ - eletrões (Adaptado de [38]) 11
- Figura 8:** Reatividade da molécula de NO. A reação de uma molécula de óxido nítrico (NO) com um centro de ferro-enxofre leva à formação de um complexo de ferro dinitrosilado (DNIC) que provoca a inativação do enzima. NO pode ainda reagir com superóxido (O₂⁻) formando peroxinitrito (Adaptado de [58]). 13
- Figura 9:** Distribuição das proteínas Ric. Dendrograma construída com 102 sequências de proteínas Ric. Os organismos para os quais existem estudos sobre o papel da proteína Ric encontram-se indicados (Adaptado de [67]). 16
- Figura 10:** Modelo da regulação por SrrAB. SrrB, que se encontra na membrana celular, é autofosforilado em resposta a um estímulo exterior. Após uma transferência do grupo fosfato do componente SrrB para o componente citoplasmático SrrA, este último adquire a capacidade de se ligar às regiões promotoras dos genes que regula..... 19
- Figura 11:** Sequências peptídicas das proteínas hipotéticas de diferentes estirpes de *S. aureus* que possuem a maior identidade com a proteína NsrR de *Bacillus subtilis*. As proteínas hipotéticas SAV1626 de *S. aureus* Mu50, SA1453 de *S. aureus* N315 e MW1576 de *S. aureus* MW2 possuem 30% de identidade com a proteína NsrR de *B. subtilis* (nsrR_Bsubt) e são iguais entre si. Estas são compostas por apenas um resíduo de cisteína. A proteína hipotética SAOUHSC_01732 (SAOUHSC_01) identificada no na estirpe NCTC8325 possui uma identidade de 28% com a proteína NsrR de *B. subtilis* e contem três resíduos de cisteína, apesar sua sequência peptídica diferir das

restantes apenas nos últimos 15 aminoácidos. Os resíduos de cisteína das sequências das proteínas de *S. aureus* encontram-se assinalados por círculos a vermelho. Os três resíduos cisteína da proteína NsrR de *B. subtilis* que ligam o centro de ferro-enxofre encontram-se assinalados por setas a laranja. 44

Figura 12: Confirmação por digestão enzimática da correta clonagem do fragmento de DNA SAOUHSC_01732 de *S. aureus* em pUC18. (A) Mapa do plasmídeo recombinante pUC18/S_01732 que resultou da clonagem de um fragmento de DNA que inclui a sequência do gene SAOUHSC_01732 de *S. aureus* em pUC18. O plasmídeo recombinante possui um único local de restrição MfeI. Este encontra-se incluído na sequência de DNA do fragmento clonado pelo que foi usado para confirmação da correta ligação deste fragmento de DNA ao vetor. (B) Eletroforese em gel de agarose dos produtos resultantes da incubação do plasmídeo recombinante pUC18/S_01732 com o enzima de restrição MfeI. A única banda visível correspondente ao tamanho total do plasmídeo recombinante (3 375 bp) na forma linear, confirmando-se assim a presença do fragmento de DNA clonado. 45

Figura 13: A sequência do gene SAOUHSC_01732 descrita na base de dados do genoma de *S. aureus* NCTC 8325 não corresponde à sequência real de nucleótidos presente no genoma desta estirpe. O alinhamento entre a sequência de nucleótidos do gene SAOUHSC_01732 (1), constante nas bases de dados (sequência teórica), e a sequência de nucleótidos que na realidade figura na mesma região do genoma de *S. aureus* NCTC 8325 (2) permitiu identificar a diferença de uma base entre sequências (seta vermelha). Esta diferença leva a que cada sequência codifique uma sequência peptídica diferente uma vez que não possuem a mesma grelha de leitura. O codão stop de cada sequência é assinalado a vermelho. 46

Figura 14: Mapa do plasmídeo pSP64E. Os principais componentes do plasmídeo estão indicados: gene de resistência à ampicilina para seleção em *E. coli*, *amp^R*; gene de resistência à eritromicina para seleção em *S. aureus*, *erm^R*; origem de replicação em *E.coli*, ori. Os principais locais de restrição enzimática estão representados segundo a sua posição relativa. 47

Figura 15: Esquema da construção do plasmídeo recombinante pSP64E/srrA. (A) O plasmídeo pSP64E/srrA foi construído amplificando um fragmento de DNA interno do gene *srrA* com os *primers* msrrAB_up e msrrAB_low e clonando este fragmento nos locais de restrição SacI e BamHI do plasmídeo pSP64E. (B) Da digestão do plasmídeo recombinante pSP64E/srrA com o enzima EcoRI resultaram dois fragmentos de DNA com aproximadamente 500 bp e 4 100 bp (1), o que confirmou que este plasmídeo continha o fragmento do gene *srrA* clonado no local pretendido. M – marcador 1 kpb da Roht 48

Figura 16: Representação esquemática do processo de mutação do gene *srrA* por integração do plasmídeo pSP64E/srrA. Após introdução do plasmídeo recombinante em células de *S. aureus* por eletroporação o plasmídeo é integrado no DNA genómico através de um evento de recombinação por homologia. No caso de a recombinação ser bem-sucedida o gene *srrA* é interrompido por um gene de resistência à eritromicina e o operão *srrAB* silenciado. Os *primers* srrAB(mut)_up e Erm1_comp (representados por setas a preto) foram usados na análise por PCR do DNA genómico dos potenciais clones de *S. aureus* mutantes (clone que apresentaram resistência à eritromicina após eletroporação) para confirmação da presença da mutação pretendida. 49

Figura 17: Mapa do plasmídeo pMAD. Este plasmídeo é composto por: duas origens de replicação, uma para replicação em *E. coli* (ori PBR22) e outra para *S. aureus* (ori pE194^{ts}); um gene de resistência a ampicilina para seleção em *E.coli* (*amp^R*); um gene de resistência a eritromicina para seleção em *S. aureus* (*erm^R*); um gene que codifica uma β-galactosidase para identificação de

transformantes na presença de X-gal; uma região *polylinker* com vários locais únicos de restrição para clonagem. 50

Figura 18: Representação esquemática dos dois eventos de recombinação que permitem a substituição de uma sequência funcional de um gene por uma sequência interrompida. Dois fragmentos de DNA, A e B, cada um incluindo cerca de metade do gene que se pretende silenciar, foram amplificados a partir de DNA genômico e clonados no plasmídeo pMAD com um gene de resistência a antibiótico (por exemplo um gene de resistência à canamicina, *kan^R*). No interior das células de *S. aureus* o processo de mutação ocorrerá como consequência de dois eventos de recombinação por homologia. Num primeiro evento de recombinação entre as duas sequência homologas A levará à integração do plasmídeo na DNA genômico. Num segundo evento de recombinação entre as sequências B, ocorrerá excisão do DNA plasmídeo integrado e eliminação do gene funcional (A+B). Adaptado de [85]..... 51

Figura 19: Esquema da estratégia usada na construção do plasmídeo recombinante pMAD/*srrA*. (A) Um fragmento de DNA de 1939 bp, incluindo a totalidade da sequência do gene *srrA* (726 bp), foi amplificado com os *primers* *srrAB_01* e *srrAB_02* que incluíam os locais de restrição BamHI e HindIII, respetivamente. (B) O fragmento foi depois clonado em pUC18 e mutado para criação de um local de restrição ClaI a meio do gene *srrA*. (C) Neste local de restrição foi clonada um gene de resistência a canamicina dividindo o fragmento inicial em duas partes iguais e interrompendo a sequência correspondente ao gene *srrA*. Este fragmento de aproximadamente 3500 bp foi posteriormente amplificado a partir do vetor pUC18 onde havia sido construído para clonagem no plasmídeo pMAD no local SmaI. 53

Figura 20: Esquema da primeira estratégia usada para silenciamento do gene *ric*. (A) O plasmídeo pSP64E/*ric* foi construído amplificando um fragmento de DNA interno do gene *ric* com os *primers* *scdA_up* e *scdA_low* e clonando este fragmento de DNA nos locais de restrição EcoRI e SalI do plasmídeo pSP64E. (B) A correta clonagem do plasmídeo pSP64E/*ric* foi confirmada por digestão enzimática com os enzimas EcoRI e SalI cujos locais relativos de restrição se encontram assinalados na figura. Desta digestão resultaram dois fragmentos de DNA (duas bandas visíveis em gel de agarose) com aproximadamente 1700 bp e 3100 bp..... 54

Figura 20: Representação esquemática do processo de mutação do gene *ric* por integração do plasmídeo recombinante pSP64E/*ric*. Após introdução do plasmídeo recombinante em células de *S. aureus* por eletroporação, o plasmídeo integra no DNA genômico através de um evento de recombinação por homologia. Uma vez ocorrendo a recombinação o gene *ric* fica interrompido por um gene de resistência à eritromicina. Os *primers* *scdA_cmut* e *ErmI_comp* (representados por setas a preto) foram usados para analisar por PCR quais dos clones resistentes à eritromicina possuíam o plasmídeo integrado no local pretendido, interrompendo o gene *ric*. 55

Figura 22: Esquema dos procedimentos usados na construção do plasmídeo pMAD/*ric*. (A) Um fragmento de DNA de 1959 bp, incluindo o a totalidade do gene *ric* (675 bp) foi amplificado por PCR com os *primers* *scdA_01* e *scdA_02* que continham sequência correspondentes aos locais de restrição BamHI e HindIII, respetivamente. (B) O fragmento amplificado foi clonado em pUC18 e modificado por mutagénese dirigida para criação de um local de restrição ClaI a meio do gene *ric*. (C) No local de restrição ClaI foi clonada uma cassette de resistência a canamicina, que deste modo divide o gene *ric*. Por sua vez, este fragmento de DNA final foi amplificado por PCR no local de restrição SmaI do plasmídeo pMAD. 57

Figura 23: Esquema das mutações de silenciamento dos genes *fur* e *perR*. (A) Na estirpe de *S. aureus* MJH010 a sequência do gene *fur* foi substituído por um gene de resistência à tetraciclina. A posição relativa dos *primers* OL30(*fur*) e OL31(*fur*) usados na confirmação da mutação por PCR são

representados por setas. (B) A estirpe MJH001 possui o gene *perR* interrompido por um gene de resistência à canamicina. Esta mutação foi confirmada com recurso ao *primers* *perR_OL7* e *kan_comp* que são representados por setas na sua posição relativa..... 59

Figura 24: Fragmentos de DNA amplificados por PCR que confirmam a mutação dos genes *fur* e *perR* nas estirpes de *S. aureus* MJH010 e MJH001, respetivamente. (A) Fragmento de DNA com uma extensão de 1600 bp, amplificado usando os *primers* *OL30(fur)* e *OL31(fur)* a partir do DNA genómico da estirpe de *S. aureus* Δfur e que confirma a presença da mutação do gene *fur* nas células testadas desta estirpe. (B) Fragmento de DNA com uma extensão de 1900 bp, amplificado usando os *primers* *OL7_perR* e *kan_comp* a partir do DNA genómico da estirpe de *S. aureus* $\Delta perR$ e que confirma a presença da mutação do gene *perR* nas células testadas desta estirpe. Marcador de DNA 1 kbp, M. 59

Figura 25: Confirmação da integridade das amostras de RNA total por eletroforese em gel de agarose 1%. RNA total isolado de células de *S. aureus* da estirpe selvagem (*wt*) *S. aureus* Δfur e *S. aureus* $\Delta perR$. As duas bandas bem definidas, correspondentes às subunidades ribossomais 23S e 16S, são indicativas da total integridade das moléculas de RNA 60

Figura 26: O gene *ric* é regulado positivamente pelas fatores de transcrição *Fur* e *PerR*. Em células da estirpe de *S. aureus* Δfur , não foram detetados transcritos do gene *ric*. Já em células que não expressão o regulador *PerR*, células de *S. aureus* $\Delta perR$, os níveis de transcrito do gene *ric* são menores relativamente ao observado na estirpe selvagem (*wt*). A diminuição, em ambos os casos, nos níveis de mRNA detectados são inidicativos de que tanto o regulador *Fur* com o *PerR* regulam positivamente a expressão do gene *ric*. O uso de iguais quantidades de RNA total nos ensaios de RT-PCR foi confirmado pela igualdade da intensidade das bandas relativas ao gene *16S rRNA* (painel inferior). Estes dados são representativos das reações realizadas com duas amostras de RNA independentes. ... 61

Figura 27: Identificação de potenciais locais de ligação dos reguladores *Fur* e *PerR* a montante do gene *ric*. (A) Motivo de ligação do regulador *Fur* e correspondente região putativa de ligação presente na sequência de – 782 a – 755 a montante do gene *ric*. (B) Motivo de ligação do regulador *PerR* e correspondente região de putativa de ligação presente na sequência – 470 a – 445 a montante do gene *ric*. A vermelho são indicadas as bases de nucleótidos, das sequências a montante do gene, coincidentes com a sequência dos motivos de ligação dos reguladores *Fur* e *PerR* de *S. aureus* descritos na base de dados RegPrecise. 61

Figura 1A: (A) Mapa de restrição do plasmídeo **pUC18**: *bla(Ap^R)* – gene de resistência à ampicilina; *rep(pMB1)* – origem de replicação em *E. coli*; *lacZ* – gene que codifica o fragmento N-terminal de uma β -galactosidase; MCS –local de clonagem múltiplas (*polylinker*). (B) Sequência da região MCS e localização dos seus locais de restrição..... 78

Figura 2A: (A) Mapa de restrição do plasmídeo **pSP64** a partir do qual foi construído o plasmídeo **pSP64E**: *Amp^r* – gene de resistência à ampicilina; *ori* – origem de replicação. (B) Sequência da região de clonagem múltiplas (*polylinker*) e respetivos locais de restrição. 79

Índice de Quadros

Quadro 1: Estirpes de <i>S. aureus</i> cujos genomas se encontram totalmente sequenciados e respectivas características desse genoma (adaptado de [8]).....	4
Quadro 2: Função biológica de alguns centros de ferro-enxofre. (Adaptado de [12]).....	8
Quadro 3: Lista das estirpes de <i>E. coli</i> e de <i>S. aureus</i> usadas neste trabalho e respectivas características genéticas.....	23
Quadro 4: Meios de cultura usados, respectivas composições e concentrações	23
Quadro 5: Características dos plasmídeos usados neste trabalho.....	24
Quadro 4: <i>Primes</i> usados neste trabalho e respectivas sequências nucleotídicas e locais de restrição... ..	25
Quadro 5: Lista de enzimas de restrição usadas e respectivos locais de restrição e temperaturas de digestão. Todos os enzimas são da Biolabs.....	25
Quadro A1: Lista complementar de materiais usados ao longo deste trabalho, respectivos solventes em que foram preparados (quando aplicável)	77

Lista de Abreviaturas

<i>amp</i>^R	Gene de resistência a ampicilina
bp	Pares de bases (<i>base pairs</i>)
Cys	Cisteína
D.O	Densidade ótica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>DeoxyriboNucleic Acid</i>
DNIC	Complexo de ferro Dinitrosilado
dNTP	<i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eNOS	Óxido Nítrico Sintase endotelial
ERA	Espécies reativas de azoto
<i>erm</i>^R	Gene de resistência a eritromicina
ERO	Espécies reativas de oxigénio
Fe	Ferro
Fe-S	Ferro-Enxofre
FNR	<i>Fumarate and Nitrate reduction Regulator</i>
Fur	<i>Ferric uptake regulator</i>
g	Gramas
Glu	Glutamato
H₂O₂	Peróxido de hidrogénio
His	Histidina
Hmp	Flavohemoglobina
HO[•]	Radical hidróxilo
iNOS	Óxido Nítrico Sintase indutível
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside
IRE	<i>Iron-responsive elements</i>
IRP	<i>Iron-Responsive element-binding Proteins</i>
ISC	Iron Sulfur Cluster
<i>kan</i>^R	Gene de resistência a canamicina
L	Litros
LA	<i>Luria Agar</i>
LB	<i>Luria Broth</i>
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Mn	Manganês
mRNA	Messenger <i>RiboNucleic Acid</i> (RNA mensageiro)
MRSA	<i>Methicillin-resistant S. aureus</i>
MSSA	<i>Methicillin-susceptible S. aureus</i>
N₂O	Óxido Nitroso
NaCl	Cloreto de Sódio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
ng	Nanograma
ng	Nanogramas
NIF	Nitrogen Fixation
NO	Óxido Nítrico
NO₃⁻	Nitrato
NOS	Óxido Nítrico Sintase
O₂⁻	Anião radical superóxido
O₂	Dioxigénio
°C	Graus Celsius

ONOO⁻	Anião peroxinitrato
OxyR	<i>Oxygen stress regulator</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pH	Potencial de hidrogénio iónico
Ric	<i>Repair of iron centers</i>
RNA	<i>RiboNucleic Acid</i>
rpm	Rotações por minutos
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
S	Enxofre
s	Segundos
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
SOD	Superóxido Dismutase
SrrAB	<i>Staphylococcal respiratory response AB</i>
SUF	Sulfur assimilation
TSA	Agar de soja tríptica (Trypticase Soy Agar)
TSB	Meio de soja tríptica (Tryctic Soy Broth)
TSS	<i>Transformation and Storage Solution</i>
VISA	<i>Vancomycin-intermediate S. aureus</i>
X-gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside
μg	Micrograma

Introdução Teórica

1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é uma bactéria anaeróbia facultativa, Gram-positiva que coloniza preferencialmente o corpo humano e está associada a inúmeras patologias devido à sua elevada virulência. O seu nome *Staphylococcus* deriva do termo Grego “staphyle” que se refere ao seu aspeto esférico (com cerca de 1 µm de diâmetro) e da sua organização em pares ou agrupado de um modo que faz lembrar um cacho de uvas (Figura 1) [1]. Já o nome *aureus* provém do latim e significa ouro, uma vez que, quando crescidas em meio sólido, as suas colónias possuem uma cor dourada [2].

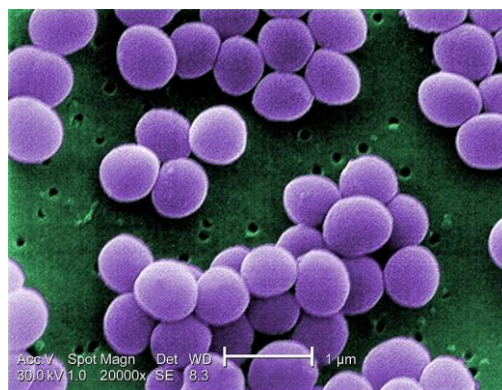


Figura 1: Imagem de microscopia eletrônica de bactérias *Staphylococcus aureus*. O seu aspeto esférico e organização em grupos é muitas vezes associado com um cacho de uvas. Imagem retirada de Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library (PHIL) #11157

S. aureus possui inúmeros mecanismos de rápida adaptação a mudanças ambientais, facto que contribui para a sua elevada resistência e capacidade de colonizar diversificados meios. Estas bactérias são altamente resistentes a condições consideradas hostis, de elevadas temperaturas (consegue resistir a temperaturas até 60°C), salinidade (tolera 7,5-10% de NaCl) e baixa humidade [3].

Esta bactéria pode causar desde infeções locais, facilmente tratáveis, da pele, nariz, uretra, vagina e trato gastrointestinal a doenças potencialmente fatais como Pneumonia, Meningite, Síndrome de Choque Tóxico, Endocardite, Gastroenterite Estafilocócica, Síndrome de Pele Escaldade Estafilocócica, entre outras [4]. A pele e a membrana mucosa são excelentes barreiras contra a invasão por *S. aureus*, contudo se alguma destas sofrer uma lesão, quer por trauma ou cirurgia, este consegue invadir os tecidos próximos desencadeando assim as complicações características desta bactéria. O excessivo uso de antibióticos na luta contra infeções bacterianas levou ao aparecimento de estirpes resistentes. O primeiro antibiótico usado no tratamento de infeções por *S. aureus* foi a penicilina no início dos anos 40. Contudo, apenas 6 anos após a introdução de tratamentos com este antibiótico, 25% das estirpes hospitalares tinham ganho resistência [5]. Em 1961 foi introduzido o antibiótico metilina, um derivado da penicilina, mas no espaço de apenas um ano foi reportado o primeiro caso

de resistência [6]. Apesar de já não se usar antibiótico meticilina em tratamentos, continua-se a usar o termo MRSA (*methicillin-resistant S. aureus strains*) para caracterizar todas as estirpes resistentes a penicilina e derivados. Desde os anos 70 as estirpes MRSA de *S. aureus* tornaram-se a maior causa de infeções desenvolvidas em ambiente hospitalar em todo o mundo. A vancomicina é o único antibiótico alternativo eficiente até agora conhecido, contudo estirpes resistentes têm emergido, tendo o primeiro caso sido reportado em 1997 [7]. O contínuo decréscimo de antibióticos eficazes disponíveis para combater infeções por *S. aureus* leva a que seja cada vez mais importante perceber os mecanismos que promovem a patogenicidade desta bactéria, uma vez que esses mecanismos poderão representar alvos para novas terapias. No Quadro 1 são caracterizadas algumas das estirpes de *S. aureus* cujos genomas já se encontram totalmente sequenciados.

Quadro 1: Estirpes de *S. aureus* cujos genomas se encontram totalmente sequenciados e respetivas características desse genoma (adaptado de [8]).

<i>S. aureus</i>	Número de Acesso	Comprimento (nt)	Proteínas	RNAs	Genes	Características relevantes
NCTC 8325	NC_007795	2821361	2892	77	2969	MSSA
MSSA476	NC_002953	2799802	2571	104	2715	MSSA
COL	NC_002951	2809422	2612	72	2723	MRSA
MRSA476	NC_002952	2902619	2650	101	2839	MRSA
MW2	NC_003923	2820462	2624	80	2704	MRSA
N315	NC_002745	2814816	2583	79	2664	MRSA
Newman	NC_009641	2878897	2614	73	2687	MRSA
JH1	NC_009632	2906507	2747	81	2870	VISA
JH9	NC_009487	2906700	2697	81	2861	VISA
Mu3	NC_009782	2880168	2690	78	2768	VISA
Mu50	NC_002758	2878529	2696	77	2774	VISA
RF122	NC_007622	2742531	2509	76	2663	Patogénio de bovino
ED98	NC_013450	2324404	2661	82	2752	Patogénio de Aves

MSSA: *S. aureus* sensível a meticilina; MRSA: *S. aureus* resistente a meticilina; VISA: *S. aureus* intermediário vancomicina

2. Proteínas de ferro-enxofre

Inúmeras proteínas dependem de cofatores para o desempenho das suas funções. Em geral, estes são compostos de baixa massa molecular que se ligam covalentemente ou não-covalentemente a motivos conservados da cadeia polipeptídica.

Os centros de ferro-enxofre (Fe-S) são cofatores inorgânicos com uma elevada versatilidade, formados por átomos de ferro que se encontram ligados a átomos de enxofre de resíduos de cisteínas. Apesar da coordenação com resíduos de cisteína ser a mais comum, também se encontram centros coordenados com resíduos de aspartato, histidinas ou serinas [9, 10]. Os centros mais simples, as rubredoxinas, são formados por apenas um ferro ligado a quatro átomos de enxofre. Outros centros mais complexos incluem, para além dos átomos de enxofre dos resíduos de cisteína a que estão ligados, átomos de enxofre inorgânicos. São exemplo disso os centros tipo rômboico [2Fe-2S], cuboidal [3Fe-4S] ou cubano [4Fe-4S] (Figura 2). Os centros das proteínas de ferro-enxofre “Rieske” são do tipo 2Fe-2S, contudo, ao contrário do tipo rômboico, este possui um dos ferros ligado a duas histidinas, podendo deste modo ser descrito como [2Cys-Fe-2S-Fe-2His] [11, 12].

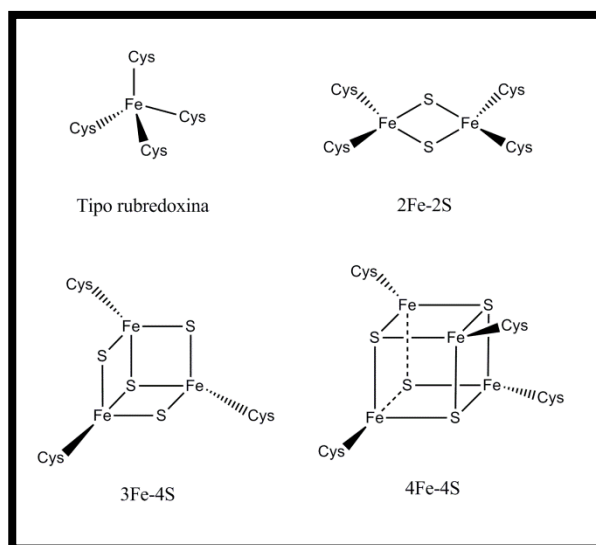


Figura 2: Estruturas de quatro tipos de centro de ferro-enxofre. Fe – átomos de ferro; S – átomos de enxofre; Cys – ligandos de cisteína.

Estas estruturas participam em diversos processos bioquímicos essenciais para a função e sobrevivência celular. Uma das funções mais comuns das proteínas que contêm centros de ferro-enxofre, a transferência de elétrões, baseia-se na fácil conversão entre os estados oxidativos +2 e +3 do ferro, sendo que num envolvimento proteico adequado os centros Fe-S adotam potenciais redox entre -500mV e +150mV [10, 13]. Deste modo, estes complexos funcionam como excelentes aceitadores e dadores de elétrões em processos como a respiração celular ou fotossíntese.

Outras funções, diferentes da de natureza oxidoreductiva, têm sido atribuídas aos centros Fe-S. Por exemplo, no enzima aconitase (também conhecido por aconitato hidratase), o centro de [4Fe-4S] desempenha um papel crucial na sua atividade enzimática, participando tanto na ligação do substrato ao centro ativo como na sua metabolização. Neste caso, três dos ferros do centro estão ligados a resíduos de cisteína, enquanto o quarto ferro está exposto ao solvente. Este quarto ferro é essencial nas reações de desidratação/hidratação que convertem o substrato citrato a isocitrato via cis-aconitato [14] (Figura 3).

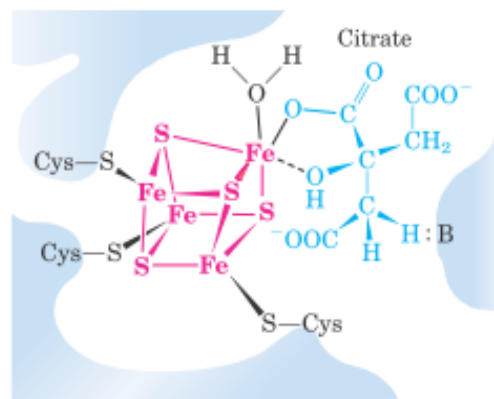


Figura 3: Centro de ferro-enxofre do enzima aconitase. Três dos quatro ferros do centro de ferro-enxofre estão ligados a três resíduos de cisteína do enzima. O quarto ferro liga-se ao substrato citrato. Deste modo, o centro de ferro-enxofre contribui para o posicionamento do substrato no centro ativo do enzima assim como para a sua catálise (Adaptado de [14]).

Um outro papel importante que tem sido atribuído a centros de ferro-enxofre diz respeito à regulação da expressão génica. Os centros de ferro-enxofre podem ser eficientes sensores de mudanças nas condições ambientais que os rodeiam, levando ao desencadear de respostas adequadas. Como exemplo temos os fatores de transcrição bacterianos FNR, SoxR. A proteína SoxR é capaz de detetar stress oxidativo via oxidação do seu centro $[2Fe-2S]^{2+}$. Deste modo, dá-se a estimulação da expressão da proteína SoxS que por sua vez é responsável por ativar a expressão de inúmeras enzimas de resposta ao stress [12, 15]. A FNR (*fumarate and nitrate reduction regulator*) é uma proteína reguladora, sensível ao oxigénio, responsável pela expressão de genes envolvidos na transição entre as vias de respiração aeróbia e anaeróbia da *Escherichia coli*. Em condições anaeróbias, o regulador FNR liga-se ao DNA como um dímero, expressando genes responsáveis pela adaptação a condições de oxigénio limitado. Contudo, esta forma dimérica só se forma entre dois monómeros cujos centros estejam na forma $[4Fe-4S]^{2+}$. Quando os níveis de oxigénio aumentam, o centro $[4Fe-4S]^{2+}$ destes é oxidado e converte-se num centro $[2Fe-2S]^{2+}$, levando uma alteração conformacional dos monómeros de FNR que deste modo não consegue formar o dímero ativo (Figura 4) [16, 17].

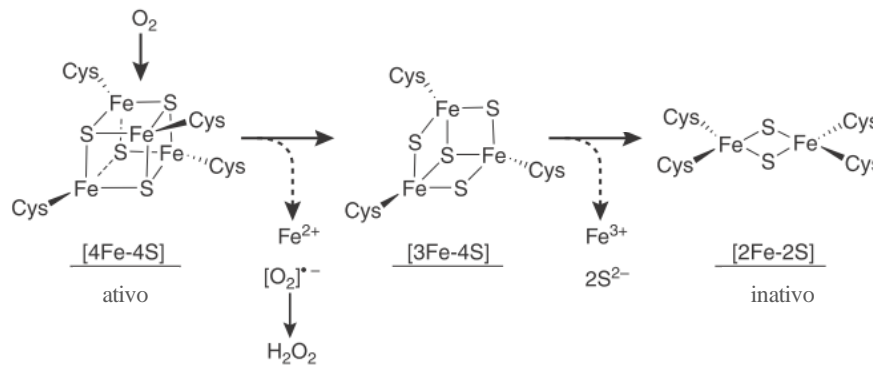


Figura 4: Mecanismo proposto para a oxidação e consequente conversão do centro de ferro-enxofre do regulador FNR. Quando o centro [4Fe-4S] dos monômeros de FNR são expostos a oxigênio, estes são rapidamente oxidados e convertidos na forma [2Fe-2S]. Acredita-se que esta conversão ocorra por intermédio de um centro [3Fe-4S] instável, que ao perder um átomo de Fe^{3+} e dois átomos de S^{2-} é convertido na forma de [2Fe-2S]. (Adaptado de [16])

Também podem ser encontrados exemplos de proteínas de ferro-enxofre que desempenham um papel de regulação ao nível pós-transcricional. Este é o caso da proteína reguladora de ferro de mamíferos, IRP1. Em condições de abundância de ferro, a proteína IRP1 possui um centro $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ e funciona como aconitase [18]. Em condições de privação de ferro a proteína perde um ferro e a sua atividade enzimática é altamente reduzida. Esta forma tem a capacidade de se ligar a estruturas *stem-loop*, denominadas *iron-responsive elements* (IREs), em certos RNAs mensageiros de proteínas envolvidas na captação de ferro, armazenamento e distribuição na célula. A ligação da forma apo de IRP1, a IREs localizados na extremidade 5', leva a um bloqueio da tradução ao não permitir a leitura do codão de iniciação AUG pelo ribossoma. Por outro lado, se a ligação ocorre a IREs da extremidade 3', o mRNA fica protegido de degradação, levando a um aumento nos níveis de tradução [19, 20].

O papel exato dos centros de ferro-enxofre de diversas proteínas está ainda por determinar, sendo que, em muitos casos, seja possível que estes tenham apenas um papel estrutural de estabilização proteica [21]. A grande versatilidade destes centros permite o diversificado número de funções que diferentes proteínas de ferro-enxofre podem possuir na célula. Os exemplos acima mencionados constituem apenas uma pequena amostra dos inúmeros processos bioquímicos em que estas estruturas desempenham um papel crucial na sobrevivência celular tanto de organismos procarionotas como eucariotas. No Quadro 2 encontra-se sumariado as diversas funções biológicas dos centros ferro-enxofre, assim como exemplos de proteínas associadas com cada função.

Quadro 2: Função biológica de alguns centros de ferro-enzofre. (Adaptado de [12])

Função	Exemplos	Tipo de Centro Fe-S
Transferência de elétrões	Ferredoxinas; enzimas redox	[2Fe-2S]; [3Fe-4S]; [4Fe-4S]
Transferência de prótões	Proteins Rieske Nitrogenase	[2Fe-2S] [8Fe-7S]
Ligação de substratos e ativação	(de)Hidratases Sintase Acetil-CoA	[4Fe-4S] Ni-Ni-[4Fe-4S], [Ni-4Fe-5S]
Armazenamento de ferro	Ferredoxinas	[4Fe-4S]
Estrutural	Endonuclease III MutY	[4Fe-4S] [4Fe-4S]
Regulação da expressão génica	SoxR FNR IRP IscR	[2Fe-2S] [4Fe-4S]/ [2Fe-2S] [4Fe-4S] [2Fe-2S]
Regulação da atividade enzimática	Ferroquelatase	[2Fe-2S]

2.1 Mecanismos de formação dos centros ferro-enzofre

Em estudos iniciais sobre os processos de formação dos centros de ferro-enzofre foram desenhados protocolos *in vitro* em que era possível observar a reformação espontânea destes centros em proteínas cujos centros haviam sido removidos por quelação [22]. Contudo, as concentrações elevadas de átomos livre de $Fe^{2+/3+}$ e S^{2-} usadas nestes protocolos fizeram descartar a hipótese de que o processo de formação dos centros Fe-S ocorresse de forma espontânea *in vivo*, uma vez que tais níveis de ferro e enzofre na sua forma livre são tóxicos para a célula.

Diversos estudos posteriores culminaram na descoberta dos três principais sistemas de biogénese dos centros de Fe-S em bactérias. Sendo estes, o **sistema ISC** (iron sulfur clustres), o **sistema SUF** (sulfur formation) e o **sistema NIF** (nitrogen fixation). O sistema NIF, o primeiro a ser identificado, possui um papel específico na maturação de nitrogenases em bactérias azotoficas [23]. Já o sistema ISC é considerado o sistema constitutivo na montagem de centros de Fe-S, estando altamente conservado na maioria das bactérias [24], por outro lado o sistema SUF assume um papel de maior importância na formação de centros em ambientes de *stress* oxidativo ou de privação de ferro [25]. É de salientar que o sistema SUF poderá desempenhar um papel crucial na manutenção da patogenicidade de bactérias como *Staphylococcus aureus*, uma vez que contribui para a capacidade de resistência a ambientes extremos de *stress* oxidativo característicos das fases iniciais de infeção.

A distribuição filogenética destes sistemas é complexa. Enquanto organismos com *Mycobacterium tuberculosis* aparentam possuir apenas o sistema SUF para a formação de centros de Fe-S, outros possuem mais do que um destes sistemas [26]. Mesmo nestes casos, a importância relativa de utilização deste sistema não é igual. Por exemplo, em cianobactérias existe uma utilização preferencial do sistema SUF para a formação dos centros em relação ao sistema ISC, enquanto que em *Escherichia coli* esta preferência encontra-se invertida [27, 28]. Cada sistema possui diferentes atributos bioquímicos que, para determinadas condições e para diferentes organismos, fazem da sua utilização uma escolha mais vantajosa, daí que a distribuição pelos vários organismos vivos seja tão diversificada.

Apesar destes três sistemas de montagem de centros de Fe-S possuírem diferenças entre si, todos aparentam seguir os mesmos princípios gerais de biossíntese. O processo de formação dos centros pode ser dividido em dois passos gerais: a formação *de novo* de um centro de Fe-S numa proteína *scaffold* e a transferência desse centro da proteína *scaffold* para a apoproteína alvo e subsequente integração na sua cadeia polipeptídica. Cada um destes passos envolve diversas proteínas e cofatores que desempenham reações parciais de biossíntese específicas. Contudo cada sistema possui o seu próprio conjunto de proteínas e cofatores que são codificadas por diferentes operões (Figura 5).

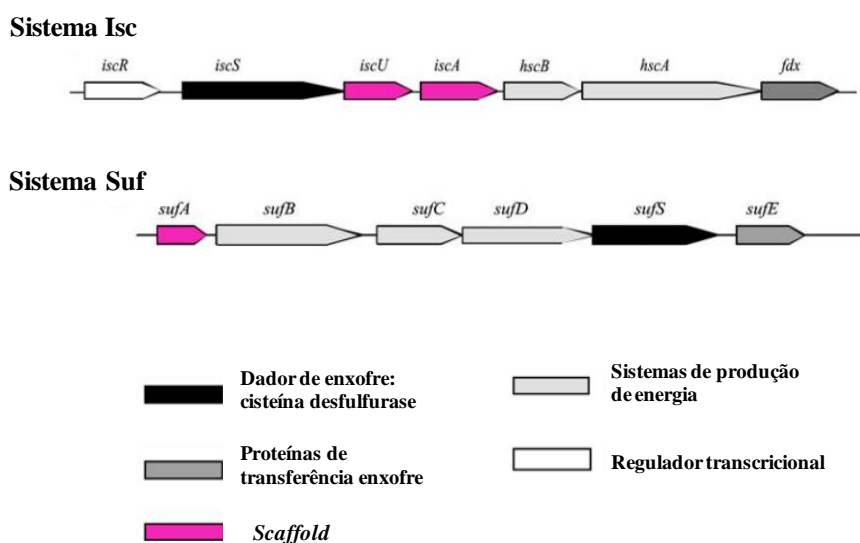


Figura 5: Operões que codificam os diferentes componentes dos sistemas de montagem de centros de ferro-enxofre Isc e Suf de *E. coli*.

De um modo geral, os processos envolvidos na formação dos centros de Fe-S incluem (Figura 6):

(1) **A doação de enxofre.** As cisteínas desulfurase (NifS, IscS ou SufS) servem como dadoras de enxofre, através da conversão do substrato L-cisteína em L-alanina [29]. Esta conversão origina um

intermediário persulfito num dos resíduos de cisteína conservados do centro ativo deste enzima, sendo que posteriormente, o átomo de enxofre é transferido para proteínas auxiliares (SufE) ou diretamente para a proteína *scaffold* [30, 31].

(2) **Doação de ferro.** Numa célula as concentrações de ferro livre em solução são extremamente baixas devido à sua elevada toxicidade. Deste modo, a doação de ferro, para a formação dos centros de Fe-S deverá ser facilitada por proteínas auxiliares. Contudo, pouco ainda se sabe sobre quais as proteínas que desempenham este papel. Em bactérias, pensa-se que a proteína CyaY, do sistema ISC, poderá estar envolvida, contudo a sua função ainda não foi totalmente comprovada [32].

(3) **Doação de electrões.** Durante a formação dos centros, são necessários electrões para a redução de S^0 (presente nas cisteínas) a S^{2-} (presente nos centros de Fe-S). Estes poderão ser doados pelas ferredoxinas específicas de cada sistema, sendo que os centros [2Fe-2S] presentes nos seus centros ativos funcionarão como fonte desses electrões [33].

(4) **As proteínas *scaffold*** servem como plataformas para a formação *de novo* dos centros de Fe-S. Estas proteínas possuem resíduos de cisteína conservados onde se ligam, de forma lábil, os centros em construção. Após formados, podem então ser transferidos e estavelmente integrados nas proteínas alvo. Proteínas bacterianas com esta função incluem a IscU, IscA, SufU e SufA [34, 35].

(5) **A transferência do** centro de Fe-S formado nas proteínas *scaffold* para a proteína alvo, que desta forma passa a holoproteína, é também um processo auxiliado por proteínas de transferência ou chaperones. Estas desempenham três papéis essenciais: induzir a dissociação dos centros ligados às proteínas *scaffold*; garantir a sua específica e correta transferência para a apoproteína alvo; e promover a correta ligação do centro à proteína alvo. Temos como exemplo, os chaperones bacterianos HscA e HscB do sistema ISC [36].

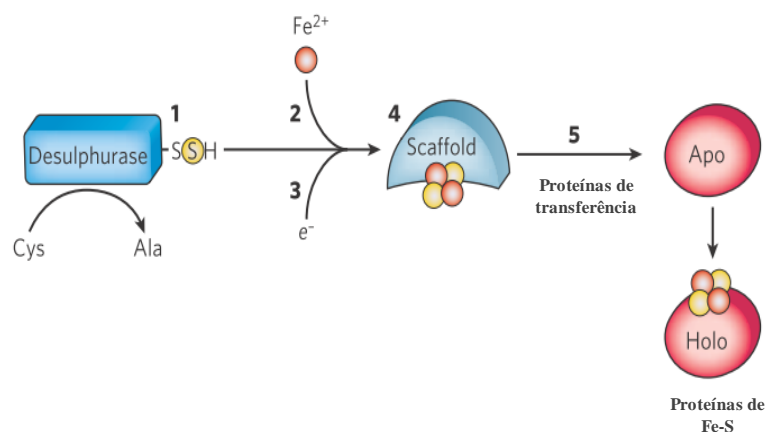


Figura 6: Princípios comuns na síntese de centros de ferro-enxofre. O centro composto por átomos de ferro e enxofre é montado numa proteína *scaffold* sendo posteriormente transferidos para a apoproteína alvo (Adaptado de [10]).

3. Stress oxidativo e nitrosativo e o combate contra bactérias patogénicas

O **stress oxidativo** e **nitrosativo** são considerados o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigénio (ERO) e azoto (ERA) e a capacidade de destoxificação destas mesmas espécies por parte da célula, que leva a um dramático aumento das concentrações intracelulares destas espécies altamente reativas e oxidantes.

As **espécies reativas de oxigénio (ERO)** são moléculas altamente reativas que podem ser formadas por inúmeras enzimas. A formação destas moléculas oxidantes ocorre por redução da molécula de dióxigénio (O_2) originando anião radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogénio (H_2O_2) ou radical hidroxilo (HO^\bullet), dependendo do grau de redução [37] (Figura 7).

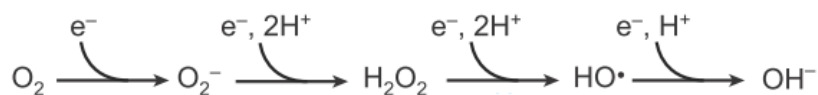
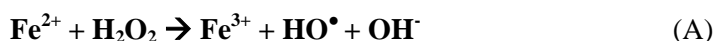


Figura 7: Formação de espécies reativas de oxigénio por redução sequencial da molécula de oxigénio. O_2 – molécula de oxigénio; O_2^- - anião radical superóxido; H_2O_2 – peróxido de hidrogénio; HO^\bullet – radical hidroxilo; OH^- - anião hidroxilo; e^- - eletrões (Adaptado de [38])

Estas espécies reativas podem ainda ser convertidas entre si, por exemplo, por ação de enzimas dismutase que catalisam a conversão de superóxido em peróxido, ou em reações de *Fenton* (A) onde ocorre a conversão de peróxido em radicais hidroxilo num processo catalisado por Fe^{2+} [39].



A formação destas espécies pode ocorrer como subproduto de reações do metabolismo celular aeróbio ou serem produzidas intencionalmente após estimulação de células imunitárias, como macrófagos ou neutrófilos, durante respostas imunitárias a microrganismos invasores [40]. Neste último caso, a produção de ERO que ocorre durante a fagocitose é mediada pelo complexo nicotinamida adenina dinucleotido fosfato (NADPH) oxidase num processo designado *respiratory burst* [41]. Uma deficiente ação deste enzima que comprometa a produção adequada de ERO pelas células fagocitárias, resulta numa diminuída ação bactericida e consequente aumento de infeções bacterianas [42].

A acumulação destas moléculas altamente reativas no interior da célula bacteriana pode provocar graves danos ao nível do DNA [43], levar à oxidação de ácidos gordos polinsaturados de lípidos, oxidação de resíduos de aminoácidos, ou oxidação de cofatores de certas enzimas, que em muitos

casos leva à perda da sua atividade [44, 45]. Os centros de ferro-enxofre são particularmente sensíveis às espécies reativas de oxigênio, sendo que o grau de dano oxidativo do centro é fortemente influenciado pelo envolvimento polipeptídico em que este está inserido. Em geral os centros mais sensíveis são os que se encontram expostos ao solvente, como é o caso dos centros $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$ de enzimas de família das desidratases (por exemplo, a aconitase A e fumarase B). A ação oxidativa tanto de O_2^- como de H_2O_2 origina um centro $[4\text{Fe-4S}]^{3+}$, que nesta forma é instável e acaba por perder o seu ferro catalítico, ficando assim inativado na forma $[3\text{Fe-4S}]^{3+}$ [46].

Por outro lado a formação de **espécies reativas de azoto (ERA)** é uma consequência da reatividade da molécula de óxido nítrico (NO). Em células de mamíferos, a sua formação ocorre por oxidação do aminoácido L-arginina em NO e citrulina, numa reação catalisada por óxido nítrico sintases (NOS) [47]. Existem três tipos de NO sintases, denominadas endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e indutível (iNOS). Os enzimas eNOS e nNOS são expressas constitutivamente em diversos tecidos e produzem baixos níveis de NO [48]. O enzima iNOS está associado ao sistema imunitário, estando presente em macrófagos e neutrófilos catalisando a produção de NO em elevadas concentrações em resposta à estimulação por citocinas ou LPS (endotoxina lipopolissacarido) [49].

A importância desta molécula ao nível do sistema imunitário prende-se com a sua citotoxicidade quando em elevadas concentrações. Esta molécula possui, por exemplo, a capacidade de inativar vias metabólicas importantes para a sobrevivência do organismo patogénico invasor. Tal é conseguido através da reação da molécula NO com os centros $[4\text{Fe-4S}]$ de enzimas como o aconitase A e fumarase B, do ciclo dos ácidos tricarbóxicos [50]. Assim como acontece para reações com ERO, a particular sensibilidade destes enzimas a NO deve-se ao nível de exposição do centro ao solvente [9, 20]. A reação do óxido nítrico com o centro ferro-enxofre promove a formação de um complexo estável de ferro dinitrosilado (DNIC) que leva à perda da atividade dos enzimas [51, 52] (Figura 8).

Adicionalmente, a molécula de NO pode também reagir com a espécie reativa de oxigênio O_2^- , formando o anião peroxinitrato (ONOO^-) [53]. Esta espécie reativa de azoto altamente oxidante, cuja reatividade é superior à dos seus precursores, possui igualmente uma importante atividade bactericida [54]. Ao nível das proteínas, o peroxinitrito pode reagir tanto com grupos prostéticos, em particular com centros de metais de transição, de que são exemplo os centros ferro-enxofre, como pode reagir com resíduos de aminoácidos como cisteínas e metioninas [55]. A ação oxidante do óxido nítrico e peroxinitrito vai para além da danificação de proteínas, sendo também importantes alvos do *stress* nitrosativo as moléculas de DNA e os lípidos [56, 57].

Ao nível do sistema imunitário ERO e ERA atuam sinergeticamente, criando um ambiente altamente oxidativo no interior de células fagocitárias que leva à morte dos microrganismos invasores.

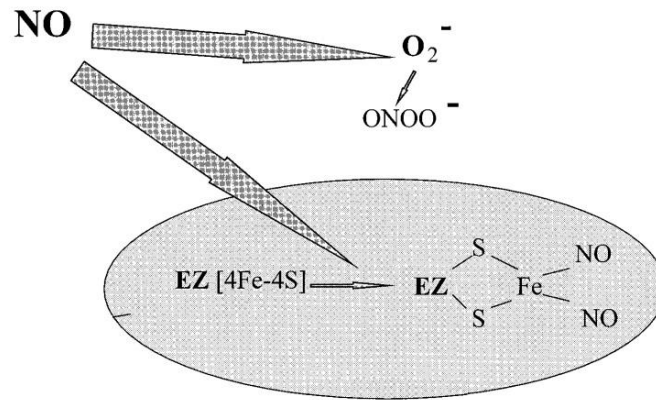


Figura 8: Reatividade da molécula de NO. A reação de uma molécula de óxido nítrico (NO) com um centro de ferro-enxofre leva à formação de um complexo de ferro dinitrosilado (DNIC) que provoca a inativação do enzima. NO pode ainda reagir com superóxido (O_2^-) formando peroxinitrito (Adaptado de [58]).

4. Defesas bacterianas contra *stress* oxidativo e nitrosativo

De modo a sobreviverem as bactérias patogénicas têm de responder tanto a ERO gerado pelo metabolismo, como a ERO e ERA exógeno gerado pelos mecanismos de defesa imune do hospedeiro. Parte da estratégia de sobrevivência desenvolvida passa pela indução de um conjunto de proteínas que permita, por um lado, a destoxificação das espécies reativas, e por outro lado, a reparação dos danos causados pelas mesmas.

4.1 Proteínas de destoxificação

Algumas moléculas estão constitutivamente presentes no meio intracelular e ajudam, de um modo não enzimático, a manter condições redutivas ou a eliminar espécies reativas de oxigénio. Entre estas moléculas estão os antioxidantes NADPH, NADH, β -carotene, ácido ascórbico e glutathione (GSH) [44]. Contudo, o papel mais importante no combate ao aumento dos níveis de espécies reativas de oxigénio é atribuído a enzimas de destoxificação capazes de eliminar superóxido e H_2O_2 , como os superóxido dismutases (SOD) (B) os catalases (C) ou os peroxidases (D) [59, 60].



Staphylococcus aureus recorre à expressão de diversas destas proteínas de destoxificação, das quais se destacam os enzimas catalase (*kataA*), superóxido dismutase (*sodA*, *sodM*), tioredoxina redutase (*trxB*), tioredoxina (*trxA*), alquil hidroperoxide redutase (*ahpC*, *ahpF*) e glutathione peroxidase (*gpxA*) [61]. Em *S. aureus* internalizados por neutrófilos os níveis de mRNA de cada um destes enzimas apresentam-se aumentados, sendo que a máximo de expressão dos genes coincide com o pico de produção de ERO no interior do fagossoma [62].

Os mecanismos de destoxificação de NO fazem também parte das estratégias de sobrevivência usadas pelos microorganismos patogénicos. Ao nível bacteriano diversas proteínas contribuem para o controlo dos níveis de exposição a NO ou S-nitrosotióis. São exemplo disso as proteínas da família das flavohemoglobina, como as *flavodiiron NO reductases*, as flavorubredoxinas ou os citocromo c nitrito redutases [63, 64]. Dos enzimas codificados por *S. aureus* capazes de metabolizar NO podemos destacar as flavohemoglobinas (Hmp). Este enzima é conhecido oxidar NO a nitrato (NO_3^-) na presença de oxigénio ou anaerobicamente reduzir NO a N_2O [65].

4.2 As proteínas Ric e a reparação de centros Fe-S

Como já foi referido anteriormente, em condições de *stress* oxidativo ou nitrosativo proteínas que possuam centros de ferro-enzofre são particularmente afetadas. Sob estas condições os centros podem sofrer estragos que afetam o funcionamento dos enzimas. A capacidade das bactérias conseguirem ou não reparar os danos causados pelo *stress* pode determinar a capacidade de resistência das bactérias em ambientes hostis, como é, por exemplo, o interior do fagossoma de células como macrófagos ou neutrófilos.

Pouco ainda se conhece sobre os mecanismos que facilitam a reparação dos centros ferro-enzofre. Contudo, estudos recentes em *E. coli*, têm atribuído à proteína YtfE um papel essencial nesses processos de reparação [66]. Esta proteína de di-férrica, demonstrou ser essencial na recuperação da atividade dos enzimas aconitase B e fumarase A, enzimas chave do ciclo dos ácidos tricarbóxicos, com centros catalíticos $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ danificados pelas espécies H_2O_2 ou NO. A reativação dos centros afetados, quer por estrago oxidativo, quer por nitrosilação, partilham um ponto comum: a reinserção de átomo(s) de ferro. Pensa-se que a proteína YtfE estará envolvida nos processos enzimático de recrutamento e integração desse(s) átomo(s) de ferro [66].

Em *S. aureus* a proteína ScdA foi identificada como tendo um papel bioquímico muito semelhante à YtfE de *E. coli*. Estas duas proteínas partilham 25% de identidade e 46% de similaridade entre si, e os fenótipos característicos da deleção dos genes que as codificam são em muito idênticos. Em ambos os casos, a atividade dos enzimas de ferro-enzofre analisados é menor nos mutantes do que nas respetivas estirpes selvagens, após uma exposição a H_2O_2 ou NO, devido à deficiente capacidade de reparação dos centros [67]. As estirpes mutadas também se tornam mais sensíveis ao *stress* por H_2O_2 , o que vem reforçar a ideia de que estas proteínas funcionalmente homólogas constituem um eficiente sistema de proteção contra peróxido de hidrogénio [67, 68]. Adicionalmente, estudos de *microarrays* demonstraram uma indução do gene *scdA* tanto com estímulos por H_2O_2 como por NO [69, 70].

Estudos filogenéticos revelaram que as proteínas YtfE e ScdA pertencem a uma família de proteínas largamente distribuída que estarão envolvidas na reparação de centros de ferro-enzofre. A esta família atribuiu-se o nome RIC – *Repair of Iron Centres* – e pode ser encontrada em pelo menos cinco filos de bactérias, no parasita eucariota *Trichomonas vaginalis* e também em alguns organismos do reino Fungi. Apesar de o grau de similaridade e identidade poder ser por vezes baixo entre proteínas, todas possuem um alto grau de conservação dos resíduos que se propõe constituírem o local de ligação do centro ativo de dois ferros, nomeadamente, os resíduos His84, His105, His129, Glu133, His160 e His204 (numeração referente aos resíduos da YtfE de *E. coli*) [67].

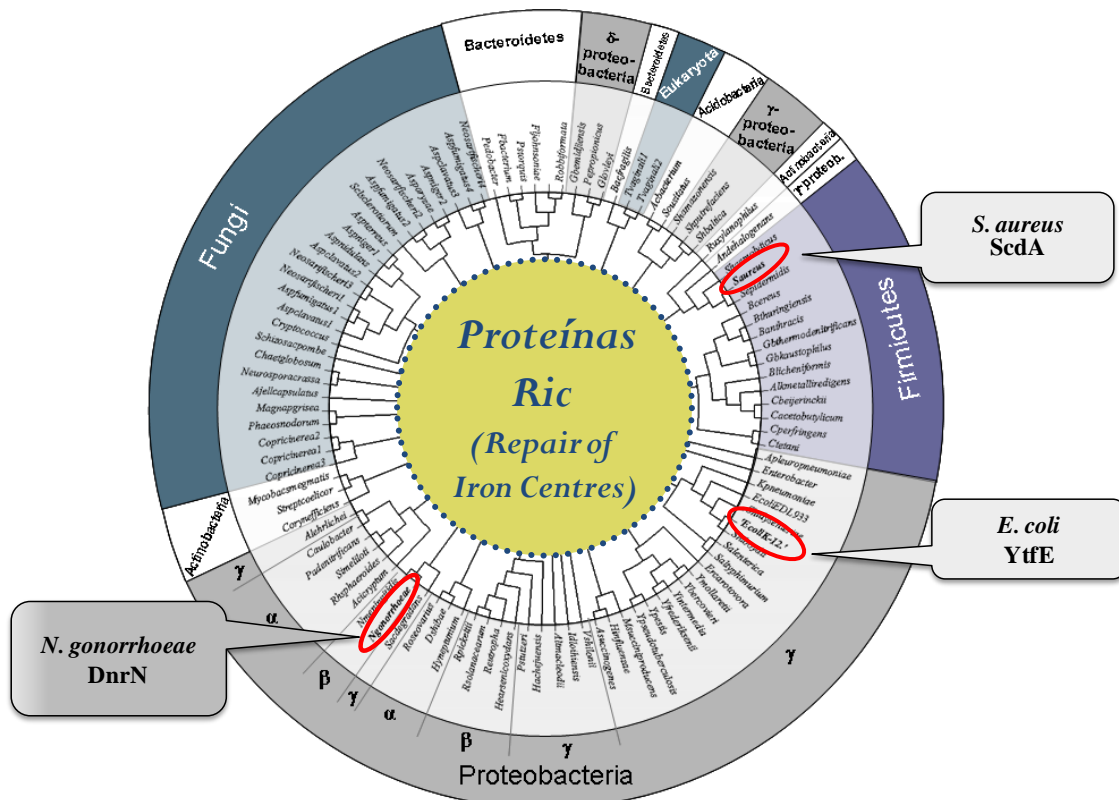


Figura 9: Distribuição das proteínas Ric. Dendrograma construída com 102 sequências de proteínas Ric. Os organismos para os quais existem estudos sobre o papel da proteína Ric encontram-se indicados (Adaptado de [67]).

5. Regulação das defesas

As respostas aos ataques por ERO e ERA envolvem mudanças no padrão proteínas expressas pelas bactérias sob ataque. Estas respostas são controladas por reguladores genéticos que possuem a capacidade de detetar os fatores de ameaça. Os reguladores **Fur**, **PerR** e **SrrAB** fazem parte do conjunto de sensores usados por *S. aureus* na mediação dos mecanismos de defesa contra espécies reativas de oxigénio e nitrogénio.

5.1 Fur

A proteína **Fur** (*ferric-uptake repressor*) é um regulador transcricional global da homeostase de ferro. Esta metaloproteína liga Fe(II) em condições de abundância de ferro e nesta forma atua como repressor de genes que codificam proteínas envolvidas na aquisição de ferro. A regulação dos níveis intracelulares de ferro nas bactérias é de elevada importância isto porque, se por um lado este é um dos mais importantes micronutrientes, por outro lado, quando em excesso, este torna-se tóxico devido à sua habilidade de catalisar reações de *Fenton* que geram espécies reativas de oxigénio. Por este motivo, este regulador está muitas vezes associado com a mediação de respostas ao *stress* oxidativo [71, 72]. Os estudos conduzidos por Hoursburg *et al.* vieram reforçar esta ideia. Nestes viu-se que os mutantes de *S. aureus* com o gene *fur* deletado apresentam menor resistência a H₂O₂ em comparação com a estirpe selvagem [73].

5.2 PerR

O regulador **PerR** é um sensor de peróxido de hidrogénio que pertence à família de proteínas Fur. Em *Bacillus subtilis* o dímero PerR contém dois locais de ligação a iões metálicos por monómero: um local de ligação estrutural a Zn²⁺ e um local de ligação regulatório onde existe uma competição pela ligação entre Fe²⁺ e Mn²⁺ [74]. Dependendo do ião que se encontra ligado ao local regulatório este regulador possui maior ou menor sensibilidade a H₂O₂. Na forma ligada a Fe²⁺ (PerR:Fe) os genes regulados por PerR são rapidamente induzidos após exposição a baixas concentrações (<10 µM) de H₂O₂. Já na forma ligada a Mn²⁺ (PerR:Mn) o regulador torna-se relativamente insensível a H₂O₂ [74]. A deteção de H₂O₂ é conseguida através da oxidação mediada por metal dos resíduos de histidina a que o ferro se encontra coordenado [75]. Esta oxidação leva a uma abertura da conformação da PerR e consequente perda da capacidade de ligação ao DNA. Nesta forma, PerR deixa de exercer a sua função de repressor, permitindo assim a expressão de genes que contribuem para a resistência ao *stress* induzido por peróxido. Em *S. aureus* parte desta resposta mediada pela PerR inclui a derepressão de genes que codificam a catalase (KatA), alquil-hidroperoxidase redutase (AhpCF), ferritina (Ftn) ou tioredoxina redutase (TrxB) [76].

Interessantemente, o regulador PerR exerce uma repressão transcricional tanto no seu próprio gene como no gene que codifica o regulador Fur. Ambos os genes são repressos por PerR:Mn mas não pela forma ligada a ferro, PerR:Fe [77]. No mesmo estudo que retirou estas conclusões, também se observou que nenhum dos genes *perR* ou *fur* são significativamente induzidos por H₂O₂. Deste modo foi proposto que as várias formas metalizadas de PerR diferem tanto na seletividade entre os diversos componentes do seu regulão como na sua reatividade a H₂O₂ [77].

5.3 SrrAB

O sistema de dois componentes ResDE da bactéria parente de *S. aureus*, *B. subtilis*, foi implicado na regulação global do metabolismo respiratório aeróbio e anaeróbio. A expressão de genes dependente de ResDE é induzida por níveis limitantes de oxigénio. Nestas condições é, por exemplo, induzido o gene que codifica o regulador anaeróbio Fnr, os genes de nitrato reductase, *nasDEF*, e o gene *hmp*, da flavohemoglobina [78, 79]. Adicionalmente ao crescimento anaeróbio, o regulador ResDE aparenta possuir um papel na resposta ao *stress* nitrosativo uma vez que genes do seu regulão são induzidos por NO [80].

Em *S. aureus*, o homólogo de ResDE é conhecido por *staphylococcal respiratory response (SrrAB) system* [81]. À semelhança do que acontece em *B. subtilis*, este regulador é composto por dois componentes. Uma análise ao locus *srrAB* revelou que este regulador é codificado por duas sequência de nucleótidos que se sobrepõem em 20 bp [81], a sequência *srrA*, que codifica o regulador de 241 aminoácidos (28 kDa), e a sequência *srrB*, que codifica uma histidina cinase de 583 aminoácidos (66 kDa) [82]. Estudos adicionais da sequência de aminoácidos e localização celular destes dois componentes permitiram desenhar um modelo de funcionamento deste regulador (Figura 10). A proteína SrrB localiza-se na membrana, sendo que o seu domínio transmembranar ou extracelular consegue detetar sinais do meio exterior. A deteção deste sinal provoca a sua autofosforilação num resíduo de histidina conservado. A associação com o SrrA, localizado no citoplasma, permite a transferência do grupo fosfato para um resíduo de aspartato conservado. Esta fosforilação do SrrA desencadeia uma alteração conformacional que permite a sua ligação ao DNA levando assim à transcrição dos genes que regula [82]. Apesar deste regulador parecer responder aos níveis de oxigénio, não será o oxigénio por si que funciona como sinal, mas sim outros fatores que reflitam esses níveis ou o estado redox do meio.

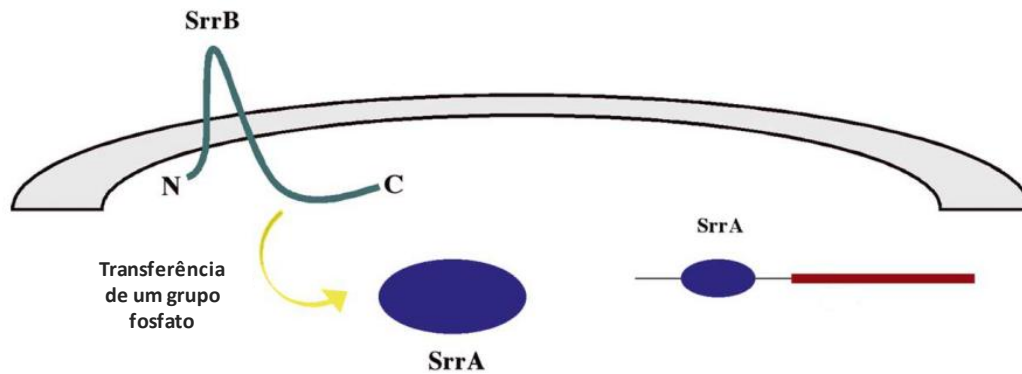


Figura 10: Modelo da regulação por SrrAB. SrrB, que se encontra na membrana celular, é autofosforilado em resposta a um estímulo exterior. Após uma transferência do grupo fosfato do componente SrrB para o componente citoplasmático SrrA, este último adquire a capacidade de se ligar às regiões promotoras dos genes que regula.

Tal como sugerido para o regulador duplo ResDE de *B.subtilis*, ao dois componentes SrrA-SrrB também compõem um mecanismo de regulação da respiração aeróbia e respiração anaeróbia. Em paralelo, foi visto que este regulador de *S. aureus* é responsável pelo controlo da expressão de diversos fatores de virulência de um modo dependente dos níveis de oxigénio [81, 83]. O papel do SrrAB vai mais além, tendo adicionalmente sido implicado na regulação de componentes de resposta ao *stress* nitrosativo. A inativação do gene *srrAB* resulta numa estirpe com uma aumentada susceptibilidade a NO. Parte dessa susceptibilidade passa pela incapacidade dos mutantes de expressarem no seu máximo o gene *hmp* que codifica uma crítica proteína de destoxificação de NO em *S. aureus*, a flavohemoglobina [70]. Contudo, é de notar que a contribuição do regulador SrrAB para a resistência a NO não se prenderá apenas pela regulação da Hmp e destoxificação de NO.

Materiais e Métodos

1. Estirpes bacterianas e condições de crescimento

Todas as estirpes bacterianas e meios de cultura usados, encontram-se listados nos Quadros 3 e 4. Por norma, todas as estirpes bacterianas usadas foram cultivadas a 37°C. Adicionalmente, os inóculos líquidos foram incubados com agitação de 150 rpm. Quando incluídos, os antibióticos foram adicionados aos meios de cultura nas seguintes concentrações: ampicilina (100 µg/mL), tetraciclina (5 µg/mL), eritromicina (10 µg/mL), canamicina (50 µg/mL). Quando necessário os meios foram adicionalmente suplementados com 1mM de IPTG e 50 µg/mL de X-gal.

Quadro 3: Lista das estirpes de *E. coli* e de *S. aureus* usadas neste trabalho e respetivas características genéticas

Estirpes	Características relevantes	Origem ou referência
<i>E. coli</i>		
DH5α	F ⁻ φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ⁻</i>	Invitrogen
XL1 Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIq</i> ΔM15 Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene
<i>S. aureus</i>		
RN4220	Estirpe derivada da NCTC8325-4 que permite a transformação com DNA exógeno	R. Novick
NCTC8325-4	MSSA	
MJH001	NCTC8324-5 Δ <i>perR</i> , Kan ^R	[76]
MJH010	NCTC8324-5 Δ <i>fur</i> , Tet ^R	[73]

Quadro 4: Meios de cultura usados, respetivas composições e concentrações

Meio	Composição	Concentração final	Utilidade
LB	Meio Luria-Bertain (Difco)	25g/L	Meio líquido para cultura de estirpes de <i>E. coli</i>
LA	Meio Luria-Bertain (Difco) Agar-Agar (Merck)	25g/L 15g/L	Meio sólido para cultura de estirpes de <i>E. coli</i>
TSB	Meio de soja tríptica (Difco)	30g/L	Meio líquido para cultura de estirpes de <i>S. aureus</i>
TSA	Meio de agar de soja tríptica (Difco)	40g/L	Meio sólido para cultura de estirpes de <i>S. aureus</i>
SOB	Triptona (BD) Extrato de levedura (BD) NaCl (Panreac)	20 g/L 5 g/L 0,5 g/L	Transformação de células de <i>E. coli</i> competentes
SOC	Meio SOB Glucose (Merck) Mg ²⁺	0,97 mL/mL 20 mM 20 mM	

Quadro 2 (continuação): Meios de cultura usados, respectivas composições e concentrações

SMM 2x	Sacarose (Sigma)	343,2 g/L	Eletrotransformações e células de <i>S. aureus</i> RN 4220 competentes
	Ácido Maleico (Sigma)	4,6 g/L	
	MgCl ₂ (Riedel de Haen)	8,1 g/L	
PB 4x	Penassay Broth (Fluka)	69,6 g/L	
SMMP	SMM 2x	1x	
	PB 4x	2x	

2. Primers e Plasmídeos

Todos os *primers* e plasmídeos usados neste trabalho encontram-se listados nos Quadros 5 e 6, respectivamente.

Quadro 5: Características dos plasmídeos usados neste trabalho.

Nome	Sequência (5'-3')	Local de restrição
M13F	GTAAAACGACGGCCAGT	-
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC	-
nsrR_up	ACTCAAAAAATGCTAAAATGGG	-
nsrR_low	AGTCGCTTTATCTTGCTGACC	-
msrrAB_up	GCTTATGAGCTCGCAATGGAGAATA	SacI
msrrAB_low	GAGTATCAACGGATCCTAAATCACC	BamHI
srrAB(mut)_up	GCCTTAAATGTTGTCCGGTTG	-
scdA_up	GGGAATAGAATTCTGTTGTGGCG	EcoRI
scdA_low	GCTTCTATCGGAGGATCCTAACT	BamHI
scdA_cmut	CATTGTGAGCCCAACATGATTTG	-
perR_OL7	CAACGGGTGTAATACATTGCC	-
OL30(fur)	GTAGGGGAGTGGACATCGTTGGA	-
OL31(fur)	TTGGCACGTTTCACACACACCAT	-
Erm1_comp	AATGGATCCAATCATGAGTATTGTCCGAG	-
KanR_up	CCGGAATTGAAAAAATGAT	-
KanR_low	GAATGACCCCTAGTTCGGAC	-
kan_comp	CCAGCCATAGCATCATGTCC	-
srrAB_01	TTTATCCTGTGGATCCTTTAGACTATG	BamHI
srrAB_02	CGTTGTGACAGAAGCTTTATAAGAGTA	HindIII
srrAB_a1929c	GAATTTAAACATTTAGAAATCGATAATGATGCACATCGCG	ClaI
srrAB_a1929_anti	CGCGATGTGCATCATTATCGATTCTAAATGTTTAAATTC	ClaI
scdA_01	TAACGTTAAATGGATCCATGATTGGCG	BamHI
scdA_02	CCAGTTAAGCTTGACATTAAGGCAAAC	HindIII
scdA_a1817t	CGAAGTTATCGATAGTACATGGACC	ClaI
scdA_a1817t_anti	GGTCCATGTACTATCGATAACTTCG	ClaI
16S_up	GCGAAGAACCCTTACCAAATC	-
16S_down	CCAACATCTCACGACACG	-

Quando incluído, o local de restrição desenhado em cada *primer* encontram-se sublinhados

Quadro 6: *Primes* usados neste trabalho e respectivas sequências nucleotídicas e locais de restrição.

Plasmídeos	Descrição	Origem ou referência
pUC18	Ori (pMB1), <i>lacZα</i> , <i>amp^R</i>	Stratagene
pSP64E	Plasmídeo pSP64 contendo um gene <i>erm^R</i> com 1.2 kb de Tn551; <i>amp^R</i> (<i>E. coli</i>); <i>erm^R</i> (<i>S. aureus</i>)	[84]
pMAD	Vetor shuttle com uma origem de replicação sensível à temperatura em bactérias Gram-positivas: <i>amp^R</i> (<i>E. coli</i>); <i>erm^R</i> (<i>S. aureus</i>); <i>lacZ</i>	[85]
pDG782	Vetor de replicação em <i>E. coli</i> , derivado do vetor pMTL22, contendo um gene de resistência à canamicina clonado no seu polylinker; <i>amp^R</i> ; <i>kan^R</i>	[86]

3. Enzimas

Todos os enzimas de restrição utilizados neste trabalho são da Biolabs e encontram-se listados no Quadro 7. Para amplificação de fragmentos de DNA por PCR foram utilizados os enzimas DNA polimerase Taq (Biolabs), FastStar High Fidelity (Roche) ou Phusion High Fidelity (Thermo Scientific). Quando não vendidos juntamente com o enzima DNA polimerase, foram usados dNTP's da NZYtech. Para ligação de um fragmento de DNA a DNA plasmídico foi usado o enzima T4 DNA ligase (Biolabs). Nas reações de desfosforilação das extremidades 5' de DNA plasmídico na forma linear foi usado o enzima fosfatase alcalina Shrimp (SAP, Roche). Todas as reações enzimáticas referidas em cima foram realizadas nos tampões fornecidos com os respectivos enzimas e segundo as instruções do fabricante. O enzima lisostafina de *Staphylococcus staphylolyticus* (Sigma) foi usado nos processos de lise de células de *S. aureus*.

Quadro 7: Lista de enzimas de restrição usadas e respectivos locais de restrição e temperaturas de digestão. Todos os enzimas são da Biolabs.

Enzima	Local de restrição (5' - 3')	Temperatura de Incubação
BamHI	G▼GATCC	37°C
ClaI	AT▼CGAT	37°C
EcoRI	G▼AATCC	37°C
HindIII	A▼AGCTT	37°C
MfeI	C▼AATTG	37°C
NcoI	C▼CATGG	37°C
SacI	GAGCT▼C	37°C
SalI	G▼TCGAC	37°C
SmaI	CCC▼GGG	25°C

4. Kits

Todos os *kits* usados neste trabalho encontram-se listados em baixo. No manuseamento destes foram seguidas as instruções fornecidas pelo fabricante.

- **kit Turbo DNA-freeTM** (Ambion): usado para digestão do DNA contaminante das amostras de RNA total extraído de células de *S. aureus*.
- **kit QIAquick PCR Purification** (Qiagen): foi usado na purificação de fragmentos de DNA de reações de amplificação ou outras reações enzimáticas. *Primers*, nucleótidos, polimerases ou outros enzimas e sais são eliminados.
- **kit QIAquick Gel Extraction** (Qiagen): permitiu a extração de fragmentos de DNA de géis de agarose preparados com tampão TAE.
- **kit QuikChange II Site-Directed Mutagenesis** (Agilent): foi utilizada para criar uma mutação pontual numa molécula de DNA plasmídico em cadeia duplas por mutagénesse sítio-específica.
- **kit QIAprep Spin Miniprep** (Qiagen): foi usado para a purificação de DNA plasmídico a partir de células lisadas, sem a necessidade realizar as extrações com fenol ou precipitar o DNA.

5. Outros reagentes

Uma lista complementar de reagentes usados neste trabalho é apresentada no anexo 1.

6. Técnicas gerais de clonagem

6.1 Ligações DNA plasmídico-fragmento de DNA

Todas as clonagens realizadas neste trabalho foram conseguidas usando para a ligação do vetor com o fragmento de DNA o enzima de ligação T4 DNA ligase. Cerca de 50 a 80 ng de plasmídeo digerido e desfosforilado foi incubado com o fragmento de DNA com extremidades compatíveis e 400 U de ligase a 16°C durante a noite. As reações de ligação foram sempre realizadas num volume total de 20 µL, sendo que no final do período de incubação o volume total da reação de ligação foi transformado em células de *E. coli* competentes.

6.2 Preparação de células de *E. coli* DH5α competentes pelo método TSS

A partir de uma cultura de células de *E. coli* DH5α, preparado em meio LB por inoculação com células competentes e cultivado durante a noite, foi preparado um novo inóculo em meio LB a 0,1 %. Este foi incubado a 37°C com 150 rpm de agitação até atingir uma Densidade Ótica a 600 nm

(D.O_{600nm}) entre 0,3 e 0,4. Nesta fase, as células foram recolhidas por centrifugação a 6800 xg durante 10 minutos e a uma temperatura de 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* de células ressuspense em 0,01 volumes de solução TSS 1x gelada. Esta suspensão celular foi então distribuída por tubos *ependorf* em alíquotas de 100 µL e congeladas em azoto líquido. As células competentes foram armazenadas a -80°C.

A solução TSS 1x é composta por: 0,25 mL/mL de PEG 8000 40%; 20 µL/mL de MgCl₂ 1M; 50 µL/mL de DMSO; e 0,68 mL/mL de meio LB. O pH da solução foi acertado para 6,5.

6.3 Preparação de células de *E. coli* XL1-Blue competentes pelo método TB

A partir de uma cultura de células de *E. coli* XL1-Blue, preparado em meio LB, suplementado com tetraciclina, por inoculação com células competentes e cultivado durante a noite, foi preparado um novo inóculo a 0,1 % em meio SOB suplementado com 0,1 % de magnésio 2M e tetraciclina. Quando a cultura celular atingiu uma D.O_{600nm} igual a 0,6 esta foi arrefecida em gelo durante 10 minutos e posteriormente centrifugadas a 2100 xg durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* de células ressuspense em 0,32 volumes de tampão TB gelado. Após uma incubação da suspensão celular em gelo durante 10 minutos, esta foi novamente centrifugada a 2100 xg durante 10 minutos a 4°C. O *pellet* de células foi ressuspense em 0,08 volumes de tampão TB gelado. A esta suspensão celular foi adicionada DMSO 100% para uma concentração final de 7%. Após uma incubação em gelo durante 10 minutos a suspensão de células competentes foi distribuída para tubos *ependorf* em alíquotas de 100 µL e congelada em azoto líquido.

A solução de magnésio (Mg²⁺) 2M foi preparada com: 1M de MgCl₂; e 1M de MgSO₄. O tampão TB é composto por: 15mM de CaCl₂; 250 mM de KCl; e 55mM MnCl₂.

6.4 Transformações em *E. coli* DH5α e XL1-Blue pelo método do choque térmico

Todas as transformações feitas em células competentes de *E. coli* DH5α ou XL1-Blue iniciaram-se com uma incubação em gelo e durante 30 minutos da amostra de DNA plasmídico ou mistura de ligação plasmídeo-fragmento de DNA com uma alíquota de células competentes. De seguida, as células foram sujeitas a um choque térmico de 20 segundos (para *E. coli* DH5α) ou 45 segundos (para *E. coli* XL1-Blue) num banho a 42°C. As células foram novamente colocadas em gelo durante mais 2 minutos sendo de seguida adicionado 900 µL de meio SOC. Seguiu-se uma incubação a 37°C durante 1 hora com 180 rpm de agitação. Findo este tempo a suspensão de células foi centrifugada durante 5 minutos a 1700 xg numa centrifuga de bancada (*MiniSpin Plus*, Eppendorf) e o *pellet* obtido ressuspense em 100 µL de sobrenadante. Esta suspensão de células foi plaqueada em meio LA e

incubadas durante a noite a 37°C. Para seleção dos transformantes o meio LA foi suplementado com o antibiótico a que o plasmídeo transformado confere resistência.

6.5 Análise do contido genético de colónias de *E. coli* para identificação de recombinantes – “PCR de colónias”

Após cada transformação de células de *E. coli* com uma reação de ligação vetor-fragmento de DNA, a identificação dos clones recombinantes foi feita por PCR de colónias. Esta técnica permite detetar a presença das moléculas de DNA recombinantes no interior de células de *E. coli* sem que haja a necessidade da extração prévia do seu material genético. Ao longo deste trabalho todos os PCR de colónias foram feitos do seguinte modo: um pouco de massa celular de uma colónia individual de *E. coli* foi recolhida com um palito estéril e ressuspensa em 50 µL de H₂O_{MQ}. As células foram lisadas num banho a 100°C durante 10 minutos e por agitação num vortex. Os detritos celulares foram recolhidos por centrifugação a 9700 xg durante 1 min, e o sobrenadante (15 µL) que contém o material genético foi usado como base numa reação de PCR com um par de *primers* homólogos à sequência de DNA que se pretendia identificar. Todas as reações foram realizadas num volume final de 30 µL contendo 2 U de Taq DNA polimerase, 200 µM de cada dNTP, 0,5 µM de cada *primer*.

A amplificação de uma sequência de DNA por PCR é conseguida com ciclos repetidos de desnaturação da cadeia dupla de DNA, emparelhamento dos *primers* homólogos e que ladeiam a sequência que se pretende amplificar, e extensão das cadeias de DNA pelo enzima polimerase, sendo que cada um destes acontecimentos é conseguido a diferentes temperaturas.

Todas as reações de PCR de colónias foram realizadas num termociclador MyCycler™ da BioRAD com o seguinte programa de amplificação:

- desnaturação inicial: 95°C, 5 min;
- trinta e cinco ciclos repetidos de:
 - desnaturação: 95°C, 45s;
 - emparelhamento dos primers: Ta°C, 45s, sendo Ta a temperatura de emparelhamento (ou temperatura de *annealing*). Esta temperatura dependente diretamente do tamanho e composição de cada par de *primers* utilizado;
 - extensão: 68°C, 1min/kb;
- extensão final: 68°C, 10 min.

Os produtos das reações de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose. As colónias em que houve amplificação de um fragmento de DNA com o tamanho esperado são considerados potenciais clones recombinantes.

6.6 Desfosforilações de cadeias de DNA plasmídico lineares

Para evitar a recircularização e assim aumentar a eficiência de clonagem, após clivagem as moléculas de DNA plasmídico foram incubadas com o enzima fosfatase alcalina Shrimp (SAP) que permite a remoção dos grupos fosfatos das extremidades 5´das moléculas de DNA. Para isso, as moléculas de DNA plasmídico na forma linear foram incubadas com aproximadamente 1 U de SAP por cada 0,2 pmol de DNA durante 1 hora a 37°C. Por fim, o enzima foi inativado por aquecimento da reação de desfosforilação a 65°C durante 15 minutos e o DNA plasmídico purificado desta reação com o kit *QIAquick PCR Purification*.

6.7 Stocks de estirpes bacterianas

O armazenamento de exemplares de clones de *E. coli* e *S. aureus*, foi conseguido por congelação a -80°C de alíquotas de cultura líquida contendo 21 % de glicerol.

6.8 Sequenciações de cadeias de nucleótídicas

Todas as sequenciações de moléculas de DNA realizadas neste trabalho foram efetuadas pelos laboratórios da Stabvida.

6.9 Eletroforese em gel de agarose

Todas as análises de amostras de DNA foram realizadas por eletroforese em gel de agarose. Esta técnica permite separar os fragmentos de DNA com diferentes tamanhos numa rede de agarose por aplicação de uma campo elétrico – a pH neutro os ácidos nucleicos são carregados negativamente, pelo que quando aplicado uma campo elétrico as moléculas de DNA migram em direção ao eletrodo positivo.

Todos os géis de agarose, quer qualitativos quer preparativos foram preparados com UltraPure™ Agarose da Invitrogen em tampão TAE 1x e com corante de DNA *SYBR Safe* da Invitrogen. A eletroforese foi realizada com o gel de agarose submerso em tampão TAE 1x e por aplicação de uma corrente de 80 V. Todas as amostra de DNA foram aplicadas em gel com 1/6 de volume de tampão de corrida (*loading buffer*). Após a corrida em gel, os fragmentos de DNA foram observados sob uma lâmpada de luz ultravioleta. A separação de fragmentos de DNA com tamanhos entre 100 bp e 1000 bp foram realizadas em géis de agarose 2% (m/v) e a separação de fragmentos com tamanhos entre 500 bp a 10 000 bp em géis de agarose 1% (m/v).

O tampão TAE 1x foi preparado por diluição de tampão stock TAE 50x que por sua vez foi preparado com 242 g/L de Tris, 57,1 mL/L de ácido acético glacial e 100 mL/L de EDTA 0,5M pH=8.

O tampão de corrida é composto por: 2,5 g/L de azul de bromofenol, 2,5 g/L de xileno cianol FF e 150 g/L de Ficoll tipo 400. Este tampão confere cor e aumenta a densidade da amostra para facilitar o processo de aplicação em gel, e possui corantes que permitem controlar a frente de corrida da amostra no gel.

6.10 Quantificação de amostras de DNA e RNA

As concentrações de todas as amostras de DNA e RNA foram determinadas utilizando um espectrofotômetro NanoDrop 2000c da ThermoScientif. A concentração é calculada automaticamente a partir da medição da absorvância de 2 µl de amostra a 260 nm. O cálculo do número de ng/µL de DNA ou RNA é realizado através da fórmula:

$$c = (A \times \epsilon) / b$$

em que: c = concentração dos ácidos nucleicos em ng/µl; A = valor da absorvância a 260 nm; ϵ = quoficiente de extinção dependente do comprimento de onda (ng-cm/µL); e b = 1,0 cm. Na determinação de concentrações de DNA em cadeia dupla o quoficiente de extinção usado é 50 ng-cm/µL. Para amostras de RNA é usado um quoficiente de 40 ng-cm/µL.

7. Pesquisa de potenciais proteínas da família NsrR em *S. aureus*

Com a sequência de aminoácidos da proteína NsrR de *Bacillus subtilis* realizou-se uma pesquisa por sequências peptídicas homólogas em bases de dados de genomas de *S. aureus* usando o algoritmo BLAST. No genoma da estipe de *S. aureus* NCTC 8525 foi identificada a proteína hipotética SAOUHSC_01732, com uma identidade de 28%, que possuía a particularidade de conter 3 resíduos de cisteína, ao contrário de outras sequências peptídicas identificadas em diferentes sub-espécies de *S. aureus*. Para a confirmação da sequência de nucleótido, descrita na base de dados, que codifica a proteína SAOUHSC_01732, um fragmento de DNA de 689 pares de bases (bp) que inclui a totalidade do gene SAOUHSC_01732, foi amplificado por PCR numa reação com 100 ng de DNA genómico de *S. aureus* NCTC8325-4, 2,5 U de enzima FastStart High Fidelity e 0,4 µM de cada *primer* nsrR_up e nsrR_down, num volume final de 50 µL. A reação de PCR foi realizada com as seguintes condições: um ciclo de 95°C 45s (desnaturação inicial), trinta e cinco ciclos de 95°C 45s, 52°C 45s, 68°C 60s (desnaturação, emparelhamento, extensão) e um ciclo de 68°C 10 min (extensão final). Os fragmentos

de DNA amplificados foram purificados da mistura de PCR com o kit QIAquick PCR Purification e 2 ng deste foram incubados com o plasmídeo pUC18 (ver Anexo 2), previamente digerido com o enzima SmaI que origina extremidade cegas, e enzima T4 DNA ligase. A mistura de ligação foi transformada em *E. coli* DH5 α e as células transformantes selecionadas em meio LA suplementado com ampicilina, IPTG e X-Gal. A estirpe DH5 α possui uma mutação lacZ Δ M15 que origina um polipéptido incompleto (sem os aminoácidos 11 a 41) de uma β -galactosidase. Por sua vez, o plasmídeo pUC18 possui um gene *lacZ α* , cuja expressão pode ser induzida por IPTG, que codifica um polipéptido α (os primeiros 146 aminoácidos) que complementa a função dessa β -galactosidase não funcional. Células transformadas com pUC18 não recombinante, expressam ambos os fragmentos do enzima e que juntos formam uma β -galactosidase capaz de hidrolisar o substrato incolor X-gal originando um pigmento que confere uma coloração azul às colónias. Quando a clonagem de um fragmento de DNA no *polylinker* do plasmídeo é bem-sucedida o gene *lacZ α* é interrompido e logo o polipéptido α da β -galactosidase não é expresso. Como não se dá a hidrolise do substrato X-gal as colónias permanecem brancas, sendo estas identificadas como potenciais clones recombinantes. Deste modo, apenas as colónias brancas foram então analisadas por PCR de colónias usando os *primers* M13F e M13R que ladeiam a região do *polylinker* dos plasmídeo pUC18 onde foi clonado o fragmento de DNA. Uma das colónias onde foi detetado o plasmídeo recombinante foi cultivada em meio LB suplementado ampicilina, e o plasmídeo extraído das células com o *kit* apropriado. Para uma confirmação adicional o plasmídeo recombinante foi digerido com o enzima MfeI, que possui um local de reconhecimento na sequência de DNA clonada no vetor. Por fim, o plasmídeo recombinante foi sequenciado.

8. Silenciamento dos genes *srrAB* e *ric* de *S. aureus* NCTC 8325

8.1 Construção do plasmídeo pSP64E/*srrA*

Para a construção de um plasmídeo para a disrupção dos genes codificantes do regulador SrrAB, um fragmento interno de 493 bp do gene *srrA* de *S. aureus* NCTC 8325 (SAOUHSC_01586) foi amplificado por PCR numa reação contendo 100 ng de DNA genómico de *S. aureus* NCTC8325, 2 U de Taq DNA polimerase, 200 μ M de dNTP's e 0,5 μ M dos *primers* mssrAB_up e msrrAB_low, num volume final de 50 μ L. O programa de amplificação utilizado foi o seguinte: um ciclo a 94°C 5 min; trinta e cinco ciclos repetidos a 94°C 45 s, 51°C 45s, 68°C 45s; um ciclo a 68°C 10 min. Para ligação do fragmento do gene *srrA* amplificado com o plasmídeo pSP64E (ver Anexo 3), este fragmento foi purificado da mistura de amplificação com o *kit* QIAquick PCR purification e digerido sequencialmente com os enzimas de restrição BamHI e SacI. A ligação foi feita com o enzima T4 DNA ligase por incubação de aproximadamente 350 ng do fragmento de DNA com o plasmídeo pSP64E digerido de igual modo e desfosforilado. A reação de ligação foi transformada em células de

E. coli XL1-Blue competentes e os transformantes selecionados em placa de meio LA suplementado com ampicilina e tetraciclina. As colónias resistentes foram analisadas por PCR de colónias com os *primers* *mssrAB_up* e *mssrAB_low* para identificação dos clones recombinantes. Uma vez identificado uma colónia contendo o plasmídeo recombinante pSP64E/*srrA*, este foi replicado em meio LB suplementado com ampicilina e tetraciclina e extraído das células de *E. coli* com o *kit* apropriado. Para uma adicional confirmação da clonagem do plasmídeo pSP64E/*srrA* este foi digerido com o enzima EcoRI e o padrão de restrição analisado por eletroforese em gel de agarose.

8.2 Construção do plasmídeo pSP64E/*ric*

Um fragmento do gene *ric* com 495 bp (SAOUHSC_00229) foi amplificado por PCR numa reação contendo 100 ng de DNA genómico de *S. aureus* NCTC8325, 2 U de Taq DNA polimerase, 200 µM de dNTP's e 0,5 µM dos *primers* *scdA_up* e *scdA_down*, num volume final de 50 µL. O programa de amplificação usado foi o seguinte: 1 ciclo de 94°C 5 min; 35 ciclos de 94°C 45 s, 55°C 45s, 68°C 45s; e um ciclo final de 68°C 10 min. O DNA amplificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose. Devido à presença de fragmentos de DNA amplificados por emparelhamento inespecífico dos *primers* usados, a banda visível em gel de agarose com aproximadamente 500 bp, e que correspondia ao fragmento de DNA que se pretendia amplificar, foi recortado do gel e o DNA extraído com o *kit* apropriado para este fim. De seguida, este fragmento de DNA foi digerido com os enzimas de restrição EcoRI e BamHI e usados aproximadamente 400 ng numa reação de ligação ao plasmídeo pSP64E, previamente digerido de igual modo e desfosforilado. Células de *E. coli* XL1-Blue competentes foram transformadas com a reação de ligação e plaqueadas em meio LA suplementado com ampicilina e tetraciclina para seleção dos transformantes. As colónias resistentes foram analisadas por PCR usando os *primers* *scdA_up* e *scdA_down* para identificação dos clones recombinantes. Uma das colónias identificadas como contendo o plasmídeo recombinante pSP64E/*ric* foi cultivada em meio LB, suplementado com os respetivos antibióticos, para replicação e extração do plasmídeo. A construção correta do plasmídeo recombinante pSP64E/*scdA* extraído, foi ainda confirmada por digestão enzimática com os enzimas EcoRI e SalI e o padrão de restrição analisado por eletroforese em gel de agarose. Este plasmídeo recombinante foi usado para a disrupção do gene *ric* em *S. aureus*.

8.3 Eletrotransformação de *S. aureus* RN4220 com as plasmídeos recombinantes pSP64E/srrAB e pSP64E/ric

8.3.1 Preparação de células de *S. aureus* RN4220 competentes

Com um inóculo de células de *S. aureus* RN4220 cultivado em meio TSB durante a noite inoculou-se 100 mL de meio TSB a 2%. As células foram cultivadas até ser atingida uma Densidade Ótica a 600 nm igual a 0,5 altura em que foram recolhidas por centrifugação a 8000 xg durante 10 min a 4°C numa centrífuga Avanti J25-I (Beckman Coulter). O sobrenadante foi descartado, o *pellet* de células obtido ressuspensão em 100 mL de sacarose 0,5 M gelada e novamente centrifugado a 8000 xg durante 10 min a 4°C. O sobrenadante foi de novo desprezado e o *pellet* novamente ressuspensão desta vez em 50 mL de sacarose 0,5 M. Repetiu-se o passo de centrifugação e ressuspensão-se o *pellet* celular em 300 µL de sacarose 0,5 M. A suspensão de células tornadas competentes foi distribuída por vários tubos *ependorf*, previamente arrefecidos, em alíquotas de 50 µL e de imediato congeladas em azoto líquido e armazenadas a -80°C.

8.3.2 Preparação do plasmídeo para eletroporação

Entre 60 a 80 µg de cada plasmídeo recombinante psp64E/srrAB e pSP64E/scdA foi precipitados pelo método de precipitação com etanol. Para isso, ao volume total de cada plasmídeo adicionou-se 2,5 volumes de etanol 100% gelado e 0,1 volumes de acetato de sódio 3 M pH 5,2. Esta mistura foi incubada durante 3 horas a -80°C e posteriormente centrifugada durante 30 minutos a 13 000 xg a 4°C. O *pellet* de DNA plasmídico obtido ressuspensão em etanol 70% gelado e novamente centrifugada durante 30 minutos a 13 000 xg a 4°C. O sobrenadante foi retirado com cuidado e o *pellet* deixado a secar durante aproximadamente 30 min para que a totalidade do etanol evapora-se. Por fim, este o *pellet* de DNA plasmídico foi ressuspensão em 10 µL de H₂O estéril e usado na totalidade para a eletrotransformação das células de *S. aureus*.

8.3.3 Transformação de *S. aureus* RN4220 competentes por eletroporação

O processo de eletrotransformação iniciou-se com a descongelação, à temperatura ambiente, de uma alíquota de 100 µL células de *S. aureus* RN4220 eletrocompetentes e incubação destas com os 60 a 80 µg de plasmídeo recombinante pSP64E/srrAB ou pSP64E/ric durante 30 minutos em gelo. Findo este tempo, a suspensão celular misturada com o plasmídeo foi transferida para uma cuvette de eletroporação gelada e aplicado um choque único de 2,5 KV, 100Ω durante 2,5 ms num eletroporador MicroPulser (Biorad). De imediato, adicionou-se 900 µL de meio SMMP à alíquota de células

eletroporadas sendo estas de seguida transferidas para um *ependorff* gelado onde ficaram a repousar em gelo durante 15 minutos. Por fim, estas células foram incubadas a 37°C durante 1,5 horas com agitação de 200 rpm. As células foram recolhidas por centrifugação a 1700 xg por 5 minutos, ressuspensas em 100 µL de sobrenadante e plaqueadas em meio TSA suplementado com eritromicina. Após uma incubação a 37°C por aproximadamente 24 a 48 horas as colónias de *S. aureus* resistentes à eritromicina foram analisadas [87].

8.3.4 Identificação dos clones de *S. aureus* RN4220 mutantes

Para identificação de colónias de *S. aureus* RN4220 que contenham mutação pretendida, DNA cromossomal de cada colónia resistente a eritromicina foi isolado e analisado por PCR. Para isso, um pouco de massa celular da cada colónia isolada foi recolhida com um palito estéril e ressuspensa em 20 µL de tampão Tris-HCl 10 mM pH 8. Cada suspensão celular foi incubada com 0,25 mg/mL de lisostafina de *Staphylococcus staphylolyticus* a 37°C durante 15 minutos seguidos de 15 minutos a 100°C. Durante este processo a parede celular é degradada, as células lisadas e o material genético libertado. Estas suspensões de células lisadas foram centrifugadas para remoção dos detritos celulares a 9 700 xg durante 10 minutos. 15 µL de sobrenadante, contendo o DNA total das células, foi então analisado numa reação de PCR contendo 2 U de Taq DNA polimerase, 200 µM de cada dNTP e 0,5 µM dos *primers* *srrAB*(mut)_up e *Erm1_comp* ou dos *primers* *scdA_cmut* e *Erm1_comp* (para células transformadas com o plasmídeo pSP64E/*srrAB* ou com o plasmídeo pSP64E/*ric*, respetivamente), num volume final de 30 µL. O programa de amplificação usado foi o seguinte: um ciclo de 94°C 5 min; trinta e cinco ciclos de 94°C 45 s, 52°C 45s, 68°C 45s; e um ciclo final de 68°C 10 min.

8.4 Mutações de *S. aureus* com o plasmídeo termosensível pMAD

8.4.1 Construção do plasmídeo recombinante pMAD/*srrA/kan*

Toda a construção do fragmento para disrupção do gene *srrA* (fragmento *srrA/kan*) foi inicialmente feita no vetor pUC18 e só posteriormente transferida para o plasmídeo pMAD. Este processo iniciou-se com a amplificação de um fragmento de DNA de 1959 bp contendo a totalidade do gene *srrA* (726 bp) a partir de DNA genómico de *S. aureus* NCTC 8325. A reação de amplificação por PCR foi preparada com 100 ng de DNA genómico de *S. aureus* NCTC8325-4, 2,5 U de enzima FastStart High Fidelity, 200 µM de dNTPs e 0,4 µM de cada *primer* *srrAB_01* e *srrAB_02*, num volume final de 50 µL. O programa de amplificação utilizado foi o seguinte: um ciclo de desnaturação a 95°C por 3 min; trinta e cinco ciclos repetidos de 95°C 45s, 54°C 45s, 68°C 2 min; um ciclo final de 68°C 8 min. O

fragmento de DNA foi purificado da reação de PCR e digerido sequencialmente com os enzimas de restrição BamHI e HindIII. De seguida, 800 ng deste fragmento de DNA foi incubado com o vetor pUC18, previamente digerido de igual modo e desfosforilado, numa reação de ligação. Esta reação foi transformada em células de *E. coli* XL1-Blue competentes sendo os transformantes selecionados em placas de meio LA suplementado com ampicilina, X-Gal e IPTG. Para identificação dos clones recombinantes, as colónias brancas foram analisadas por PCR de colónias com os *primers* que ladeiam o *polylinker* do vetor pUC18, M13_foward e M13_reverse. Identificado um clone recombinante, este foi cultivado em LB suplementado com ampicilina e o DNA plasmídico extraído de um *pellet* de células. Uma adicional confirmação da correta construção do plasmídeo pUC18/*srrA* foi efetuada por digestão enzimática com os enzimas HindIII e SacI que clivam o plasmídeo recombinante antes e depois do fragmento de DNA clonado.

De seguida, o plasmídeo recombinante pUC18/*srrA* foi modificado por mutagénese sítio-específica *in vitro* de modo a substituir o nucleótido de adenina nº 992 por um nucleótido de citosina (contando a partir da extremidade BamHI do fragmento *srrA*), criando assim um local de restrição ClaI aproximadamente a meio do fragmento de DNA clonado. Para isso foi usado o kit *QuikChange II Site-Directed Mutagenesis*. A mutagénese é conseguida usando um par de *primers* contendo a mutação pretendida, e que emparelham em cadeias opostas da molécula de DNA plasmídico de cadeia dupla que pretendemos modificar, e um enzima DNA polimerase *PfuUltra high-fidelity* que sintetiza novas cadeias de DNA plasmídico por extensão destes *primers*. A mutação do plasmídeo recombinante foi conseguida numa reação contendo: 40 ng de plasmídeo pUC18/*srrA* em cadeia dupla e metilado (plasmídeo replicado em células de *E. coli* *dam*⁺), 1 µL de mistura de dNTPs, 2,5 U de enzima *PfuUltra high-fidelity* e 125 ng de cada *primer* *srrAB_a1929c* e *srrAB_a1929c_antisense* com um volume final de 50µL. A reação foi realizada num termociclador tendo sido usado o seguinte programa: um ciclo de 95°C 30s e dezasseis ciclos repetidos de 95°C 30s, 55°C 1 min, 68°C 4 min e 50s. De seguida, os produtos desta reação foram tratados com o enzima endonuclease DpnI, que cliva especificamente cadeias de DNA metilado, de modo a digerir as cadeias de DNA plasmídico parental, selecionando-se assim as cadeias de DNA sintetizadas que contêm a mutação. Por fim, esta mistura reacional tratada com DpnI foi transformada em células de *E. coli* XL1-Blue para replicação do plasmídeo mutado – pUC18/*srrA*(ClaI). Uma das colónias transformantes, previamente selecionada em meio LA suplementado com ampicilina, foi cultivada em meio LB, também suplementado com o mesmo antibiótico, para replicação e extração do plasmídeo mutado. Para confirmação da presença do local de restrição criado o plasmídeo foi digerido com o enzima ClaI. Para garantir que este local de restrição se encontrava no local pretendido o plasmídeo foi também sequenciado.

Um gene de resistência a canamicina foi obtido a partir do plasmídeo pDG782, um vetor recombinante de replicação em *E. coli* contendo este gene clonado no seu *polylinker*. O isolamento da sequência que codifica o gene de resistência, com aproximadamente 1500 bp, foi conseguido em três passos: digestão

este plasmídeo com o enzima de restrição *ClaI*; separação dos fragmentos de DNA resultantes da digestão, por eletroforese em gel de agarose 1%; e extração do gel do fragmento correspondente ao gene de resistência (fragmento de 1500 bp) com recurso ao kit apropriado. Este fragmento de DNA foi então clonado no local de restrição *ClaI* construído por mutagénesse no plasmídeo recombinante pUC18/*srrA*. Para isso, o plasmídeo pUC18/*srrA*(*ClaI*) digerido e desfosforilado foi incubado com 170 ng do fragmento de DNA codificando o gene de resistência à canamicina numa reação de ligação com enzima ligase. Esta reação foi transformada em células de *E. coli* XL1-Blue e os transformantes selecionados em meio LA suplementado com ampicilina. Os clones recombinantes foram identificados por PCR de colónias usando os *primers* *kanR_up* e *kanR_low* que emparelham no interior do gene de resistência clonado. Um dos clones identificados foi cultivado em meio LB suplementado com ampicilina para replicação e extração do plasmídeo recombinante pUC18/*srrA/kan*. Também aqui, a ligação foi confirmada por digestão enzimática, tendo para isso sido usado o enzima *ClaI*, que no plasmídeo recombinante passa a ter locais de restrição antes e depois do gene de resistência clonado.

Nesta última fase, o fragmento de DNA *srrA/kan* construído no vetor pUC18, e que possui uma extensão total de 3 457 bp, foi amplificado a partir do plasmídeo recombinante pUC18/*srrA/kan*, para de seguida poder ser clonado no vetor final pMAD. A amplificação deste fragmento de DNA foi feita por PCR numa reação contendo: 3 ng de plasmídeo pUC18/*srrA/kan*, 200 μ M de dNTPs, 1 U de DNA polimerase Phusion High-Fidelity e 0,5 μ M de cada *primer* *srrAB_01* e *srrAB_02* num volume final de 50 μ L. O programa de amplificação usado foi o seguinte: um ciclo inicial de desnaturação de 98°C 30s; trinta e cinco ciclos repetidos de 98°C 10s, 60°C 30s, 72°C 55s; um ciclo final de extensão de 72°C 10 min. O plasmídeo pMAD clivado com o enzima *SmaI*, que origina extremidades cegas, e desfosforilado, foi incubado com aproximadamente 1 μ g do fragmento de DNA *srrA/kan* (que foi amplificado com extremidades cegas) e o enzima ligase. Findo o período de incubação, esta reação de ligação foi transformada em células de *E. coli* XL1-Blue. Os transformantes foram selecionados em meio LA suplementado com ampicilina a uma temperatura de 30°C. A identificação de clones recombinantes foi realizada por PCR de colónias com os *primers* *msrrAB_up* e *kan_low*. Após a extração de plasmídeo de um clone recombinante cultivado em meio LB este foi digerido com os enzimas *NcoI* e *SacI* para confirmação da ligação plasmídeo-fragmento de DNA.

8.4.2 Construção do plasmídeo pMAD/*ric/kan*

A estratégia usada para a construção o plasmídeo pMAD/*ric/kan* foi semelhante à usada para a construção do plasmídeo pMAD/*srrAB/kan*. Resumidamente, um fragmento de DNA com 1847 bp, contendo a totalidade do gene *ric*, foi amplificado por PCR com o enzima FastStart High Fidelity e os *primers* *scdA_01* e *scdA_02* a partir de DNA genómico de *S. aureus* NCTC 8325. Devido à amplificação de fragmentos de DNA inespecíficos, o fragmento de DNA pretendido, com

aproximadamente 1,8 kb foi purificado por extração de gel de agarose. De seguida, este foi digerido sequencialmente com os enzima BamHI e HindIII e clonado em pUC18 dando origem ao plasmídeo pUC18/*ric*. Para confirmação da correta ligação vetor-fragmento de DNA, plasmídeo extraído de um clone recombinante foi digerido com os os enzimas HindIII e SacI. O plasmídeo recombinante pUC18/*ric* foi então modificado por mutagénese sítio-específica com os *primers* *scdA_a1817t* e *scdA_a1817t_anti* para substituição do nucleótido de adenina nº 1154 por um nucleótido de timina e assim criação de uma local de restrição ClaI aproximadamente a meio do fragmento de DNA clonado no vetor (contando a partir da extremidade BamHI). Neste local foi introduzido um gene de resistência à canamicina obtida a partir do plasmídeo de replicação em *E. coli* pDG782. Por fim, a fragmento de 3,5 kb construído no vector pUC18 foi amplificado por PCR com o enzima DNA polimerase Phusion High-Fidelity e os *primers* *scdA_01* e *scdA_02*. O fragmento de DNA, que possui extremidades cegas, foi então incubado com o vetor pMAD digerido com SmaI e enzima ligase. A reação de ligação foi transformada em células de *E. coli* XL1-Blue e os transformantes foram selecionados em meio LA suplementado com ampicilina com incubação a 30°C. Por sua vez, os clones recombinantes foram identificados por PCR de colónias com os *primers* *scdA_up* e *kanR_low*. Após a extração de plasmídeo de um clone recombinante cultivada em meio LB este foi digerido com os enzimas NcoI e SacI para confirmação da ligação plasmídeo-fragmento de DNA.

Todos os passos aqui omitidos foram realizados à semelhança do anteriormente descrito no ponto 8.4.1.

9. Níveis de expressão do gene *ric* nas estirpes mutadas NCTC8325 Δfur e NCTC 8325 $\Delta perR$

9.1 Confirmação das mutações $\Delta perR$ e Δfur

As estirpes de *S. aureus* MJH001 ($\Delta perR$) e MJH010 (Δfur) utilizadas neste trabalho, que possuem os genes que codificam os reguladores PerR e Fur silenciados, foram gentilmente cedidos pelo Dr. J. Foster.

Cada uma destas estirpes foi cultivada em meio sólido TSA suplementado com 5 $\mu\text{g/mL}$ de tetraciclina (para a estirpe $\Delta perR$) ou 50 $\mu\text{g/mL}$ de canamicina (para a estirpe Δfur) e analisadas por PCR para confirmação da presença dos genes de resistência que interrompem os genes *perR* e *fur*. Para isso, um pouco de massa celular de uma colónia foi recolhida e ressuspensa em 20 μL de tampão Tris-HCl 10 mM pH 8. Estas células foram lisadas por incubação com 0,25 mg/mL de lisostafina a 37°C durante 15 minutos seguidos de 15 minutos a 100°C. As suspensões de células lisadas foram então centrifugadas a

9 700 xg durante 10 minutos e 15 µL de sobrenadante analisados por PCR numa reação contendo 2 U de Taq DNA polimerase, 200 µM de cada dNTP e 0,5 µM dos *primers* perR_OL7 e kan_comp ou dos *primers* OL30(fur) e OL31(fur), que permitem a deteção da presença dos genes de resistência que silenciam os genes *perR* e *fur*, respetivamente. O programa de amplificação usado foi o seguinte: um ciclo de 94°C 5 min; trinta e cinco ciclos repetidos de 94°C 45 s, 51°C 2 min, 68°C 45s; e um ciclo final de 68°C 10 min. A extensão dos fragmentos amplificados foi determinada por eletroforese em gel de agarose.

9.2 Crescimentos celulares e recolha de células para isolamento de RNA total

Os ensaios experimentais para determinação dos níveis transcricionais do gene *ric* de *S. aureus* iniciaram-se com o crescimento e recolha de células de *S. aureus* NCTC 8325-4 (estirpe selvagem), *S. aureus* Δ *perR* e *S. aureus* Δ *fur*. Para isso, uma cultura celular de cada estirpe, cultivada durante a noite em meio TSB (estirpe selvagem) ou em meio TSB suplementado com canamicina ou tetraciclina (estirpes Δ *perR* e Δ *fur*, respetivamente), foi diluída em 20 mL de meio LB de modo a que cada cultura celular fosse iniciada com uma densidade ótica (D.O_{600nm}) igual a 0,1. As células de *S. aureus* foram então cultivadas em condições aeróbias (erlenmeyer com 1/5 do volume total preenchido) a 37°C com 150 rpm de agitação até atingirem uma D.O_{600nm} igual a 1. Após 15 minutos, foi adicionado aproximadamente 2 mL de solução de paragem de fenol 5% em etanol (pH 4,3) a 15 mL de cultura celular e esta mistura centrifugada, em tubos JA-20, a 7 000 xg durante 5 minutos numa centrífuga Avanti J25-I. O *pellet* de células obtido foi de imediato congelado em azoto líquido e conservado a -80°C.

9.3 Extração do RNA total e purificação

O RNA total das células recolhidas foi extraído com o *kit* High Pure RNA Isolation. Para isso, cada *pellet* de células foi lentamente descongelado em gelo, ressuspenso em 400 µL de tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e incubado por 30 min a 37°C com 1 mg/mL de lisozima e 19 mg/mL de lisostafina. O restante procedimento de extração do RNA foi efetuado com as soluções do *kit* e segundo as instruções do fabricante: as células previamente tratadas foram lisadas com um tampão de lise, composto por guanidina-HCl, Tris-HCl e Triton X-100. De seguida, o lisado celular foi aplicado numa coluna cuja matriz liga seletivamente todos os ácidos nucleicos (RNA e DNA), permitindo assim, a eliminação dos detritos celular e restantes contaminantes em vários passos de centrifugação por aplicação de tampões à base de etanol. No final, o RNA total (e moléculas de DNA) foi eluído da coluna com H₂O livre de Rnases. Para eliminação das moléculas de DNA foi usado o *kit* Turbo DNA-

free: as amostras foram tratadas com pelo menos 8 U de Turbo DNase, uma versão do enzima DNase I com uma eficiência catalítica 350x maior, durante 1 hora a 37°C. Findo este tempo, o enzima é removido da amostra por aplicação de um reagente de inativação, fornecido com o *kit*, que permite remoção rápida do enzima sem necessidade de recorrer aos métodos mais tradicionais de extração com recurso a solventes orgânicos como o fenol e clorofórmio. Para garantir que todo o DNA contaminante foi eliminado da amostra de RNA total, este foi analisado por PCR com o enzima Taq DNA polimerase e os *primers* *scdA_up* e *scdA_down* que apenas emparelharam e amplificam um fragmento de DNA caso as moléculas de DNA não tenha sido totalmente eliminadas.

A qualidade das amostras de RNA, no que diz respeito à integridade da moléculas de RNA e ausência de contaminantes proteicos, foi monitorizada por eletroforese em gel de agarose 1% e por análise espectrofotométrica através a determinação da razão entre as absorvâncias da amostra a 260 nm e 280 nm, respetivamente.

9.4 Síntese de cDNA e avaliação dos níveis de expressão do gene *ric*

Os níveis de transcrição do gene *ric* em cada uma das estirpes de *S. aureus* em estudo foram então avaliados pelo método semi-quantitativo de RT-PCR. Para isso, 2 µg de RNA total extraído das células de *S. aureus* das estirpes selvagem, Δfur e $\Delta perR$, foram então convertido em DNA complementar (cDNA) numa reação catalisada pelo enzima transcriptase reversa *Transcriptor High Fidelity* e usando os *primers* aleatórios (*random hexamer primers*). Esta reação foi realizada num termociclador segundo as instruções do *kit Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis* usado. Por sua vez, este cDNA sintetizado foi usado numa reação de PCR contendo 2 µL de cDNA 4 %, 2 U de Taq DNA polimerase 200 µM de dNTPs e 0,5 µM de cada *primer* *scdA_up* e *scdA_down*. O programa de amplificação foi o seguinte: 1 ciclo de 94°C 5 min; 35 ciclos de 94°C 45 s, 55°C 45s, 68°C 45s; e um ciclo final de 68°C 10 min. Durante este PCR os transcritos do gene *ric* (convertidos em cDNA) são amplificados, sendo que o nível de amplificação é proporcional à quantidade de transcrito do gene presente na amostra de RNA total extraído. Os produtos destas amplificações foram então aplicados em gel de agarose e as intensidades das bandas, que refletem a quantidade de produto amplificado, comparadas. Para garantir que se estava a analisar quantidades de RNA equivalentes, os níveis transcrito do gene de expressão constante *16S rRNA* foram também avaliados usando os *primers* *16S_up* e *16S_down*. Para cada estirpe em estudo, estes ensaios foram realizados para duas culturas de *S. aureus* independentes.

Resultados e Discussão

1. Confirmação da sequência de nucleótidos do gene *SAOUHSC_01732* de *S. aureus*

A proteína de ferro-enxofre NsrR é um repressor transcricional especificamente dedicado à detecção de moléculas de óxido nítrico (NO) numa grande variedade de bactérias. Em *E. coli*, por exemplo, este regulador controla a expressão de diversos genes que codificam enzimas necessários à proteção da célula contra os efeitos nocivos desta molécula, entre os quais está incluído o gene que codifica a proteína de reparação de centros de ferro Ric [88]. A atividade do regulador NsrR é modulada pelo NO através da interação com o seu centro de ferro-enxofre. Com o centro nitrosilado o regulador deixa de se conseguir ligar ao DNA e os genes por si reprimidos são expressos [89]. O centro de ferro-enxofre, essencial para a atividade deste regulador, encontra-se coordenado a três resíduos de cisteína que são conservados entre as diversas proteínas da família de NsrR [90].

Com o objetivo de detetar em *S. aureus* potenciais proteínas homólogas a NsrR foi usado o algoritmo Blast para realizar uma pesquisa nas bases de dados de proteomas de várias estirpes de *S. aureus* por sequências peptídicas semelhantes à proteína NsrR de *Bacillus subtilis*. Nesta pesquisa foram identificadas as proteínas hipotéticas SAV1626 de *S. aureus* Mu50, SA1453 de *S. aureus* N315 e MW1576 de *S. aureus* MW2, com aproximadamente 28% de identidade, e a proteína SAOUHSC_01732 de *S. aureus* NCTC 8325 com aproximadamente 30% de identidade. As três primeiras possuem na sua sequência peptídica apenas um resíduo de cisteína. Com apenas uma cisteína não é possível que estas proteínas liguem um centro de ferro-enxofre, pelo que foi descartada a hipótese destas constituírem potenciais homólogos de NsrR. Já a proteína hipotética SAOUHSC_01732 identificada na estirpe de *S. aureus* NCTC 8325, apesar de diferir das restantes apenas nos últimos aminoácidos da sua sequência peptídica, estava descrita como contendo três resíduos de cisteína (Figura 11).

```

NsrR Bsubt : MKLITNYTDVYSLERVLTFLAERPGELSNKQTAETYSISKNHLMKVTYRGLQCYVETTRGRGGI
SA1453      : MKISTKGRYGLTLMISLAKKEGQCCISLKSIAEENNSDLYLEQLVGPPLRNAGLIRSVRGAKGGY
MW1576     : MKISTKGRYGLTLMISLAKKEGQCCISLKSIAEENNSDLYLEQLVGPPLRNAGLIRSVRGAKGGY
SAV1626    : MKISTKGRYGLTLMISLAKKEGQCCISLKSIAEENNSDLYLEQLVGPPLRNAGLIRSVRGAKGGY
SAOUHSC 01 : MKISTKGRYGLTLMISLAKKEGQCCISLKSIAEENNSDLYLEQLVGPPLRNAGLIRSVRGAKGGY

                                     ↓ ↓ ↓
NsrR Bsubt : RLCMDPEETINICEVVRKTEDDFNIVECFDANKNLCVISPVCGIKHVLNEALAYAVLDKYTEIRD
SA1453      : QLRVPAEETISAGDIIRLLEGPITFVESIESE-----PAQKQLWIRMRDAVRDVL DNTTLKYLAE
MW1576     : QLRVPAEETISAGDIIRLLEGPITFVESIESE-----PAQKQLWIRMRDAVRDVL DNTTLKYLAE
SAV1626    : QLRVPAEETISAGDIIRLLEGPITFVESIESE-----PAQKQLWIRMRDAVRDVL DNTTLKYLAE
SAOUHSC 01 : QLRVPAEETISAGDIIRLLEGPITFVESIESE-----PAQK-----TTM-----

NsrR Bsubt : LVKKNKEDTMKLIKMKKE : 146
SA1453      : YVDTSEDL DGYMFYI- : 140
MW1576     : YVDTSEDL DGYMFYI- : 140
SAV1626    : YVDTSEDL DGYMFYI- : 140
SAOUHSC 01 : --DSHRCSEHRCER-- : 116
    
```

Figura 11: Sequências peptídicas das proteínas hipotéticas de diferentes estirpes de *S. aureus* que possuem a maior identidade com a proteína NsrR de *Bacillus subtilis*. As proteínas hipotéticas SAV1626 de *S. aureus* Mu50, SA1453 de *S. aureus* N315 e MW1576 de *S. aureus* MW2 possuem 30% de identidade com a proteína NsrR de *B. subtilis* (nsrR_Bsubt) e são iguais entre si. Estas são compostas por apenas um resíduo de cisteína. A proteína hipotética SAOUHSC_01732 (SAOUHSC_01) identificada na estirpe NCTC8325 possui uma identidade de 28% com a proteína NsrR de *B. subtilis* e contém três resíduos de cisteína, apesar de sua sequência peptídica diferir das restantes proteínas hipotéticas identificadas em *S. aureus* apenas nos últimos 15 aminoácidos. Os resíduos de cisteína das sequências das proteínas de *S. aureus* encontram-se assinalados por círculos a vermelho. Os três resíduos de cisteína da proteína NsrR de *B. subtilis* que ligam o centro de ferro-enxofre encontram-se assinalados por setas a laranja.

Para confirmar se de facto a proteína hipotética SAOUHSC_01732 de *S. aureus* NCTC 8325 possui mais dois resíduos de cisteína do que as proteínas identificadas nas outras estirpes de *S. aureus*, a região do genoma descrito como codificante desta proteína foi amplificada por PCR. Este fragmento de DNA com 689 bp foi incubado com o vetor pUC18, previamente digerido com o enzima de restrição *Sma*I, que origina extremidades cegas, e o enzima ligase. Esta reação de ligação foi transformada em células de *E. coli* DH5 α e os clones recombinantes foram selecionados em meio LA suplementado com ampicilina, IPTG e X-gal. Os potenciais clones recombinantes são selecionados pela sua coloração branca – os vetores pUC18 recombinantes possuem o gene *lacZ α* interrompido, pelo que não ocorre a expressão do polipéptido α capaz de complementar a β -galactosidase não funcional que é expressa nas células de *E. coli* DH5 α . Quando complementada esta β -galactosidase possui a capacidade de hidrolisar o substrato X-gal, formando-se um pigmento que confere uma coloração azul às colónias. O conteúdo genético das colónias brancas foi então analisado por PCR para identificação dos clones que realmente continham o vetor ligado ao fragmento de DNA de 689 bp. O vetor recombinante extraído de um dos potenciais clones recombinantes identificados foi digerido com o enzima de restrição *Mfe*I, que possui um único local de reconhecimento no interior do gene SAOUHSC_01732 clonado. Os produtos desta digestão foram analisados por eletroforese em gel de agarose, tendo sido identificada uma banda simples correspondente a um fragmento de DNA na forma linear com aproximadamente 3300 bp, o que corresponde à soma do tamanho do vetor pUC18 (2686 bp) com o tamanho do fragmento clonado (689 bp) (Figura 12). Este vetor foi então sequenciado para confirmação da sequência de nucleótidos que codifica a proteína SAOUHSC_01732.

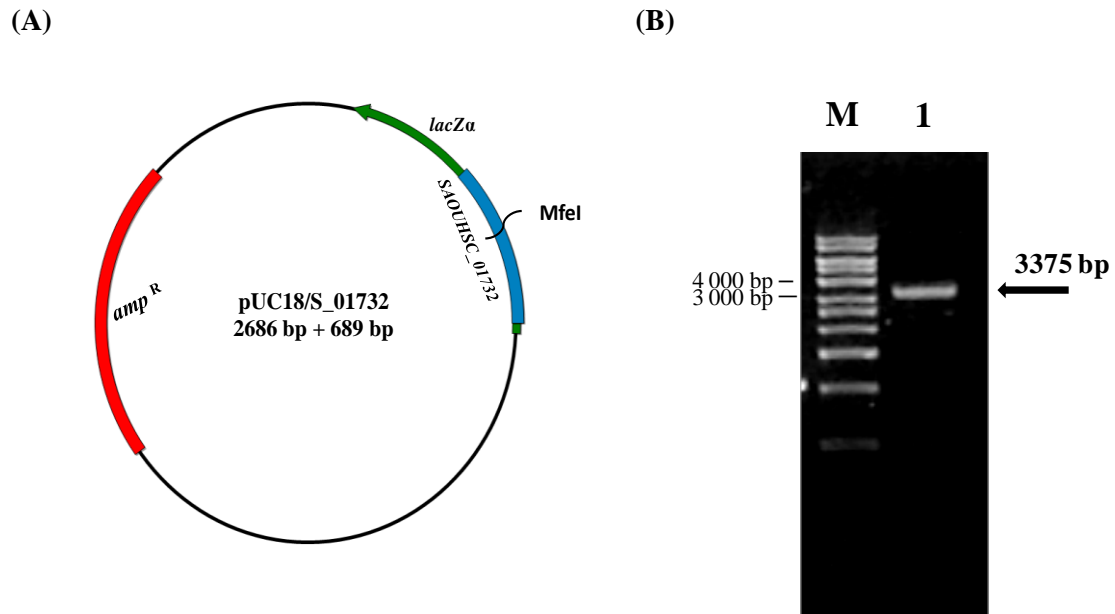


Figura 12: Confirmação por digestão enzimática da correta clonagem do fragmento de DNA SAOUHSC_01732 de *S. aureus* em pUC18. (A) Mapa do plasmídeo recombinante pUC18/S_01732 que resultou da clonagem de um fragmento de DNA que inclui a sequência do gene SAOUHSC_01732 de *S. aureus* em pUC18. O plasmídeo recombinante possui um único local de restrição MfeI. Este encontra-se incluído na sequência de DNA do fragmento clonado pelo que foi usado para confirmação da correta ligação deste fragmento de DNA ao vetor. (B) Eletroforese em gel de agarose dos produtos resultantes da incubação do plasmídeo recombinante pUC18/S_01732 com o enzima de restrição MfeI. A única banda visível correspondente ao tamanho total do plasmídeo recombinante (3 375 bp) na forma linear, confirmando-se assim a presença do fragmento de DNA clonado.

A comparação dos resultados da sequenciação do gene SAOUHSC_01732 com a sequência prevista no genoma de *S. aureus* permitiu concluir que estas diferiam em um nucleótido de adenina (Figura 13). A sequência real de nucleótidos que figura no genoma na estirpe NCTC8325 codifica uma cadeia peptídica sem os dois adicionais resíduos de cisteína e com uma sequência de aminoácidos exatamente igual às sequências das restantes proteínas hipotéticas identificadas nas outras estirpes de *S. aureus* analisadas. Deste modo, foi mostrado que a sequência da proteína SAOUHSC_01732 presente na base de dados da estirpe de *S. aureus* NCTC 8325 estava errada. Uma vez que esta proteína não possui os resíduos de cisteína necessários à ligação de um centro de ferro-enxofre foi colocada de parte a hipótese de esta ser uma proteína homóloga do regulador NsrR.

Estes resultados foram enviados para a entidade responsável pela sequenciação do genoma de *S. aureus* NCTC8325 a fim de procederem à sua correção.



Figura 13: A sequência do gene *SAOUHSC_01732* descrita na base de dados do genoma de *S. aureus* NCTC 8325 não corresponde à sequência real de nucleótidos presente no genoma desta estirpe. O alinhamento entre a sequência de nucleótidos do gene *SAOUHSC_01732* (1), constante nas bases de dados (sequência teórica), e a sequência de nucleótidos que na realidade figura na mesma região do genoma de *S. aureus* NCTC 8325 (2) permitiu identificar a diferença de uma base entre sequências (seta vermelha). Esta diferença leva a que cada sequência codifique uma sequência peptídica diferente uma vez que não possuem a mesma grelha de leitura. O codão stop de cada sequência é assinalado a vermelho.

2. Silenciamento dos genes *srrAB* de *S. aureus*

Com o objetivo de analisar se o regulador de dois componentes SrrAB controla a expressão do gene que codifica a proteína Ric de *S. aureus*, foram desenhadas duas estratégias diferentes para a construção de um mutante que possua o gene *srrA* interrompido e conseqüentemente não expresse as proteínas SrrA e SrrB.

A primeira tentativa de silenciamento do gene *srrA* foi feita com o plasmídeo integrativo pSP64E. Os principais elementos que compõem este plasmídeo são: uma origem de replicação reconhecida em *E. coli*; um gene que confere resistência à ampicilina e que é reconhecida em *E. coli*; e um gene que confere resistência à eritromicina, do transposão Tn551, clonado nos locais de restrição BamHI e XbaI do *polylinker* do plasmídeo, e que é reconhecido em *S. aureus* (Figura 14) [84].

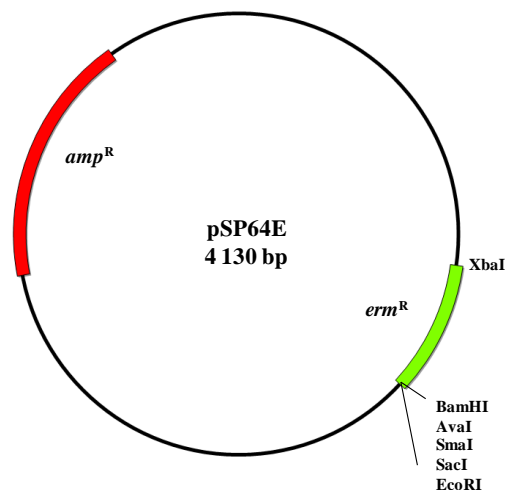


Figura 14: Mapa do plasmídeo pSP64E. Os principais componentes do plasmídeo estão indicados: gene de resistência à ampicilina para seleção em *E. coli*, *amp^R*; gene de resistência à eritromicina para seleção em *S. aureus*, *erm^R*; origem de replicação em *E. coli*, ori. Os principais locais de restrição enzimática estão representados segundo a sua posição relativa.

Para a mutação do gene *srrA*, foi construído o plasmídeo recombinante pSP64E/*srrA*. Para isso, um fragmento de DNA interno do gene *srrA* com 493 bp e extremidades SacI e BamHI foi incubado com o plasmídeo pSP64E, previamente digerido com os mesmos enzimas de restrição, e o enzima T4 DNA ligase (Figura 15.A). Esta reação de ligação foi transformado em células de *E. coli* XL1-Blue competentes, e após a seleção dos transformantes em meio LA suplementado com ampicilina, um clone recombinante, identificado por PCR de colônias, foi cultivado em meio LB para replicação de extração do plasmídeo recombinante. A clonagem foi confirmada por digestão enzimática do plasmídeo recombinante pSP64E/*srrA* com o enzima de restrição EcoRI, que possui dois locais de reconhecimento neste plasmídeo: antes do local de restrição SacI e no final da sequência clonada

(junto ao local de restrição BamHI). O padrão de restrição, identificado por eletroforese em gel de agarose dos produtos da digestão, mostrou ser composto por duas bandas que correspondem a fragmentos de DNA com aproximadamente 500 bp e 4100 bp, o que confirmou a correta clonagem do fragmento de DNA no plasmídeo pSP64E (Figura 15.B).

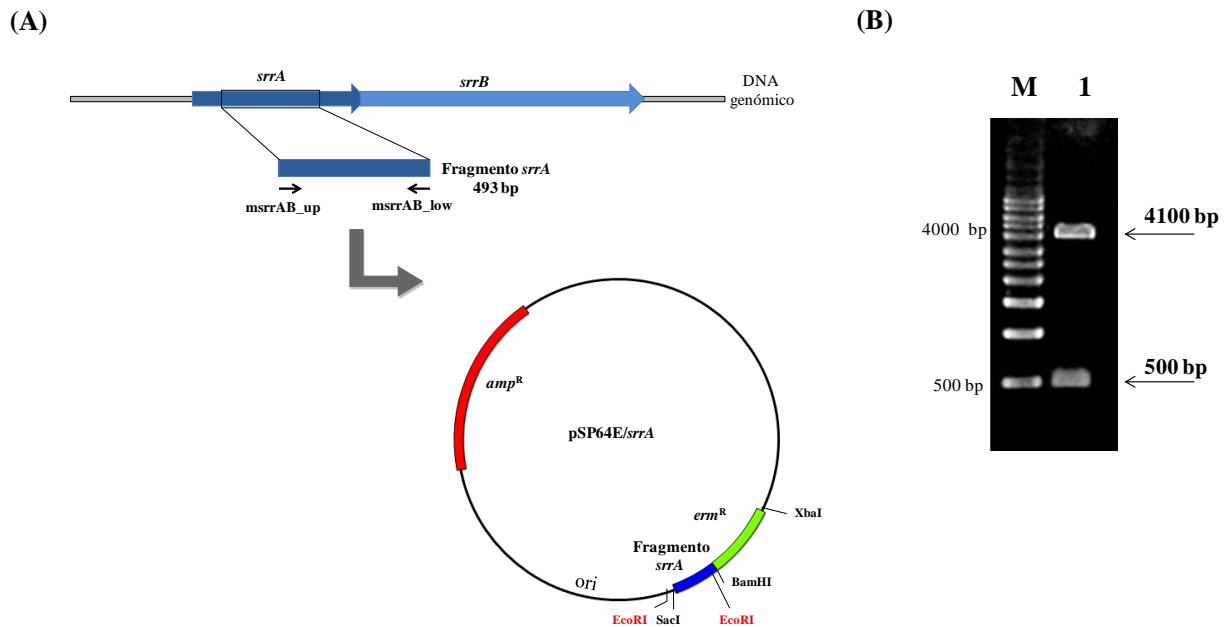


Figura 15: Esquema da construção do plasmídeo recombinante pSP64E/srrA. (A) O plasmídeo pSP64E/srrA foi construído amplificando um fragmento de DNA interno do gene *srrA* com os *primers* msrrAB_up e msrrAB_low e clonando este fragmento nos locais de restrição SacI e BamHI do plasmídeo pSP64E. (B) Da digestão do plasmídeo recombinante pSP64E/srrA com o enzima EcoRI resultaram dois fragmentos de DNA com aproximadamente 500 bp e 4100 bp (1), o que confirmou que este plasmídeo continha o fragmento do gene *srrA* clonado no local pretendido. M – marcador 1 kpb da Roht

Por fim, o plasmídeo recombinante foi introduzido em células de *S. aureus* RN4220 competentes. Esta é uma estirpe derivada de *S. aureus* NCTC8325 que tolera DNA exógeno. A introdução do plasmídeo nestas células de *S. aureus* foi conseguida por eletroporação de 100 µL células eletrocompetentes com 60 a 80 µg de plasmídeo recombinante pSP64E/srrA. No interior das células de *S. aureus*, o plasmídeo tenderá a integrar-se no seu DNA genômico através de um evento de recombinação por homologia, dividindo assim o gene *srrA* em duas partes incompletas e não funcionais. Como os genes *srrA* e *srrB*, que codificam os dois componentes que compõem o sistema de regulação constituem um operão, a disrupção do primeiro gene (*srrA*) impossibilitará também a expressão do segundo gene (*srrB*) (Figura 16).

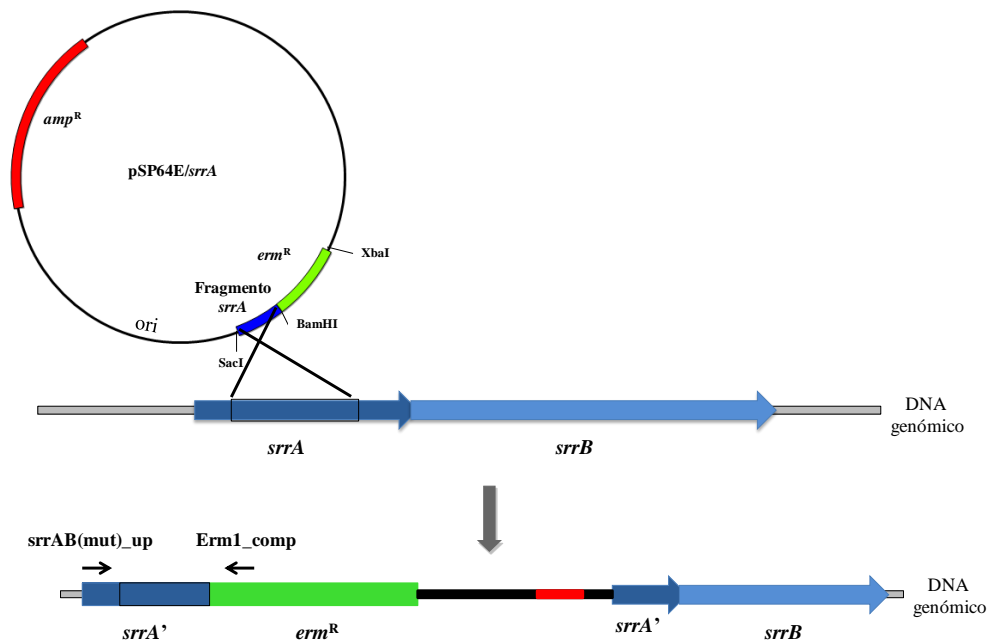


Figura 16: Representação esquemática do processo de mutação do gene *srrA* por integração do plasmídeo pSP64E/*srrA*. Após introdução do plasmídeo recombinante em células de *S. aureus* por eletroporação o plasmídeo é integrado no DNA genômico através de um evento de recombinação por homologia. No caso de a recombinação ser bem-sucedida o gene *srrA* é interrompido por um gene de resistência à eritromicina e o operão *srrAB* silenciado. Os primers *srrAB*(mut)_up e *Erm1_comp* (representados por setas a preto) foram usados na análise por PCR do DNA genômico dos potenciais clones de *S. aureus* mutantes (clone que apresentaram resistência à eritromicina após eletroporação) para confirmação da presença da mutação pretendida.

O plasmídeo pSP64E é um plasmídeo que não se replica em *S. aureus*, ou seja, um plasmídeo suicida. Assim, apenas as células em que ocorre a integração do DNA plasmídico no genoma é que conservam o gene de resistência à eritromicina e adquirem a capacidade de crescerem em meio suplementado com este antibiótico. Deste modo foi feita a seleção das células de *S. aureus* eletrotransformadas com o plasmídeo pSP64E/*srrA*. Por sua vez, o genoma das colónias resistentes foi analisado por PCR com o *primer* *srrAB*(mut)_up, que emparelha no início no gene *srrA* e fora da região amplificada e clonada no plasmídeo, e o *primer* *Erm1_comp*, que emparelha no início do gene de resistência à eritromicina (Figura 16). Um fragmento de DNA amplificado com estes *primers*, contendo aproximadamente 830 bp seria indicativo de que a integração do plasmídeo havia ocorrido no local pretendido, interrompendo o gene *srrA*, e não num local inespecífico do genoma. Na tentativa de obter uma colónia de *S. aureus* RN4220 em que o processo de silenciamento do gene tivesse ocorrido corretamente, foram realizadas diversas eletrotransformações independentes e analisadas dezenas de colónias resistentes a eritromicina. Contudo, em nenhuma das colónias analisadas se confirmou a presença da mutação pretendida.

A extensão da região de homologia necessária para que ocorra a recombinação entre o DNA plasmídico e cromossomal é um dos fatores limitantes à eficiente integração do plasmídeo. Neste caso

foi apenas possível utilizar uma região de homologia de 493 bp. Já em anteriores estudos, onde mutações em *S. aureus* foram conseguidas usando a mesma estratégia, as regiões de homologias eram consideravelmente maiores (por exemplo, 0,8 kb e 1,4 kb) [84, 91]. Assim, concluímos que, apesar de possível, não ocorre integração nestas condições.

Deste modo, uma segunda estratégia de mutação foi considerada para o silenciamento dos genes *srrAB*, utilizando o plasmídeo pMAD. Este plasmídeo permite a criação de mutações não polares em *S. aureus* por eventos de recombinação homóloga do plasmídeo com o DNA genômico. O desenho deste plasmídeo permite que a mutação de um gene seja feita por recombinação com sequências homólogas à região que ladeia o mesmo. Deste modo, a extensão dessas sequências não é diretamente dependente do tamanho do gene, pelo que nos permite utilizar regiões consideravelmente maiores do que a região utilizada com o plasmídeo pSP64E.

pMAD é um plasmídeo *shuttle*, pelo que possui uma origem de replicação em *E. coli* (codificada pelo gene *pBR322*) e uma origem de replicação em *S. aureus* (codificada pelo gene *pE194^{ts}*), sendo esta última sensível à temperatura. Este é ainda composto por uma região que confere resistência a ampicilina (*amp^R*), reconhecida em *E. coli*, e uma região que confere resistência a eritromicina (*erm^R*) para permitir a seleção de transformantes em *S. aureus*. Adicionalmente, o plasmídeo pMAD possui um gene *bgaB* que é expresso constitutivamente em *S. aureus* e que codifica uma β -galactosidase termoestável [85]. Quando expressa nas células, esta β -galactosidase hidrolisa o substrato X-gal, formando-se assim um pigmento que confere uma tonalidade azul às células (Figura 17).

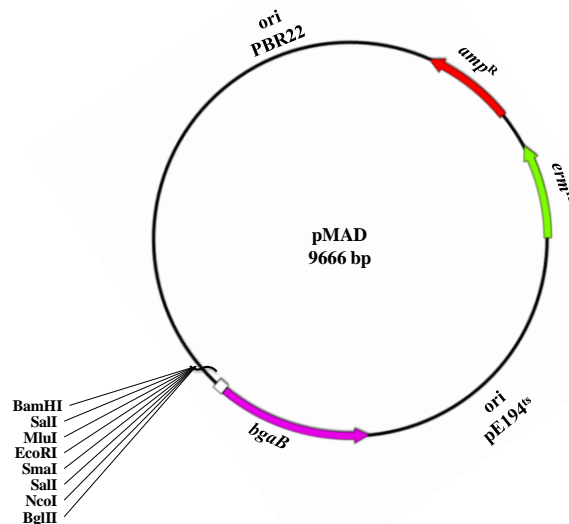


Figura 17: Mapa do plasmídeo pMAD. Este plasmídeo é composto por: duas origens de replicação, uma para replicação em *E. coli* (*ori PBR22*) e outra para *S. aureus* (*ori pE194^{ts}*); um gene de resistência a ampicilina para seleção em *E. coli* (*amp^R*); um gene de resistência a eritromicina para seleção em *S. aureus* (*erm^R*); um gene que codifica uma β -galactosidase para identificação de transformantes na presença de X-gal (*bgaB*); uma região *polylinker* com vários locais únicos de restrição para clonagem.

Usando este plasmídeo a estratégia de mutação de um gene de *S. aureus* passa pela clonagem, na região do *polylinker* do plasmídeo, de um fragmento de DNA composto por duas regiões homologas ao local onde pretendemos que ocorra a integração, intercaladas por um gene de resistência a um antibiótico que não a eritromicina. Um plasmídeo recombinante assim construído é depois introduzido em células de *S. aureus* RN4220 por electroporação, e os transformantes, cultivados a 30°C, selecionados em meio TSA suplementado com X-Gal, eritromicina e um segundo antibiótico para o qual o fragmento clonado no plasmídeo confere resistência. Uma das colónias que cresce nestas condições é inoculada em meio líquido e cultivada com agitação por um período inicial a 30°C aumentando depois a temperatura de incubação para 42°C. Com este aumento da temperatura para 42°C os plasmídeos recombinantes perdem a capacidade de replicação no interior das células de *S. aureus*. O inoculo é plaqueado em meio sólido suplementado apenas com o segundo antibiótico e X-gal e as colónias brancas que crescerem neste meio são testadas para aferir se são sensíveis ao antibiótico eritromicina. O objetivo é encontrar colónias em que tenham ocorrido dois eventos de recombinação, um primeiro evento em que todo o plasmídeo pMAD recombinante esteja introduzido no DNA cromossomal de *S. aureus* e um segundo evento de recombinação durante o qual ocorre a substituição da sequência do gene que pretendemos mutar pela sequência, clonada inicialmente no plasmídeo, que possui o gene alterado e não funcional (Figura 18). Durante este processo, a restante sequência do plasmídeo pMAD, que se encontrava integrado no genoma, é também eliminada, pelo que as colónias perdem a resistência à eritromicina e a coloração azul resultante da expressão da β -galactosidade. Tendo em conta estas características são selecionados os potenciais clones mutantes.

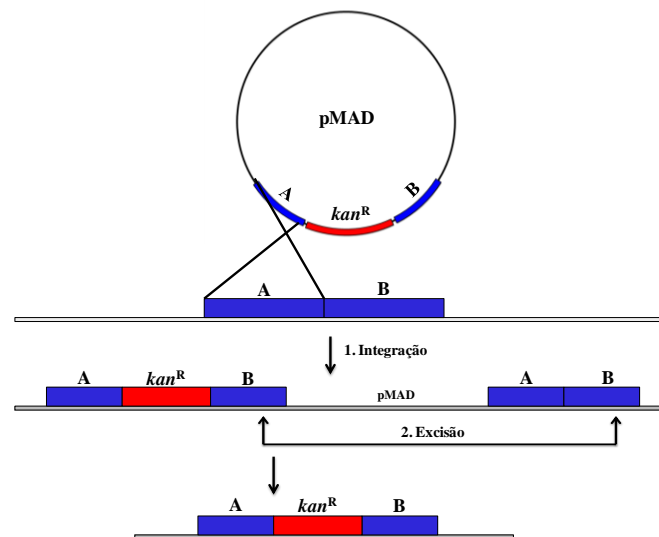


Figura 18: Representação esquemática dos dois eventos de recombinação que permitem a substituição de uma sequência funcional de um gene por uma sequência interrompida. Dois fragmentos de DNA, A e B, cada um incluindo cerca de metade do gene que se pretende silenciar, foram amplificados a partir de DNA genómico e clonados no plasmídeo pMAD com um gene de resistência ao antibiótico (por exemplo um gene de resistência à canamicina, *kan^R*). No interior das células de *S. aureus* o processo de mutação ocorrerá como consequência de dois eventos de recombinação por homologia. Num primeiro evento de recombinação entre as duas sequências homologas A levará à integração do plasmídeo na DNA genómico. Num segundo evento de recombinação entre as sequências B, ocorrerá excisão do DNA plasmídeo integrado e eliminação do gene funcional (A+B). Adaptado de [85]

Tendo em conta este método de mutação de genes de *S. aureus* usando o vetor pMAD, construiu-se um fragmento de DNA que permitisse o silenciamento do gene *srrA* por interrupção com um gene resistência à canamicina. Para isto, um fragmento de DNA de aproximadamente 2000 bp, incluindo a totalidade do gene *srrA* e sequências adjacentes foi amplificado por PCR e clonado nos locais de restrição BamHI e HindIII do vetor pUC18. Este plasmídeo recombinante foi posteriormente mutado por mutagênese sítio-específica (ver Métodos) de modo a gerar um local de restrição ClaI na região central da sequência do gene *srrA*. Por sua vez, neste local de restrição foi clonado um fragmento de DNA de aproximadamente 1500 bp codificando um gene que resistência à canamicina que é reconhecido em células de *S. aureus*. Este fragmento foi obtido por digestão do plasmídeo pDG782, um plasmídeo de replicação em *E. coli* que inclui o gene de resistência à canamicina clonado no local de restrição ClaI do seu *polylinker*. Deste modo foi construída uma sequência de DNA (*srrA/kan^R*), com aproximadamente 3500 bp, composto por dois segmentos homólogos à região do genoma que pretendemos mutar e um gene de resistência à canamicina, clonado entre esses dois segmentos. Por fim, esta sequência de DNA foi amplificada por PCR a partir do vetor recombinante pUC18/*srrA/kan^R* construído, para poder ser clonada no plasmídeo pMAD (Figura 19). Para isso, o plasmídeo pMAD, previamente digerido com o enzima SmaI, que origina extremidades cegas, foi incubado com o fragmento de DNA *srrA/kan^R* e enzima ligase. Esta mistura de ligação foi transformada em células de *E. coli* XL1-Blue e os transformantes, selecionados em meio LA suplementado com ampicilina, analisados por PCR de colônias. O plasmídeo extraído de um dos potenciais clones recombinantes foi sujeito a uma digestão enzimática com os enzimas Sall e NcoI para confirmação da presença do fragmento de DNA clonado. Estes enzimas possuem locais de restrição únicos no *polylinker* do plasmídeo pMAD, a montante e a jusante do local SmaI onde foi clonado o fragmento de DNA *srrA/kan^R*. Assim, confirmando-se a clonagem, seria esperado um padrão de restrição visível em gel de agarose com duas bandas de aproximadamente 3500 bp e 10000 bp, correspondentes ao fragmento de DNA clonado e ao plasmídeo, respetivamente.

Apesar de terem sido feitas várias tentativas de digestão de vários plasmídeos extraídos de diferentes colônias, até ao final deste estágio não foi possível identificar um clone em que os resultados das digestões enzimáticas confirmassem a ligação entre o fragmento *srrA/kan^R* e o plasmídeo pMAD. Os resultados das digestões ou eram inconclusivos, não sendo possível identificar a origem das bandas visíveis em gel de agarose, ou indicavam a presença de um vetor vazio. Sem este plasmídeo recombinante não foi possível avançar com os ensaios de eletroporação das células de *S. aureus* RN4220 para mutação do gene.

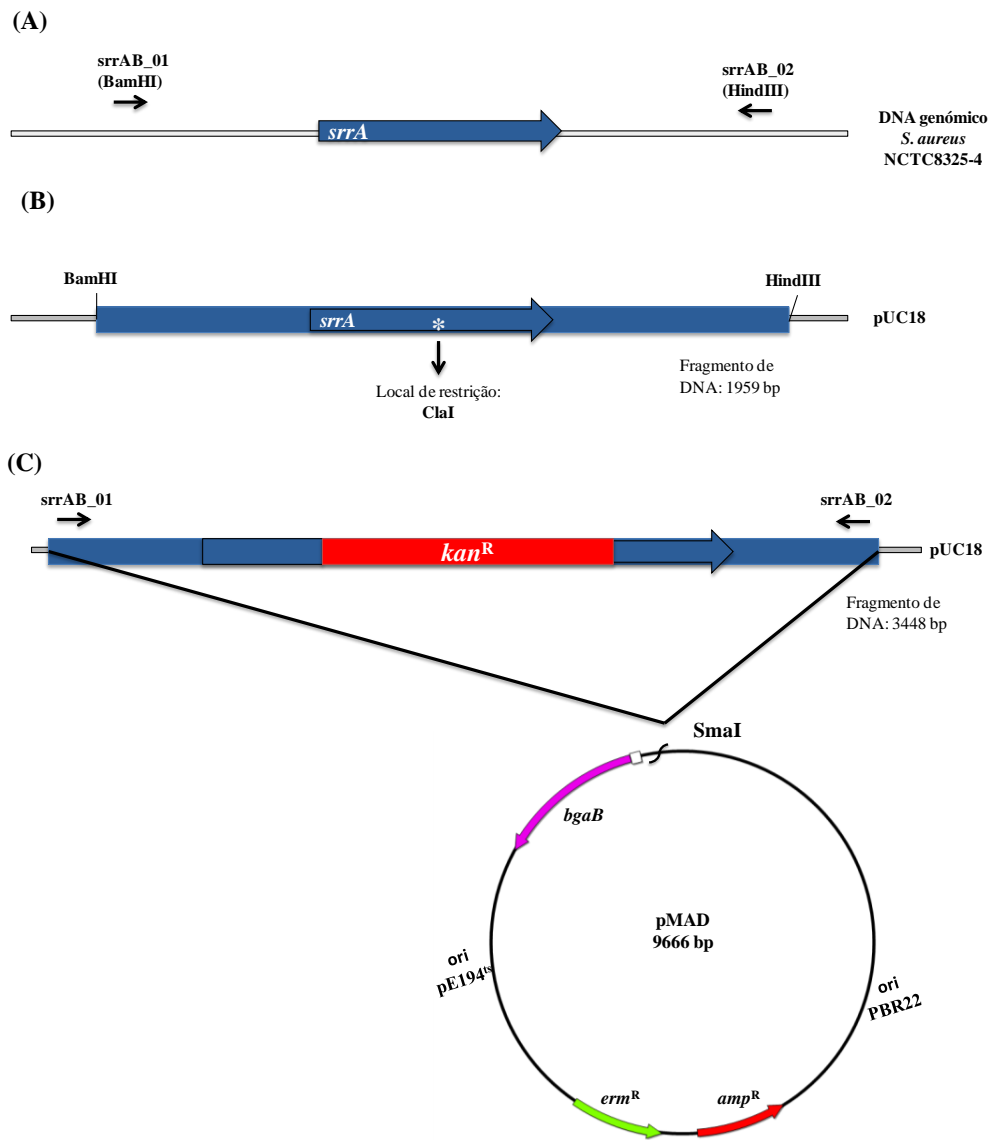


Figura 19: Esquema da estratégia usada na construção do plasmídeo recombinante pMAD/*srrA*. (A) Um fragmento de DNA de 1939 bp, incluindo a totalidade da sequência do gene *srrA* (726 bp), foi amplificado com os *primers* *srrAB_01* e *srrAB_02* que incluíam os locais de restrição BamHI e HindIII, respectivamente. (B) O fragmento foi depois clonado em pUC18 e mutado para criação de um local de restrição ClaI a meio do gene *srrA*. (C) Neste local de restrição foi clonada um gene de resistência a canamicina dividindo o fragmento inicial em duas partes iguais e interrompendo a sequência correspondente ao gene *srrA*. Este fragmento de aproximadamente 3500 bp foi posteriormente amplificado a partir do vetor pUC18 onde havia sido construído para clonagem no plasmídeo pMAD no local SmaI.

3. Silenciamento do gene *ric* de *S. aureus*

Com o objetivo de construir um mutante de *S. aureus* que não expresse a proteína de reparação de centros de ferro Ric, foram usadas as mesmas estratégias aplicadas no de silenciamento do gene *srrA*. Um mutante de *S. aureus* com o gene *ric* silenciado (Δric) permitiria avaliar a contribuição desta proteína para a capacidade de sobrevivência das bactérias de *S. aureus* no interior de macrófagos.

Para a mutação do gene *ric* foi usado o plasmídeo pSP64E/*ric*. Este foi construído por ligação de um fragmento interno do gene *ric*, com 495 bp de extensão, nos locais de restrição EcoRI e BamHI do plasmídeo pSP64E. Para isso, o plasmídeo pSP64E e o fragmento de DNA de *ric* foram ambos digeridos com os enzimas de restrição EcoRI e BamHI e incubados com ligase. Esta reação de ligação foi transformada em células *E. coli* XL1-Blue competentes e os transformantes selecionados em meio LA suplementado com ampicilina. O conteúdo genético das colônias resistentes foi analisado por PCR para identificação dos clones recombinantes. A partir de um dos clones recombinantes identificados foi extraído plasmídeo, que por sua vez foi digerido para confirmação da ligação, com os enzimas EcoRI e SalI que ladeiam as sequências do gene *ric* e do gene de resistência à eritromicina (*erm^R*). (Figura 20.A) O padrão de restrição que confirmou a clonagem correta do plasmídeo recombinante pSP64E/*ric* inclui duas bandas visíveis em gel de agarose correspondentes a fragmentos de DNA com aproximadamente 1700 bp (tamanho total do gene *ric* e do gene *erm^R*) e 3000 bp (restante plasmídeo pSP64E) (Figura 20.B).

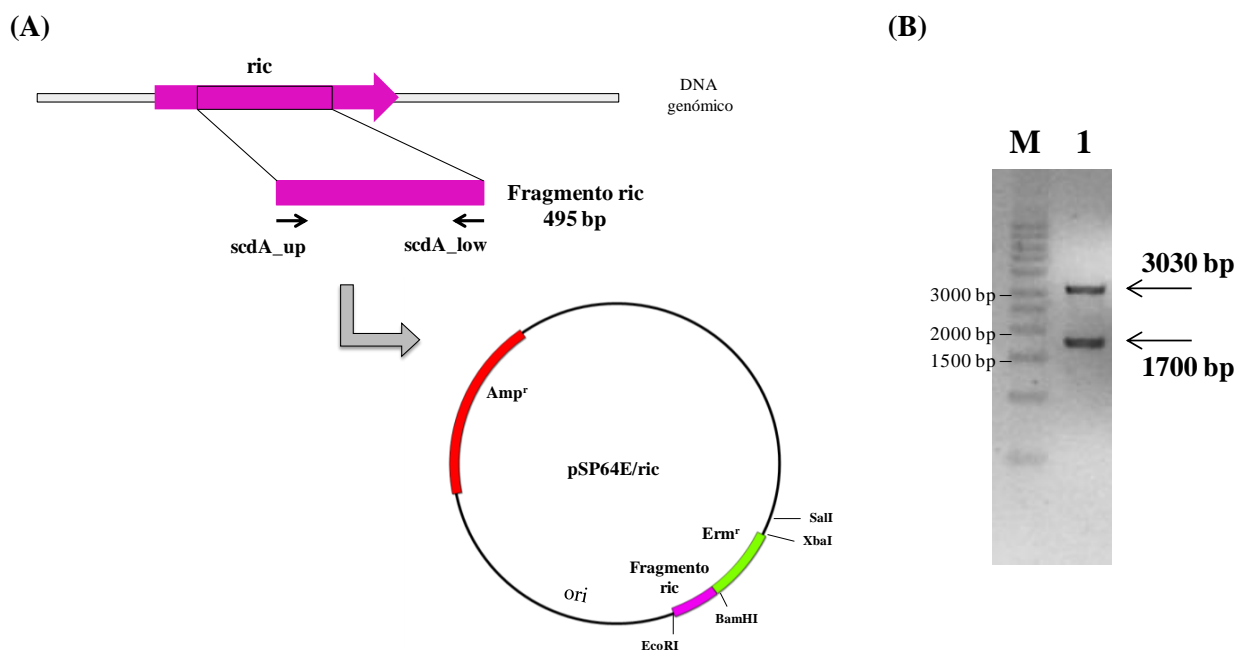


Figura 20: Esquema da primeira estratégia usada para silenciamento do gene *ric*. (A) O plasmídeo pSP64E/*ric* foi construído amplificando um fragmento de DNA interno do gene *ric* com os primers *scdA_up* e *scdA_low* e clonando este fragmento de DNA nos locais de restrição EcoRI e SalI do plasmídeo pSP64E. (B) A correta clonagem do plasmídeo pSP64E/*ric* foi confirmada por digestão enzimática com os enzimas EcoRI e SalI cujos locais relativos de restrição se encontram assinalados na figura. Desta digestão resultaram dois fragmentos de DNA (duas bandas visíveis em gel de agarose) com aproximadamente 1700 bp e 3100 bp.

Células de *S. aureus* RN4220 competentes foram eletroporadas com 60 a 80 µg do plasmídeo recombinante pSP64E/*ric* e selecionadas em meio TSA suplementado com eritromicina. Apenas as células em que ocorre integração do plasmídeo recombinante no seu genoma ganham resistência ao antibiótico eritromicina. Para identificação dos clones em que a integração do plasmídeo no genoma havia interrompido, e conseqüentemente silenciado, o gene *ric*, o genoma dos clones resistentes foi analisado por PCR com os *primers* *scdA_cmut* e *Erm1_comp* (Figura 21). Várias dezenas de colônias foram analisadas, contudo não foi encontrado um clone em que se confirmasse a mutação do gene *ric*.

O fragmento do gene *ric* amplificado para clonagem no plasmídeo pSP64E/*ric* possuía 500 bp sendo este o tamanho máximo de homologia que podíamos usar, uma vez que no total o gene *ric* apenas possui 675 bp. A sua pequena extensão do fragmento de DNA usado poderá ter sido a causa da incapacidade do plasmídeo recombinante se integrar no local pretendido.

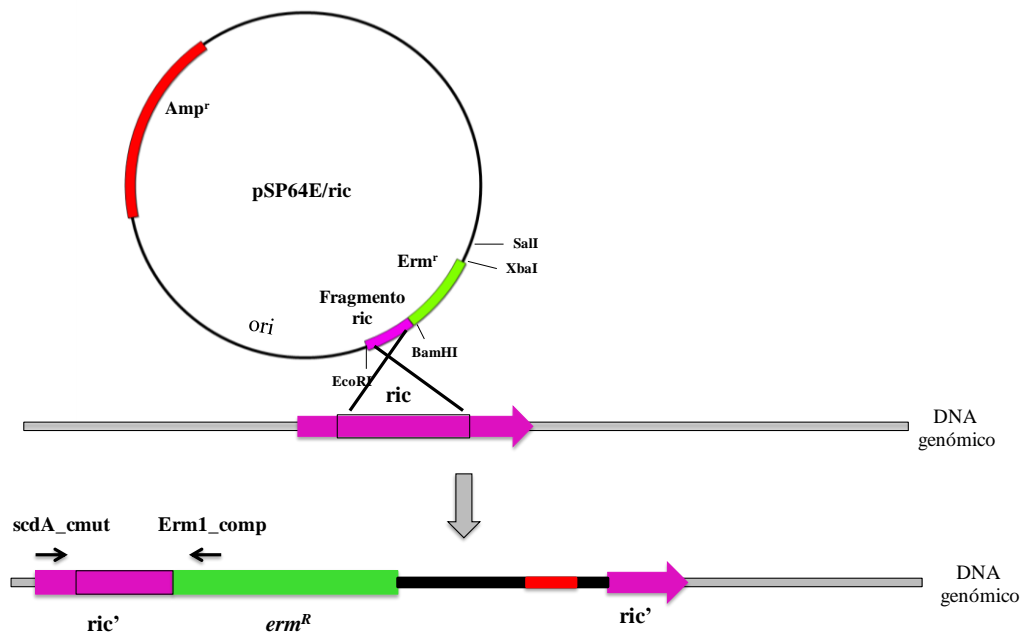


Figura 21: Representação esquemática do processo de mutação do gene *ric* por integração do plasmídeo recombinante pSP64E/*ric*. Após introdução do plasmídeo recombinante em células de *S. aureus* por eletroporação, o plasmídeo integra no DNA genômico através de um evento de recombinação por homologia. Uma vez ocorrendo a recombinação o gene *ric* fica interrompido por um gene de resistência à eritromicina. Os *primers* *scdA_cmut* e *Erm1_comp* (representados por setas a preto) foram usados para analisar por PCR quais dos clones resistentes à eritromicina possuíam o plasmídeo integrado no local pretendido, interrompendo o gene *ric*.

Na segunda estratégia desenhada para o silenciamento do gene *ric* de *S. aureus* foi utilizado o plasmídeo pMAD. Para isso foi construído um fragmento de DNA no qual o gene *ric* se encontra interrompido por um gene de resistência à canamicina. Esta construção foi realizada inicialmente no

vetor pUC18 e só depois transferida para o plasmídeo pMAD. Assim, um fragmento de DNA com uma extensão de 2000 bp, que inclui a totalidade do gene *ric*, foi amplificado por PCR a partir de DNA genómico de *S. aureus* NCTC 8325 com os *primers* *scdA_01* e *scdA_02* que possuem locais de restrição BamHI e HindIII, respetivamente. O fragmento de DNA amplificado foi digerido e clonado no vetor pUC18, previamente clivado com os mesmo enzimas de restrição. O vetor recombinante pUC18/*ric* originado foi modificado por mutagénese sítio-específica de modo a criar um local de restrição ClaI aproximadamente a meio do gene *ric* (ver Métodos). Confirmada a presença deste local de restrição, por sequenciação, o plasmídeo foi digerido e ligado a um fragmento de DNA de 1500 bp que codifica um gene de resistência à canamicina (*kan^R*) reconhecido em células de *S. aureus*. Por fim, esta construção com 3500 bp foi amplificada por PCR a partir do vetor recombinante pUC18/*ric/kan^R* com o objetivo de ser clonado no local de restrição SmaI do plasmídeo final pMAD, através de uma ligação entre por extremidades cegas (Figura 22). As reações de ligação entre pMAD e o fragmento *ric/kan^R* foram transformadas em células de *E. coli* XL1-Blue e os potenciais clones recombinantes foram identificadas por análise das colónias resistentes à ampicilina. Os plasmídeos extraídos destes clones foram digeridos com os enzimas Sall e NcoI, para confirmação da clonagem pretendida. Confirmando-se a clonagem, a restrição do plasmídeo recombinante resultaria em dois fragmentos de DNA com aproximadamente 3500 bp, correspondente ao fragmento *ric/kan^R*, e 10000 bp, correspondente ao plasmídeo pMAD. Apesar de terem sido realizadas várias tentativas, a ligação pMAD/*ric/kan^R* não foi alcançada, pelo que não foi possível avançar com os ensaios de eletroporação para mutação do gene *ric*.

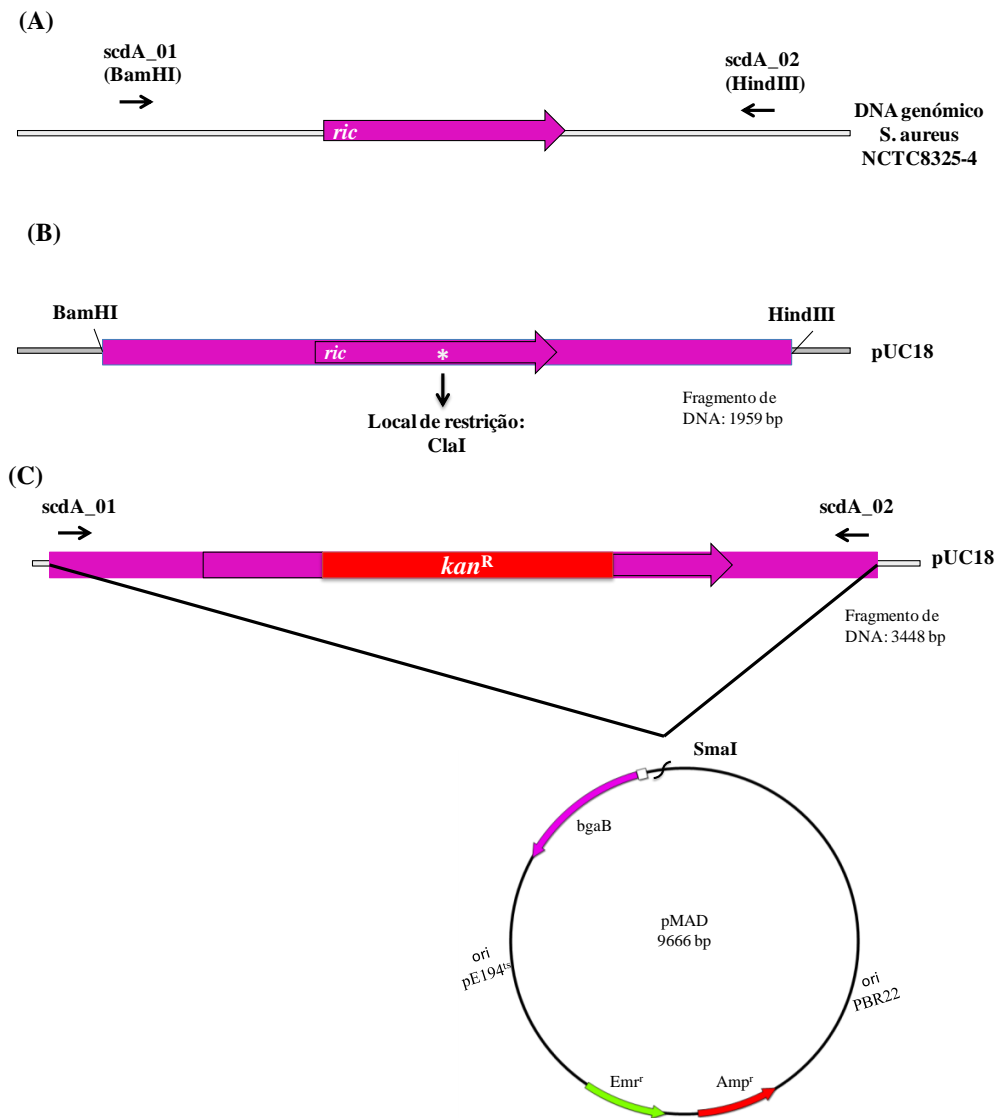


Figura 22: Esquema dos procedimentos usados na construção do plasmídeo pMAD/ric. (A) Um fragmento de DNA de 1959 bp, incluindo a totalidade do gene *ric* (675 bp), foi amplificado por PCR com os *primers* *scdA_01* e *scdA_02* que continham sequência correspondentes aos locais de restrição BamHI e HindIII, respectivamente. (B) O fragmento amplificado foi clonado em pUC18 e modificado por mutagênese dirigida para criação de um local de restrição ClaI a meio do gene *ric*. (C) No local de restrição ClaI foi clonada um gene de resistência à canamicina, que deste modo divide o gene *ric*. Por sua vez, este fragmento de DNA final foi amplificado por PCR no local de restrição SmaI do plasmídeo pMAD.

4. Níveis de expressão do gene *ric*

Os reguladores PerR e Fur de *S. aureus* possuem um papel central no controlo da expressão de um conjunto diversificado de proteínas envolvidas no combate ao *stress* oxidativo e de manutenção dos níveis intracelulares de ferro [73, 76]. Já a proteína Ric faz parte da rede proteica que combate os efeitos nocivos do *stress* oxidativo e nitrosativo, uma vez que se sabe estar envolvida na reparação de centros de ferro-enxofre, danificados por espécies reativas de oxigénio e azoto, que compõem enzimas importantes para a sobrevivência celular de *S. aureus* [67].

Para avaliar se os reguladores Fur e PerR estariam envolvidos no controlo da expressão do gene que codifica a proteína Ric determinaram-se os níveis de transcrito do mesmo expressos em estirpes de *S. aureus* mutadas nos genes *fur* e *perR*, nomeadamente, *S. aureus* MJH010 (Δfur) e de *S. aureus* MJH001 ($\Delta perR$).

4.1 Confirmação das mutações das estirpes em estudo

Para confirmar que as células de *S. aureus* Δfur e $\Delta perR$ que íamos usar no nosso estudo possuíam efetivamente as mutações que silenciam os genes *fur* e *perR*, o DNA genómico de cada estirpe foi analisado por PCR. Os *primers* utilizados nesta análise foram desenhados tendo em conta a descrição das mutações que haviam sido realizadas pelo laboratório que gentilmente cedeu estas estirpes (Figura 23) [73, 76]. No caso da estirpe de *S. aureus* Δfur , o gene *fur* foi substituído por um gene de resistência à tetraciclina. Para confirmar a presença desta mutação foram usados *primers* OL30(*fur*) e OL31(*fur*) que emparelham a montante e a jusante do local em que o gene de resistência foi inserido de modo a silenciar o gene. Deste modo, a ausência do gene *fur* no genoma da estirpe de *S. aureus* Δfur foi confirmada pela amplificação de fragmento de DNA com uma extensão aproximada de 1600 bp (Figura 24.A). Caso não se confirmasse esta mutação o fragmento amplificado teria uma extensão aproximada de 450 bp.

Já na estirpe de *S. aureus* $\Delta perR$, o gene *perR* encontra-se silenciado por interrupção do mesmo com um gene de resistência à canamicina. A presença deste gene foi confirmada com recurso aos *primers* que emparelham a 1100 bp a montante do gene de resistência (*primer* perR_OL7) e a 800 bp após o início do mesmo (*primer* kan_comp). A amplificação de uma fragmento de DNA, a partir do DNA genómico desta estirpe, com uma extensão de 1900 bp confirmou que o gene *perR* se encontrava efetivamente interrompido (Figura 24.B).

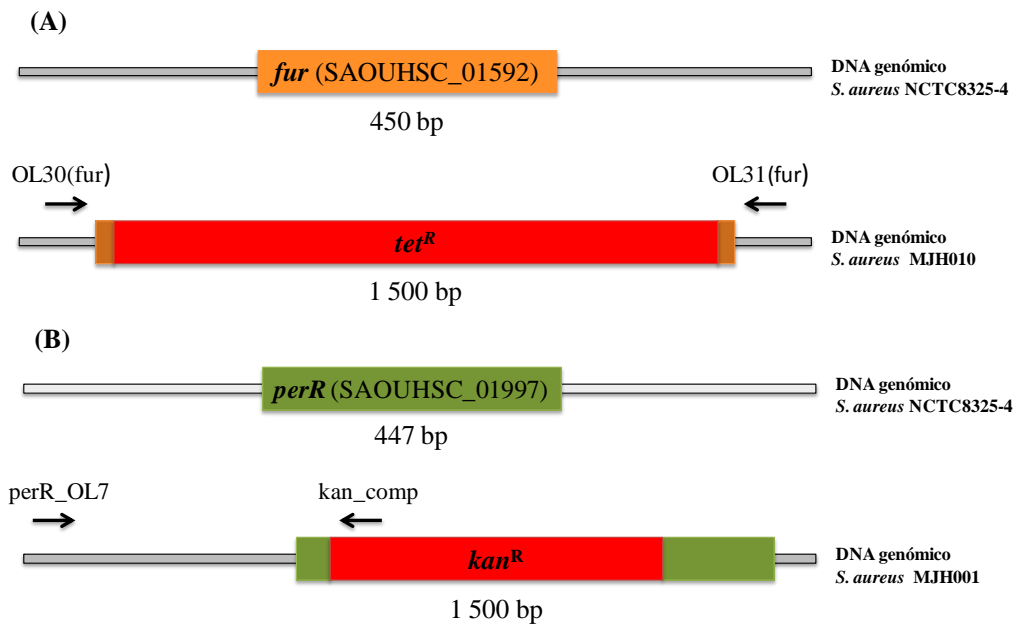


Figura 23: Esquema das mutações de silenciamento dos genes *fur* e *perR*. (A) Na estirpe de *S. aureus* MJH010 a sequência do gene *fur* foi substituído por um gene de resistência à tetraciclina. A posição relativa dos primers OL30(*fur*) e OL31(*fur*) usados na confirmação da mutação por PCR é representada por setas. (B) A estirpe MJH001 possui o gene *perR* interrompido por um gene de resistência à canamicina. Esta mutação foi confirmada com recurso aos primers perR_OL7 e kan_comp que são representados por setas na sua posição relativa.

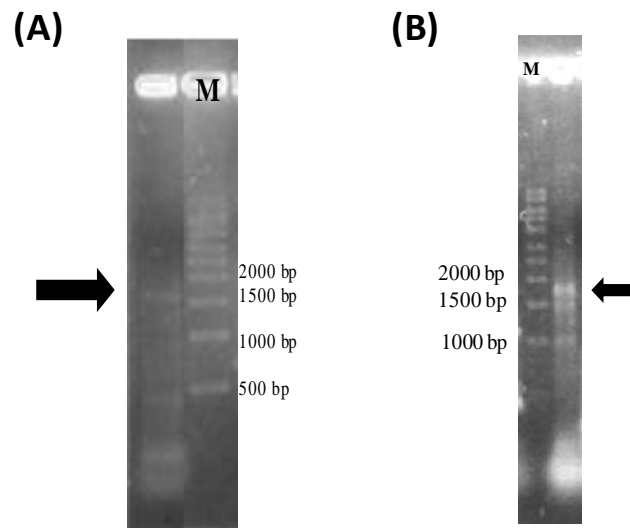


Figura 24: Fragmentos de DNA amplificados por PCR que confirmam a mutação dos genes *fur* e *perR* nas estirpes de *S. aureus* MJH010 e MJH001, respetivamente. (A) Fragmento de DNA com uma extensão de 1600 bp, amplificado usando os primers OL30(*fur*) e OL31(*fur*) a partir do DNA genômico da estirpe de *S. aureus* Δfur e que confirma a presença da mutação do gene *fur* nas células testadas desta estirpe. (B) Fragmento de DNA com uma extensão de 1900 bp, amplificado usando os primers OL7_perR e kan_comp a partir do DNA genômico da estirpe de *S. aureus* $\Delta perR$ e que confirma a presença da mutação do gene *perR* nas células testadas desta estirpe. Marcador de DNA 1 kbp, M.

4.2 Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Para avaliar se os reguladores Fur e PerR de *S. aureus* controlam a expressão do gene que codifica a proteína Ric, os níveis de transcritos expressos nas células de *S. aureus* Δfur e de *S. aureus* $\Delta perR$, foram qualitativamente quantificados por RT-PCR e comparados com os níveis de mRNA expressos em *S. aureus* de estirpe selvagem. Para tal, uma amostra de 2 μ g de RNA total, extraído das células de cada estirpe de *S. aureus* em estudo, foi convertida em cDNA com recurso ao enzima transcriptase reverse. Por sua vez, o cDNA sintetizado foi usado como cadeia molde numa reação de PCR usando os *primers* *scdA_up* e *scdA_down*, complementares à sequência de nucleótidos do gene *ric*, para deteção da quantidade de transcrito deste gene presente em cada uma das amostras em análise. Os produtos de PCR resultantes foram analisados por eletroforese em gel de agarose e a intensidade das bandas comparadas. Em todas as reações foram usados 2 μ g de RNA total de forma a garantir que estão em comparação iguais quantidades de RNA total. Como controlo também foram determinados os níveis de transcrito do gene *rRNA 16S*, cuja expressão em *S. aureus* nunca varia, independentemente das condições de crescimento usadas ou da estirpe em estudo [92]. A integridade de todas as amostras de RNA total utilizadas foi primeiro confirmada por eletroforese em gel de agarose. Apenas as amostras que apresentaram duas bandas bem definidas (sinal de ausência de RNA degradado), que correspondem às subunidades ribossomais 23S e 18S, foram utilizadas nos ensaios (Figura 25). A pureza das amostras de RNA, no que diz respeito a contaminantes proteicos, foi determinada num espectrofotómetro Nanodrop por determinação da razão entre as absorvâncias das amostras de RNA a 260 nm e 280 nm (A_{260}/A_{280}). As amostras foram consideradas puras sempre que apresentaram uma razão A_{260}/A_{280} entre 1,9 e 2,1.

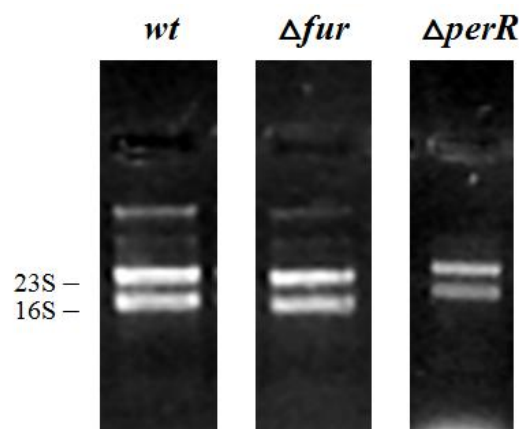


Figura 25: Confirmação da integridade das amostras de RNA total por eletroforese em gel de agarose 1%. RNA total isolado de células de *S. aureus* da estirpe selvagem (*wt*) *S. aureus* Δfur e *S. aureus* $\Delta perR$. As duas bandas bem definidas, correspondentes às subunidades ribossomais 23S e 16S, são indicativas da total integridade das moléculas de RNA

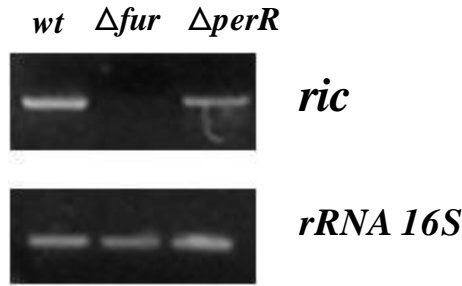


Figura 26: O gene *ric* é regulado positivamente pelos fatores de transcrição Fur e PerR. Em células da estirpe de *S.aureus* Δfur , não foram detetados transcritos do gene *ric*. Já em células que não expressam o regulador PerR, células de *S. aureus* $\Delta perR$, os níveis de transcrito do gene *ric* são menores relativamente ao observado na estirpe selvagem (*wt*). A diminuição, em ambos os casos, nos níveis de mRNA detectados são indicativos de que tanto o regulador Fur com o PerR regulam positivamente a expressão do gene *ric*. O uso de iguais quantidades de RNA total nos ensaios de RT-PCR foi confirmado pela igual intensidade das bandas relativas ao gene *16S rRNA* (painel inferior). Estes dados são representativos das reações realizadas com duas amostras de RNA independentes.

Na estirpe selvagem de *S. aureus* foi detetado um nível considerável de transcrição do gene *ric*, que sofre uma diminuição na ausência do regulador PerR. Já em células de *S. aureus* Δfur não são detetados transcritos de *ric*. Estes resultados são indicativos de que ambos os reguladores Fur e PerR, atuam como indutores da transcrição do gene que codifica a proteína de reparação de centros de ferros Ric (Figura 26).

Os reguladores Fur e PerR podem controlar a expressão de genes de um modo directo, ligando-se a elementos específicos da sequência de nucleótido da região promotora (os chamados motivos de ligação) promovendo ou impedindo a leitura do gene, ou de modo indirecto por intermédio da regulação de outro genes [93]. A análise da região a montante do gene *ric* revelou potenciais locais de ligação para ambos os reguladores, confirmando em *S. aureus* que a transcrição do gene *ric* é regulada pelas proteínas Fur e PerR (Figura 27).



Figura 27: Identificação de potenciais locais de ligação dos reguladores Fur e PerR a montante do gene *ric*. (A) Motivo de ligação do regulador Fur e correspondente região putativa de ligação presente na sequência de - 782 a - 755 a montante do gene *ric*. (B) Motivo de ligação do regulador PerR e correspondente região de putativa de ligação presente na sequência - 470 a - 445 a montante do gene *ric*. A vermelho são indicadas as bases de nucleótidos, das sequências a montante do gene, coincidentes com a sequência dos motivos de ligação dos reguladores Fur e PerR de *S. aureus* descritos na base de dados RegPrecise.

Curiosamente, o tipo de regulação exercida sobre o gene *ric* de *S. aureus* pela proteína Fur é oposto ao que foi observado para a regulação do gene *ric* (*ytfe*) de *E. coli*, que codifica uma proteína homóloga. Em *E. coli*, o regulador Fur atua como repressor sobre a transcrição do gene *ric* e pensa-se que a regulação seja feita de um modo indireto, um vez que a região promotora a montante do gene não revelou potenciais locais de ligação para este regulador [68]. Este tipo de diferenças no modo de regulação de genes que codificam proteínas com propriedades semelhantes, não é incomum entre diferentes famílias de bactérias.

Conclusão

Conclusão

Este projeto visou testar vários fatores de transcrição como possíveis reguladores da expressão da proteína Ric de *S. aureus*.

Para avaliar se o sistema de regulação SrrAB, muitas vezes associado com a regulação de genes induzidos pela exposição a NO, estaria envolvido no controlo da expressão do gene *ric* foram aplicadas duas metodologias diferentes – utilizando os plasmídeo pSP64E e pMAD – de modo a obter uma estirpe de *S. aureus* mutante com o operão *srrAB* silenciado. Apesar das várias tentativas realizadas, até ao final deste estágio a estirpe mutada não foi obtida. Os mesmos métodos foram em paralelo aplicados na tentativa de mutação do gene *ric*, mas também neste caso o silenciamento do gene não foi conseguido.

Através da análise dos níveis de expressão do gene *ric* em estirpe mutantes de *S. aureus* Δfur e $\Delta perR$, foi avaliado se os reguladores Fur e PerR controlavam a transcrição deste gene. Para isso, os níveis de transcrito do gene *ric* foram determinados através de ensaio semiquantitativos de RT-PCR, tendo sido observados que quer na ausência do regulador Fur, quer na ausência do regulador PerR os níveis de mRNA de *ric* eram menores do que na estirpe selvagem. Estes resultados permitiram-nos concluir que ambos os reguladores controlam positivamente a expressão deste gene.

Finalmente, durante a tentativa de encontrar em *S. aureus* uma proteína homóloga do regulador NsrR, conhecido por controlar respostas a *stress* nitrosativo, foi detetado um erro na sequência do gene que codifica a proteína hipotética SAOUHSC_01732 descrito na base de dados do genoma da estirpe de *S. aureus* NCTC8325. Esta sequência possui mais um nucleótido de adenina do que na sequência real determinada por sequenciação do locus deste gene. Estes resultados foram enviados para o laboratório responsável pela sequenciação deste genoma para que fosse feita a correção.

Bibliografia

1. Haghkhah, M., *Study of virulence factors of Staphylococcus aureus*, in *Division of Infection & Immunity* 2003, University of Glasgow.
2. Liu, G.Y., et al., *Staphylococcus aureus golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity*. *J Exp Med*, 2005. **202**(2): p. 209-15.
3. Somerville, G.A. and R.A. Proctor, *The Biology of Staphylococci*, in *Staphylococci in Human Disease* 2009, Wiley-Blackwell. p. 1-18.
4. Shulman, J.A. and A.J. Nahmias, *Staphylococcal infections: clinical aspects*, in *The Staphylococci* 1972, Wiley: New York. p. 457-482.
5. Chambers, H.F., *The changing epidemiology of Staphylococcus aureus?* *Emerg Infect Dis*, 2001. **7**(2): p. 178-82.
6. Jevons, M.P., "*Celbenin*"-resistant *Staphylococci*. *BMJ*, 1961. **1**(5219): p. 113-114.
7. Hiramatsu, K., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical strain with reduced vancomycin susceptibility*. *J Antimicrob Chemother*, 1997. **40**(1): p. 135-6.
8. Ben Zakour, N.L., C.M. Guinane, and J.R. Fitzgerald, *Pathogenomics of the staphylococci: insights into niche adaptation and the emergence of new virulent strains*. *FEMS Microbiol Lett*, 2008. **289**(1): p. 1-12.
9. Meyer, J., *Iron-sulfur protein folds, iron-sulfur chemistry, and evolution*. *J Biol Inorg Chem*, 2008. **13**(2): p. 157-70.
10. Lill, R., *Function and biogenesis of iron-sulphur proteins*. *Nature*, 2009. **460**(7257): p. 831-8.
11. Imsande, J., *Iron-sulfur clusters: Formation, perturbation, and physiological functions*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 1999. **37**(2): p. 87-97.
12. Johnson, D.C., et al., *Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters*. *Annu Rev Biochem*, 2005. **74**: p. 247-81.
13. Beinert, H. and P.J. Kiley, *Fe-S proteins in sensing and regulatory functions*. *Curr Opin Chem Biol*, 1999. **3**(2): p. 152-7.
14. Lehninger, A.L., D.L. Nelson, and M.M. Cox, *Lehninger principles of biochemistry*. 5th ed 2008, New York: W.H. Freeman.
15. Gaudu, P., N. Moon, and B. Weiss, *Regulation of the soxRS oxidative stress regulon. Reversible oxidation of the Fe-S centers of SoxR in vivo*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(8): p. 5082-6.
16. Outten, F.W., *Iron-sulfur clusters as oxygen-responsive molecular switches*. *Nat Chem Biol*, 2007. **3**(4): p. 206-7.
17. Kiley, P.J. and H. Beinert, *Oxygen sensing by the global regulator, FNR: the role of the iron-sulfur cluster*. *FEMS Microbiol Rev*, 1998. **22**(5): p. 341-52.
18. Beinert H., K.M.C., Stout C.D., *Aconitase as iron-sulfur protein, enzyme, and iron-regulatory protein*. *Chemical Reviews*, 1996(96): p. 2335-2373.
19. Rouault, T.A., *The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease*. *Nat Chem Biol*, 2006. **2**(8): p. 406-14.
20. Beinert, H., R.H. Holm, and E. Munck, *Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures*. *Science*, 1997. **277**(5326): p. 653-9.
21. Kuo, C.F., et al., *Crystallization and crystallographic characterization of the iron-sulfur-containing DNA-repair enzyme endonuclease III from Escherichia coli*. *J Mol Biol*, 1992. **227**(1): p. 347-51.
22. Malkin, R. and J.C. Rabinowitz, *The reconstitution of clostridial ferredoxin*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1966. **23**(6): p. 822-7.
23. Jacobson, M.R., et al., *Biochemical and genetic analysis of the nifUSVWZM cluster from Azotobacter vinelandii*. *Mol Gen Genet*, 1989. **219**(1-2): p. 49-57.
24. Frazzon, J. and D.R. Dean, *Formation of iron-sulfur clusters in bacteria: an emerging field in bioinorganic chemistry*. *Curr Opin Chem Biol*, 2003. **7**(2): p. 166-73.
25. Tokumoto, U., et al., *Interchangeability and distinct properties of bacterial Fe-S cluster assembly systems: functional replacement of the isc and suf operons in Escherichia coli with the nifSU-like operon from Helicobacter pylori*. *J Biochem*, 2004. **136**(2): p. 199-209.
26. Huet, G., M. Daffe, and I. Saves, *Identification of the Mycobacterium tuberculosis SUF machinery as the exclusive mycobacterial system of [Fe-S] cluster assembly: evidence for its implication in the pathogen's survival*. *J Bacteriol*, 2005. **187**(17): p. 6137-46.

27. Takahashi, Y. and U. Tokumoto, *A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids*. J Biol Chem, 2002. **277**(32): p. 28380-3.
28. Outten, F.W., O. Djaman, and G. Storz, *A suf operon requirement for Fe-S cluster assembly during iron starvation in Escherichia coli*. Mol Microbiol, 2004. **52**(3): p. 861-72.
29. Zheng, L., et al., *Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(7): p. 2754-8.
30. Zheng, L., et al., *Mechanism for the desulfurization of L-cysteine catalyzed by the nifs gene product*. Biochemistry, 1994. **33**(15): p. 4714-20.
31. Schwartz, C.J., et al., *The cysteine desulfurase, IscS, has a major role in in vivo Fe-S cluster formation in Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(16): p. 9009-14.
32. Layer, G., et al., *Iron-sulfur cluster biosynthesis: characterization of Escherichia coli CYaY as an iron donor for the assembly of [2Fe-2S] clusters in the scaffold IscU*. J Biol Chem, 2006. **281**(24): p. 16256-63.
33. Ollagnier-de-Choudens, S., et al., *Iron-sulfur cluster assembly: characterization of IscA and evidence for a specific and functional complex with ferredoxin*. J Biol Chem, 2001. **276**(25): p. 22604-7.
34. Agar, J.N., et al., *IscU as a scaffold for iron-sulfur cluster biosynthesis: sequential assembly of [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters in IscU*. Biochemistry, 2000. **39**(27): p. 7856-62.
35. Krebs, C., et al., *IscA, an alternate scaffold for Fe-S cluster biosynthesis*. Biochemistry, 2001. **40**(46): p. 14069-80.
36. Vickery, L.E. and J.R. Cupp-Vickery, *Molecular chaperones HscA/Ssq1 and HscB/Jac1 and their roles in iron-sulfur protein maturation*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2007. **42**(2): p. 95-111.
37. Winyard, P.G., C.J. Moody, and C. Jacob, *Oxidative activation of antioxidant defence*. Trends Biochem Sci, 2005. **30**(8): p. 453-61.
38. Apel, K. and H. Hirt, *Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction*. Annu Rev Plant Biol, 2004. **55**: p. 373-99.
39. Repine, J.E., R.B. Fox, and E.M. Berger, *Hydrogen peroxide kills Staphylococcus aureus by reacting with staphylococcal iron to form hydroxyl radical*. J Biol Chem, 1981. **256**(14): p. 7094-6.
40. Kohchi, C., et al., *ROS and innate immunity*. Anticancer Res, 2009. **29**(3): p. 817-21.
41. Minakami, R. and H. Sumimoto, *Phagocytosis-coupled activation of the superoxide-producing phagocyte oxidase, a member of the NADPH oxidase (nox) family*. Int J Hematol, 2006. **84**(3): p. 193-8.
42. Hohn, D.C. and R.I. Lehrer, *NADPH oxidase deficiency in X-linked chronic granulomatous disease*. J Clin Invest, 1975. **55**(4): p. 707-13.
43. Nunoshiba, T., et al., *Role of iron and superoxide for generation of hydroxyl radical, oxidative DNA lesions, and mutagenesis in Escherichia coli*. J Biol Chem, 1999. **274**(49): p. 34832-7.
44. Cabisco, E., J. Tamarit, and J. Ros, *Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species*. Int Microbiol, 2000. **3**(1): p. 3-8.
45. Avery, S.V., *Molecular targets of oxidative stress*. Biochem J, 2011. **434**(2): p. 201-10.
46. Jang, S. and J.A. Imlay, *Micromolar intracellular hydrogen peroxide disrupts metabolism by damaging iron-sulfur enzymes*. J Biol Chem, 2007. **282**(2): p. 929-37.
47. Stuehr, D.J., *Mammalian nitric oxide synthases*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1411**(2-3): p. 217-30.
48. Alderton, W.K., C.E. Cooper, and R.G. Knowles, *Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition*. Biochem J, 2001. **357**(Pt 3): p. 593-615.
49. Xie, Q.W., et al., *Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages*. Science, 1992. **256**(5054): p. 225-8.
50. Gardner, P.R., et al., *Nitric oxide sensitivity of the aconitases*. J Biol Chem, 1997. **272**(40): p. 25071-6.
51. Drapier, J.C., *Interplay between NO and [Fe-S] clusters: relevance to biological systems*. Methods, 1997. **11**(3): p. 319-29.
52. Cooper, C.E., *Nitric oxide and iron proteins*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1411**(2-3): p. 290-309.

53. Goldstein, S. and G. Czapski, *The reaction of NO. with O2.- and HO2.: a pulse radiolysis study*. Free Radic Biol Med, 1995. **19**(4): p. 505-10.
54. Hughes, M.N., *Chemistry of nitric oxide and related species*. Methods Enzymol, 2008. **436**: p. 3-19.
55. Alvarez, B. and R. Radi, *Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins*. Amino Acids, 2003. **25**(3-4): p. 295-311.
56. Hogg, N. and B. Kalyanaraman, *Nitric oxide and lipid peroxidation*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 1999. **1411**(2-3): p. 378-384.
57. Burney, S., et al., *The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite*. Mutat Res, 1999. **424**(1-2): p. 37-49.
58. James, S.L., *Role of nitric oxide in parasitic infections*. Microbiol Rev, 1995. **59**(4): p. 533-47.
59. Lushchak, V.I., *Oxidative stress and mechanisms of protection against it in bacteria*. Biochemistry (Mosc), 2001. **66**(5): p. 476-89.
60. Imlay, J.A., *Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide*. Annu Rev Biochem, 2008. **77**: p. 755-76.
61. Chaffin, D.O., et al., *Changes in the Staphylococcus aureus transcriptome during early adaptation to the lung*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e41329.
62. Voyich, J.M., et al., *Insights into mechanisms used by Staphylococcus aureus to avoid destruction by human neutrophils*. J Immunol, 2005. **175**(6): p. 3907-19.
63. Saraiva, L.M., J.B. Vicente, and M. Teixeira, *The role of the flavodiiron proteins in microbial nitric oxide detoxification*. Adv Microb Physiol, 2004. **49**: p. 77-129.
64. Frey, A.D. and P.T. Kallio, *Bacterial hemoglobins and flavohemoglobins: versatile proteins and their impact on microbiology and biotechnology*. FEMS Microbiol Rev, 2003. **27**(4): p. 525-45.
65. Bonamore, A. and A. Boffi, *Flavohemoglobin: structure and reactivity*. IUBMB Life, 2008. **60**(1): p. 19-28.
66. Justino, M.C., et al., *Escherichia coli di-iron YtfE protein is necessary for the repair of stress-damaged iron-sulfur clusters*. J Biol Chem, 2007. **282**(14): p. 10352-9.
67. Overton, T.W., et al., *Widespread distribution in pathogenic bacteria of di-iron proteins that repair oxidative and nitrosative damage to iron-sulfur centers*. J Bacteriol, 2008. **190**(6): p. 2004-13.
68. Justino, M.C., et al., *Escherichia coli YtfE is a di-iron protein with an important function in assembly of iron-sulphur clusters*. FEMS Microbiol Lett, 2006. **257**(2): p. 278-84.
69. Chang, W., et al., *Global transcriptome analysis of Staphylococcus aureus response to hydrogen peroxide*. J Bacteriol, 2006. **188**(4): p. 1648-59.
70. Richardson, A.R., P.M. Dunman, and F.C. Fang, *The nitrosative stress response of Staphylococcus aureus is required for resistance to innate immunity*. Mol Microbiol, 2006. **61**(4): p. 927-39.
71. Tardat, B. and D. Touati, *Iron and oxygen regulation of Escherichia coli MnSOD expression: competition between the global regulators Fur and ArcA for binding to DNA*. Mol Microbiol, 1993. **9**(1): p. 53-63.
72. Hassan, H.M. and H.C. Sun, *Regulatory roles of Fnr, Fur, and Arc in expression of manganese-containing superoxide dismutase in Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(8): p. 3217-21.
73. Horsburgh, M.J., E. Ingham, and S.J. Foster, *In Staphylococcus aureus, fur is an interactive regulator with PerR, contributes to virulence, and is necessary for oxidative stress resistance through positive regulation of catalase and iron homeostasis*. J Bacteriol, 2001. **183**(2): p. 468-75.
74. Herbig, A.F. and J.D. Helmann, *Roles of metal ions and hydrogen peroxide in modulating the interaction of the Bacillus subtilis PerR peroxide regulon repressor with operator DNA*. Mol Microbiol, 2001. **41**(4): p. 849-59.
75. Lee, J.W. and J.D. Helmann, *The PerR transcription factor senses H2O2 by metal-catalysed histidine oxidation*. Nature, 2006. **440**(7082): p. 363-7.

76. Horsburgh, M.J., et al., *PerR controls oxidative stress resistance and iron storage proteins and is required for virulence in Staphylococcus aureus*. Infect Immun, 2001. **69**(6): p. 3744-54.
77. Fuangthong, M., et al., *Regulation of the Bacillus subtilis fur and perR genes by PerR: not all members of the PerR regulon are peroxide inducible*. J Bacteriol, 2002. **184**(12): p. 3276-86.
78. Nakano, M.M., et al., *Two-component regulatory proteins ResD-ResE are required for transcriptional activation of fnr upon oxygen limitation in Bacillus subtilis*. J Bacteriol, 1996. **178**(13): p. 3796-802.
79. Nakano, M.M., et al., *Interaction of ResD with regulatory regions of anaerobically induced genes in Bacillus subtilis*. Mol Microbiol, 2000. **37**(5): p. 1198-207.
80. Nakano, M.M., *Induction of ResDE-dependent gene expression in Bacillus subtilis in response to nitric oxide and nitrosative stress*. J Bacteriol, 2002. **184**(6): p. 1783-7.
81. Yarwood, J.M., J.K. McCormick, and P.M. Schlievert, *Identification of a novel two-component regulatory system that acts in global regulation of virulence factors of Staphylococcus aureus*. J Bacteriol, 2001. **183**(4): p. 1113-23.
82. Pragman, A.A., et al., *Characterization of virulence factor regulation by SrrAB, a two-component system in Staphylococcus aureus*. J Bacteriol, 2004. **186**(8): p. 2430-8.
83. Pragman, A.A., Y. Ji, and P.M. Schlievert, *Repression of Staphylococcus aureus SrrAB using inducible antisense srrA alters growth and virulence factor transcript levels*. Biochemistry, 2007. **46**(1): p. 314-21.
84. Pinho, M.G., H. de Lencastre, and A. Tomasz, *Cloning, characterization, and inactivation of the gene pbpC, encoding penicillin-binding protein 3 of Staphylococcus aureus*. J Bacteriol, 2000. **182**(4): p. 1074-9.
85. Arnaud, M., A. Chastanet, and M. Debarbouille, *New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria*. Appl Environ Microbiol, 2004. **70**(11): p. 6887-91.
86. Guerout-Fleury, A.M., et al., *Antibiotic-resistance cassettes for Bacillus subtilis*. Gene, 1995. **167**(1-2): p. 335-6.
87. Kraemer, G. and J. Iandolo, *High-frequency transformation of Staphylococcus aureus by electroporation*. Current Microbiology, 1990. **21**(6): p. 373-376.
88. Bodenmiller, D.M. and S. Spiro, *The yjeB (nsrR) gene of Escherichia coli encodes a nitric oxide-sensitive transcriptional regulator*. J Bacteriol, 2006. **188**(3): p. 874-81.
89. Tucker, N.P., et al., *The transcriptional repressor protein NsrR senses nitric oxide directly via a [2Fe-2S] cluster*. PLoS One, 2008. **3**(11): p. e3623.
90. Tucker, N.P., et al., *There's NO stopping NsrR, a global regulator of the bacterial NO stress response*. Trends Microbiol, 2010. **18**(4): p. 149-56.
91. Goncalves, V.L., et al., *Flavohemoglobin requires microaerophilic conditions for nitrosative protection of Staphylococcus aureus*. FEBS Lett, 2006. **580**(7): p. 1817-21.
92. Eleaume, H. and S. Jabbouri, *Comparison of two standardisation methods in real-time quantitative RT-PCR to follow Staphylococcus aureus genes expression during in vitro growth*. J Microbiol Methods, 2004. **59**(3): p. 363-70.
93. Lee, J.W. and J.D. Helmann, *Functional specialization within the Fur family of metalloregulators*. Biometals, 2007. **20**(3-4): p. 485-99.

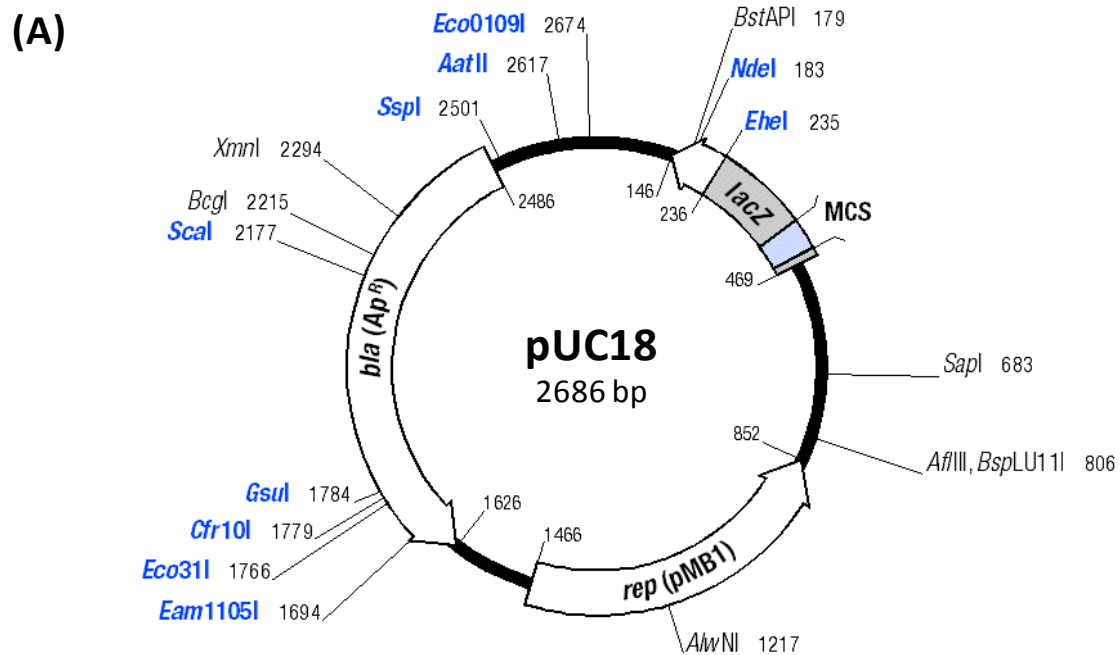
Anexos

Anexo 1 - Materiais

Quadro A1: Lista complementar de materiais usados ao longo deste trabalho, respectivos solventes em que foram preparados (quando aplicável).

	Preparado em:	Marca
Acetato de Sódio (CH ₃ COONa)	Água bidestilada	Riedel
Ácido Clorídrico (HCl)	–	Merck
Ampicilina	Água Milli-Q estéril	Sigma
Azul de Bromofenol	–	Merck
Base Tris	Água bidestilada	Roth
Canamicina	Água Milli-Q estéril	Roth
Cloreto de Cálcio (CaCl ₂ .2 H ₂ O)	Água bidestilada	Merck
Cloreto de Magnésio (MgCl ₂ .6H ₂ O)	Água bidestilada	Riedel
Cloreto de Manganês (MnCl ₂)	Água bidestilada	Sigma
Cloreto de Potássio (KCl)	Água bidestilada	Merck
Dimetilsulfóxido (DMSO)	–	Sigma
EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético)	Água bidestilada	Roth
Eritromicina	Metanol	Sigma
Etanol Absoluto	–	Panreac
Ficoll tipo 400	–	Merck
IPTG (isso-propyl-thiogalactoside)	Água Milli-Q estéril	NYZtech
Lisozima	Tris-HCl 10mM pH 8	Sigma
PEG 8000 (Polyethylene glycol)	Água bidestilada	Sigma
Sacarose	Água bidestilada	Sigma
Sulfato de Magnésio (MgSO ₄ .7H ₂ O)	Água bidestilada	Merck
Tetraciclina	Metanol	Sigma
X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β-D-galactopyranoside)	<i>N,N</i> -Dimethylformamide (DMF)	Roth
Xileno de Cianol FF	–	Merck
Glicerol 85 %	–	Merck

Anexo 2 – Plasmídeo pUC18



(B)

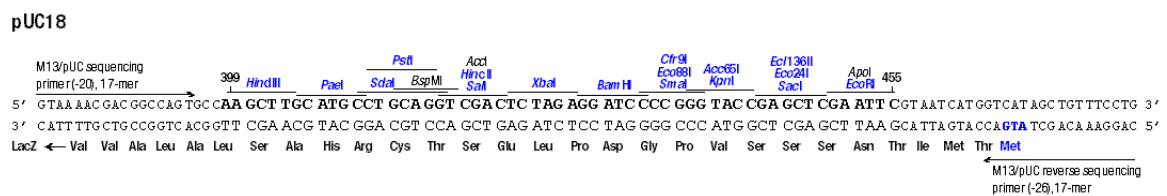
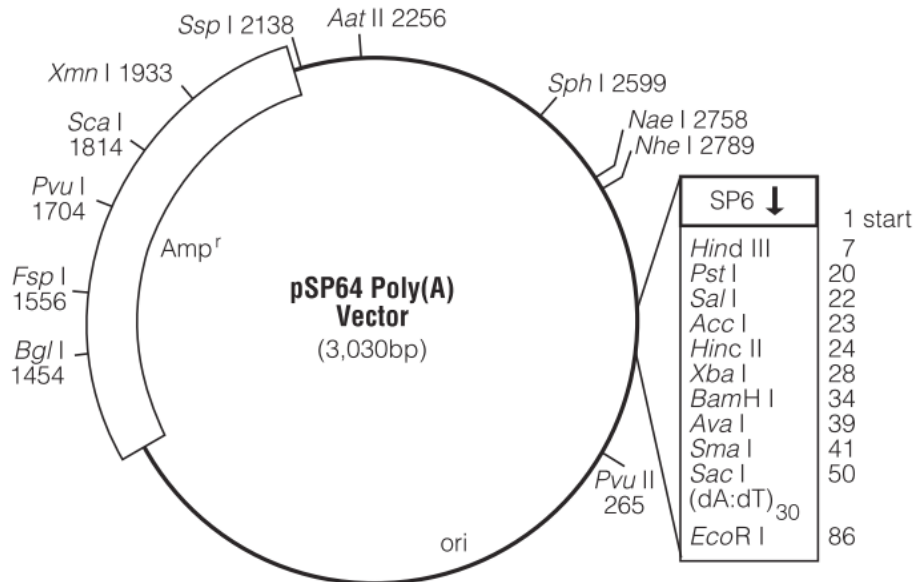


Figura 1A: (A) Mapa de restrição do plasmídeo pUC18: *bla*(Ap^R) – gene de resistência à ampicilina; *rep*(pMB1) – origem de replicação em *E. coli*; *lacZ* – gene que codifica o fragmento N-terminal de uma β-galactosidade; MCS –local de clonagem múltiplas (polylinker). (B) Sequência da região MCS e localização dos seus locais de restrição.

Anexo 3 – Plasmídeo pSP64

(A)



(B)

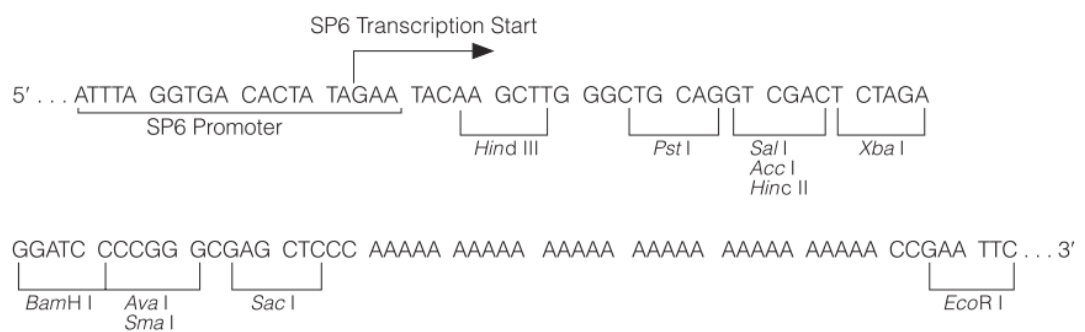


Figura 2A: (A) Mapa de restrição do plasmídeo pSP64 a partir do qual foi construído o plasmídeo pSP64E: Amp^r – gene de resistência à ampicilina; ori – origem de replicação. (B) Sequência da região de clonagem múltiplas (*polylinker*) e respectivos locais de restrição.

Esta dissertação foi escrita ao abrigo do novo Acordo Ortográfico