

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS MATEMÁTICAS E DA NATUREZA
INSTITUTO DE QUÍMICA

GIULIA NARANJO ARANHA

Caracterização estrutural e funcional do gene *orfE264* que codifica uma possível proteína autotransportadora em *Burkholderia thailandensis*

Rio de Janeiro

2017

GIULIA NARANJO ARANHA

Caracterização estrutural e funcional do gene *orfE264* que codifica uma possível proteína autotransportadora em *Burkholderia thailandensis*

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau Mestre em Ciências.

Orientadora:

Bianca Cruz Neves (IQ/UFRJ)

RIO DE JANEIRO

2017

A662

Aranha, Giulia Naranjo

Caracterização estrutural e funcional do gene *orfE264* que codifica uma possível proteína autotransportadora em *Bukholderia thailandensis*. / Giulia Naranjo Aranha. – Rio de Janeiro : UFRJ, 2017.

118 p.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, 2017.

Orientadora: Bianca Cruz Neves.

1. Recombinação genética. 2. *Bukholderia thailandensis*. 3. Engenharia genética. 4. Proteína autotransportadora. 5. Caracterização estrutural *in silico*. 6. Caracterização Fenotípica. I. Neves, Bianca Cruz (orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Programa de Pós Graduação em Bioquímica. III. Título.

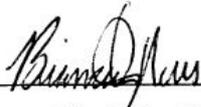
CDD 572.877

Giulia Naranjo Aranha

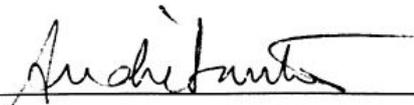
Caracterização estrutural e funcional do gene *orfE264* que codifica uma possível proteína autotransportadora em *Burkholderia thailandensis*

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau Mestre em Ciências.

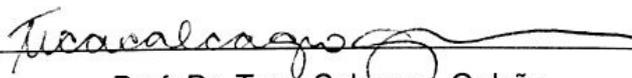
Rio de Janeiro, 29 de Agosto de 2017.



Prof. Dr. Bianca Cruz Neves
Orientadora



Prof. Dr. André Luis Souza dos Santos
Membro interno



Prof. Dr. Teca Calcagno Galvão
Membro externo



Prof. Dr. Marcia Giambiagi de Marval
Membro externo

Dedico este trabalho à minha Mãe, pois sem ela eu não teria a energia necessária dos ATPs mitocondriais para executá-lo.



AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao portal Capes e ao Sci-Hub.io, pois sem eles seria impossível escrever essa dissertação. Segundamente ao Mendeley, pois senão haveria muito menos referência neste trabalho. Terceiramente à Barbara e à Alexandra, pois sem elas não haveria combustível para escrever. Finalmente agradeço a Bolsa que cai no início do mês, pois sem ela eu seria infeliz.

Agradeço aos meus pais por terem me apoiado em minhas decisões, por mais diferente que fossem, além de sempre se esforçarem para que eu aproveitasse todas as oportunidades da vida e chegar onde estou hoje. Aqui preciso agradecer especialmente à minha mãe, Christine, estando ao meu lado incondicionalmente e por me ensinar todos os valores que hoje eu cultivo. Muito obrigada por tudo. Aos meus irmãos, Jay e Chris, que mesmo à distância conseguem estar próximos. Aos meus avós Milton, Irene e Euclides (*In memorian*) que espero estarem orgulhosos de mim e a minha avó, ou duas vezes mãe, Rochelle que ajudou a me criar (ou melhor "descriar") com a ajuda da Paulinha. Agradeço também à Angela e Maria Fernanda, por me oferecerem uma sensação de lar fora de casa.

Agradeço minha orientadora Bianca Cruz Neves, que me forneceu essa oportunidade desde muito cedo, sempre me fascinando com seu conhecimento sobre os mais diversos temas me mostrando que cultura pode ser mais do que de bactéria.

À equipe LaMMP maravilhosa, e gigantesca a ponto de não caberem todos os nomes aqui (literalmente), por compartilharem todos os dias no laboratório e por fazer meus dias mais felizes e cheios de risadas seja no 1 ou no 2, pois no final é tudo misturado mesmo. Compartilhar almoços, autoclavações e cervejas artesanais me faz acordar com pique para encontrar com vocês. Exceto quando muito cedo. Ou aos finais de semana. Agradeço aos amigos e colegas que fiz em outros lugares LaBEP e LIFE em especial. Ao meu time de trabalho cotidiano com Graciela, Michele, Araceli, Núbia e Hadassa. Preciso dar também um destaque à Gabi Minicientista Brêda, Leticia (sem acento) Le Dobler, Ju menina menino árvore menina, Marcelo (*In*

memorian)” e Camila (com dois L), que não só contribuem para um excelente ambiente de trabalho, mas que também carregam para a vida, desde que seja dentro do meu perímetro.

Agradeço ao Dr. Derek Pickard, do Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge, Reino Unido, por ceder o plasmídeo pSIM18 empregado no nocaute, e ao Dr. Herbert Schweizer, por ter fornecido o pUCP26, que tiveram importância fundamental no desenvolvimento desse trabalho. Agradeço às agências de fomento da Petrobás, CNPq e Capes Proex pelo financiamento para a pesquisa.

Aos meus amigos Jonas, Amanda, Joana, Anaf e Mel por sempre me lembrarem que o bom do passado é que ele fica lá para trás, mas o que é excelente a gente carrega junto. À Leticia LeRiski, Be, Thabs, Lari, Elisa, Gabi, Axel, Rolinha, Beth, Thais, Andressa, Dan e Brittany por me provarem que uma amizade não depende de tempo ou distância.

Em um parágrafo especial, ao meu João. Pois sei que quando algo não dá certo, vai me fazer rir e quando preciso de uma opinião sincera, sei aonde buscar. Alguém que me conquistou rapidamente, com a facilidade em que conversávamos madrugada adentro sobre nada, se tornou meu melhor amigo e convenientemente é com quem quero dividir para sempre o vem aí pela frente.

E claro, nunca poderia deixar de fora: Dood Dood, por mais que a gente cresça, prova-se que o amadurecimento é opcional.

Bora, é hora do show.

“Always. ” (Snape)

“Hodor. ” (Hodor).

RESUMO

ARANHA, Giulia Naranjo. **Caracterização estrutural e funcional do gene *orfE264* que codifica uma possível proteína autotransportadora em *Burkholderia thailandensis***. Rio de Janeiro, 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Burkholderia thailandensis é uma espécie não patogênica, comumente isolada do solo e da água, tem sido utilizada como modelo para o estudo de muitas características de suas contrapartes patogênicas em *Burkholderia* spp. *B. thailandensis* produz biossurfactantes do tipo raminolipídeo que parece estar diretamente envolvido no comportamento multicelular. O estudo das vias biossintéticas dos raminolipídeos em *Pseudomonas aeruginosa* revelou uma proteína autotransportadora chamada EstA, que influencia a produção de raminolipídeos, a formação de biofilmes aderentes e a motilidade celular. EstA, uma proteína autotransportadora, é caracterizada por um Barril- β na região C-terminal que ancora uma lipase na membrana externa. Para investigar a presença de proteínas autotransportadoras similares à EstA em *B. thailandensis*, foram utilizadas ferramentas bioinformáticas para prospecção de autotransportadoras dentro do genoma da *B. thailandensis* E264. As análises de bioinformática revelaram um potencial gene similar ao *estA* (aqui designado como *orfE264*). *orfE264* foi sintetizado e clonado no plasmídeo pBluescript II SK em que uma deleção foi construída, seguida pela inserção de um gene de resistência ao cloranfenicol de modo a obter-se uma cepa nocauteada por recombinação homóloga, usando recombinases do bacteriófago Lambda. A caracterização da cepa mutante Δ *orfE264::Cm* resultante revelou uma diminuição significativa da formação do biofilme e da motilidade celular, em comparação com a cepa selvagem, mostrando que esse produto gênico está de alguma forma envolvido nesses fenótipos. A complementação cruzada do mutante Δ *orfE264::Cm* com *estA* restaurou os fenótipos. Os resultados obtidos indicam uma possível proteína autotransportadora, o primeiro membro desta

família de secreção de proteínas a ser descrita nesta espécie. Estudos adicionais encontram-se em andamento, que deverão revelar informações relevantes sobre o papel dessa proteína em outros fenótipos deste modelo. Além disso, o emprego industrial de *B. thailandensis* para a produção de raminolipídeos é de grande interesse em Biotecnologia, sendo que uma autotransportadora da família EstA será um alvo importante para a engenharia metabólica, visando o melhoramento da produção desses compostos.

Palavras chave: *Burkholderia thailandensis*, Engenharia genética, Autotransportadora, Biologia Molecular.

ABSTRACT

ARANHA, Giulia Naranjo. **Structural and functional characterization of *orfE264* a gene encoding a putative autotransporter protein in *Burkholderia thailandensis***. Rio de Janeiro, 2017. Dissertation (Master of Science) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Burkholderia thailandensis, a non-pathogenic species, commonly isolated from soil and water, has been used as a surrogate model for studying many characteristics of its pathogenic counterparts in *Burkholderia* spp. *B. thailandensis* produces rhamnolipid biosurfactants, which seems to be directly involved in multicellular behavior. The study of biosynthetic pathways of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa* revealed an autotransporter protein called EstA, which influences the production of rhamnolipids, the formation of adherent biofilms and cellular motility. EstA is an autotransporter characterized by a β -barrel motif in the C-terminal region that anchors a lipase in the outer membrane. In order to investigate the presence of autotransporter proteins similar to EstA in *B. thailandensis*, bioinformatic tools were employed for prospecting within the genome of *B. thailandensis* E264. The bioinformatics analyses revealed a potential *estA*-like gene (herein designated *orfE264*). *orfE264* was synthesized and cloned in the plasmid pBluescript II SK in which a deletion was constructed, followed by the insertion of a chloramphenicol resistance gene in order to obtain a knockout strain by homologous recombination, using Lambda phage recombinases. Characterization of the resulting *orfE264*-mutant strain revealed significantly decreased biofilm formation and cellular motility, when compared to the wild-type strain, showing that this genic product is somehow involved in those *phenotypes*. Cross complementation of the *orfE264*-mutant with a full-length *estA* restored the phenotypes. These results indicate a putative autotransporter protein, the first member of this protein secretion family to be described in this species. Ongoing

studies might reveal relevant information about the role of this protein in virulence mechanism of this model. Moreover, the industrial applicability of *B. thailandensis* in rhamnolipid production are of great interest in Biotechnology and a novel EstA-family autotransporter will be an important target for metabolic engineering aiming at the enhancement of rhamnolipid production.

Keywords: *Burkholderia thailandensis*, Genetic Engineering, Autotransporter, Molecular Biology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

Figura 1. Um estudo microscópico dos passos na formação de biofilmes por <i>Vibrio cholerae</i>	23
Figura 2. Microscopia epifluorescente de biofilmes polimicrobianos.	25
Figura 3. Mecanismos essenciais ao sistema <i>Quorum sensing</i>	29
Figura 4. Motilidade celular do tipo <i>swarming</i>	31
Figura 5. Biossurfactantes bacterianos.	33
Figura 6. Padrões de formação de colônias.	34
Figura 7. Estrutura de Raminolipídeos.....	37
Figura 8. Conjunto genético de <i>P. aeruginosa</i> e <i>B. thailandensis</i>	39
Figura 9. Estrutura básica da autotransportadoras.....	41
Figura 10. Modelo do domínio C-terminal da esterase EstA de <i>P. aeruginosa</i> localizado na membrana externa.	42
Figura 11. Comparação da estrutura do domínio passageiro.....	43
Figura 12. Desenho esquemático da construção EstA autotransportadora utilizada para a exibição de domínios de passageiros heterólogos.....	45
Figura 13 Construção do plasmídeo pBSK Δ orfE264:: <i>Cm</i>	51
Figura 14. Mapa do pSIM18.....	55
Figura 15. Mecanismo de funcionamento das recombinases Exo e Beta do bacteriófago lambda.	56
Figura 16. Esquema da montagem da estrutura do Southern blot.....	61
Figura 17. O gene <i>estA</i> -like e seus homólogos.	65
Figura 18. Prospecção de genes <i>estA</i> -like em <i>B. thailandensis</i>	66
Figura 19. Árvore filogenética gerada pelo SmartBlat.	68
Figura 20. Alinhamento entre as sequências utilizadas na filogenia por SmartBlast.	69
Figura 21. Destaque do domínio autotransportador para a OrfE264.	69
Figura 22. Filogenia de autotransportadoras.	71
Figura 23. Predição de clivagem de peptídeo sinal da OrfE264.....	74
Figura 24. Predição de clivagem do peptídeo sinal pelo Protter.....	75
Figura 25. Comparação entre modelos OrfE264 e cristalografia da EstA	77

Figura 26. Análise comparativa por sobreposição do modelo da OrfE264 e a estrutura cristalográfica da EstA.....	78
Figura 27. Predição de estruturas secundárias entre a EstA e a OrfE264 por Praline.	80
Figura 28. Predição de estruturas secundárias da OrfE264 por PSIPred.....	81
Figura 29. Comparação entre modelos OrfE264 e cristalografia da EstA	81
Figura 30. Modelo transmembranar da EstA via Protter e proposta para OrfE264.....	83
Figura 31. Sequência do gene <i>orfE264</i>	85
Figura 32. Sequência do gene Δ <i>orfE264</i>	85
Figura 33. Mapa do pBSK_ Δ <i>orfE264</i> :: <i>Cm</i>	86
Figura 34. Mapeamento das regiões amplificadas por PCR.	88
Figura 35. Eletroforese dos produtos do PCR comparativo.	88
Figura 36. Processo de elaboração das sondas.	90
Figura 37. Southern Blot com sondas específicas para <i>orfE264</i> e para o cassete de cloranfenicol (<i>Cm</i>).	91
Figura 38. Mapa do pUCP26_ <i>orfE264</i>	92
Figura 39. Mapa do pUCP26_ <i>estA</i>	93
Figura 40. Esquema das cepas de <i>B. thailandensis</i>	94
Figura 41. Quantificação de biofilmes aderentes crescido em placas de 24 multipos de poliestireno.	95
Figura 42. Comparativo das cepas de <i>B. thailandensis</i> crescidas em meio semi-sólido após 48h.	97
Figura 43. Motilidade celular por <i>swarming</i>	98
Tabela 1 Relação dos antibióticos utilizados no estudo e suas concentrações.	49
Tabela 2 Relação das cepas utilizadas para o estudo.....	50
Tabela 3 Relação dos plasmídeos utilizados no estudo.	52
Tabela 4. Relação dos primers utilizados nesse estudo	53

LISTA DE ABREVIACÖES

AHL – Acil Homoseril Lactinoas

BAM - *β -barrel assembly machinery*

CDC – Centro de Controle de Doenças

Cm – Cloranfenicol Acetil-transferase

DIG – Dioxigenina (nucleotídeo modificado)

EPS - Exopolissacarídeos

LB – Luria Bertani

PCR – Reação em cadeia da polimerase

QS – *Quorum Sensing*

USEPA - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

SUMÁRIO

1	Introdução e Revisão bibliográfica:	18
1.1	<i>Burkholderia thailandensis</i> e sua importância na Ciência.....	18
1.1.1	O gênero <i>Burkholderia</i> e suas origens	18
1.1.2	<i>Burkholderia thailandensis</i> como modelo de estudo e interesse biotecnológico.....	19
1.2	Biofilme.....	21
1.2.1	Definição	21
1.2.2	Aplicações e complicações dos biofilmes.....	25
1.3	<i>Quorum Sensing</i>	27
1.4	Motilidade celular.....	31
1.5	Surfactantes	35
1.5.1	Visão geral da molécula	35
1.5.2	Biossurfactantes	36
1.5.3	Raminolipídeos	37
1.5.4	Proteínas atuantes na biossíntese de raminolipídeos	39
1.6	Autotransportadoras e a EstA.....	40
1.7	Interesse biotecnológico da EstA	44
2	Objetivos.....	46
2.1	Objetivos específicos	46
3	Materiais e Métodos.....	47
3.1	Análises <i>in silico</i>	47
3.1.1	Prospecção de proteínas do tipo EstA.....	47
3.1.2	Identidade entre as sequências.....	47
3.1.3	Inferência filogenética.....	47
3.1.4	Predição de clivagem do peptídeo sinal.....	48

3.1.5	Modelagem <i>in silico</i>	48
3.1.6	Inferência de sequências transmembranares	48
3.2	Bactérias, plasmídeos e meios empregados	48
3.2.1	Meios de cultura empregados	48
3.2.2	Bactérias e plasmídeos empregados	49
3.3	Oligonucleotídeos	52
3.4	Estratégias de manipulação gênica	53
3.4.1	Extração do fragmento $\Delta orfE264::Cm$	53
3.4.2	Construção de mutante $\Delta orfE264::Cm$ em <i>B. thailandensis</i> <i>E264</i> com as recombinases do fago λ	54
3.4.3	Estratégias de transformação e complementação <i>in trans</i> ..	57
3.4.4.1.	Extração de plasmídeos	57
3.4.4.2.	Determinação da concentração e pureza de DNA	58
3.4.4.3.	Transformação por eletroporação	58
3.4.4	Comprovação do nocaute $\Delta orfE264::Cm$	58
3.4.4.4.	Extração de DNA genômico (gDNA)	59
3.4.4.5.	PCR comparativo	59
3.4.4.6.	Eletroforese	59
3.4.4.7.	Transferência do gDNA para uma membrana de Nylon 60	
3.4.4.8.	Elaboração de sondas com DIG	61
3.4.4.9.	Elaboração da sonda Cm	62
3.4.4.10.	Elaboração da sonda <i>orfE264</i>	62
3.4.4.11.	Hibridização	62
3.4.4.12.	Revelação	63
3.5	Análise dos fenótipos celulares complementares	63

3.5.1	Quantificação dos biofilmes aderentes	63
3.5.2	Motilidade celular por <i>Swarming</i>	64
4	Resultados e discussão	65
4.1	Análises <i>in silico</i>	65
4.1.1	Prospecção de genes que codifiquem produtos proteicos semelhantes à família EstA.....	65
4.1.2	Identidade entre as sequências OrfE264 e EstA.....	66
4.1.3	Filogenia	66
4.1.4	Predição de clivagem do peptídeo sinal.....	72
4.1.5	Modelagem estrutural tridimensional da OrfE264	76
4.1.6	Inferência de regiões transmembranares	78
4.2	Engenharia genética	84
4.3	Complementação plasmidial.....	91
4.4	Análise dos fenótipos celulares.....	94
4.4.1	Quantificação de biofilme aderente	94
4.4.2	Motilidade celular	97
5	Conclusão	100
6	Perspectivas.....	101
7	Referências.....	102

1 Introdução e Revisão bibliográfica:

1.1 *Burkholderia thailandensis* e sua importância na Ciência

1.1.1 O gênero *Burkholderia* e suas origens

Segundo a Global Security Organization (GLOBALSECURITY.ORG, 2011), a melioidose, ou doença de Whitmore, é uma doença predominantemente tropical ou subtropical causada por bactéria e endêmica no Sudeste Asiático, Austrália, África, Oriente Médio, China e Índia com ocorrências isoladas na América do Sul, no Havaí e na Geórgia. A melioidose septicêmica foi descrita pela primeira vez em 1911-1912 pelo capitão Alfred Whitmore, um patologista britânico que serviu na Birmânia e CS Krishnaswami. Em 1932, Stanton e Fletcher chamaram a doença de "melioidose" (STANTON, 1933). Em grego, melis traduz-se em "cinto de burros", e o eidos se traduz em "semelhança". Mas bactérias, isoladas de viciados à morfina em Rangoon, Birmânia eram diferentes da *Pseudomonas mallei* (KRISHNASWAMI, 1917). Na Malásia, Ambrose Thomas Stanton e William Fletcher em 1917 identificaram as bactérias que causam a doença e, após vários nomes anteriores, a bactéria causadora foi chamada *Pseudomonas pseudomallei* (LEELARASAMEE, 1989).

A doença foi encontrada no Vietnã, Sri Lanka e Indonésia, e particularmente afetou as tropas francesas estacionadas na Indochina e as tropas americanas que as seguiram. Na ocupação francesa do Vietnã entre 1948 e 1954, foram diagnosticados mais de 100 casos de melioidose e durante a ocupação americana, mais de 300 casos. Os soldados adquiriram a doença expondo diretamente as feridas ao solo ou a água carregando a bactéria ou por inalação. A melioidose era conhecida como a "bomba temporária vietnamita" devido ao período de incubação potencialmente longo sendo assim, mesmo após o retorno para casa, os soldados apresentaram sintomas da doença (GLOBALSECURITY.ORG, 2011). Outro exemplo da letalidade dessa espécie deriva da política do Panda estabelecida por Mao-Tsé-Tung durante a Guerra

Fria. O líder comunista utilizou o empréstimo de pandas como moeda de aliança como parte da política de tentar afirmar a China como terceira potência mundial, perante Estados Unidos e União Soviética. Contudo, em 1975, um panda doado por Mao-Tsé-Tung ao presidente francês Pompidou foi o gatilho para uma epidemia, que acometeu vários zoológicos franceses com mortes de animais (MOLLARET, 1988). O Centro de Controle de Doenças (CDC, Estados Unidos) classificou a melioidose como um agente de armas biológicas de grande potencial. Além disso, devido aos sintomas comuns a outras doenças e ao período de incubação potencialmente longo, a melioidose pode ser difícil de diagnosticar com precisão. Estados Unidos e União Soviética estudaram a melioidose como um possível agente de armas biológicas. (ALLAN; DANCE, 2005).

A partir das sequências de DNA ribossomal 16S, homologia, composição lipídica e características fenotípicas dentro do gênero *Pseudomonas*, sete espécies foram movidas para um novo gênero *Burkholderia* em 1992 (YABUUCHI et al., 1992). O novo gênero recebeu o nome do microbiologista norte-americano Walter Burkholder, que, em 1949, descreveu pela primeira vez *Burkholderia cepacia*, anteriormente *Pseudomonas cepacia*, como o patógeno da planta causador de podridão bacteriana de cebolas (BURKHOLDER, 1950). Uma série de espécies bacterianas ambientais relacionadas foram posteriormente descobertas e adicionadas ao gênero *Burkholderia* (CURRIE, 2003).

1.1.2 *Burkholderia thailandensis* como modelo de estudo e interesse biotecnológico

Por conta das dificuldades vinculadas a segurança de trabalho, estudos com variantes patogênicas de *Burkholderia* acabam sendo potencialmente perigosas para os pesquisadores. Felizmente, há um modelo de estudo próximo à *B. pseudomallei* que não é um patógeno humano. Trata-se da *B. thailandensis*. *B. thailandensis* é uma bactéria relacionada com *B. pseudomallei* (BRETT; DESHAZER; WOODS, 1998) que quando foi isolada pela primeira vez do meio ambiente, foi erroneamente identificada como *B. pseudomallei* pela similaridade entre as duas espécies (SMITH et al., 1997). *Burkholderia*

thailandensis, é comumente isolada do solo e da água, e utilizada como modelo para o estudo de muitas características de suas contrapartes patogênicas (HARAGA et al., 2008b; MAJERCZYK et al., 2014). *B. thailandensis* e *B. pseudomallei* divergiram de um antepassado comum há cerca de 47 milhões de anos e possuem semelhanças com sequências de rRNA 16S próximas (YU et al., 2006). Mais de 85% dos seus genes são conservados e os seus genomas são altamente sintênicos, ou seja, com genes localizados no mesmo cromossomo, apresentando apenas 4 grandes variações. As ilhas de patogenicidade fornecem uma fonte importante de genes específicos de espécies em *B. thailandensis* e *B. pseudomallei* (HOLDEN et al., 2004; YU et al., 2006). Uma diferença notável entre as espécies é a capacidade de *B. thailandensis* para assimilar a L-arabinose, em contraste com *B. pseudomallei*, pela presença do óperon para assimilação de arabinose. Sendo assim, em contraste com as condições de biossegurança no trabalho exigidas de *B. pseudomallei*, o trabalho com *B. thailandensis* apresenta pouca restrição no uso de marcadores de resistência a antibióticos para sua manipulação genética (HARAGA et al., 2008a)

Essas características colocam a *B. thailandensis* como um excelente modelo de estudo em relação às contrapartes patogênicas de outras espécies do gênero *Burkholderia* e também de *Pseudomonas*. Somado a isso, há a questão do genoma, composto por dois cromossomos, ter sido sequenciado, a disponibilidade de cepas comerciais que podem ser obtidas a partir de bancos e *B. thailandensis* contém pouca restrição no uso de marcadores de antibióticos para manipulação genética (DUBEAU et al., 2009). *B. thailandensis*, assim como *P. aeruginosa*, produz biossurfactantes do tipo raminolipídeo, produto de grande interesse em diferentes indústrias. Contudo, utiliza-se a *P. aeruginosa* para a produção em larga escala por conta dos níveis elevados de síntese, o que desperta preocupações por ser um patógeno oportunista e, com o genoma conhecido, é possível identificar genes homólogos aos de *P. aeruginosa* como alvos de engenharia metabólica (DUBEAU et al., 2009).

1.2 Biofilme

1.2.1 Definição

Assim como em tecidos e organismos multicelulares que demandam uma intensa coordenação funcional entre as células, os micro-organismos comunicam-se quimicamente de forma coordenada. Na maioria dos ambientes naturais, a associação de um micro-organismo com uma superfície permite o desenvolvimento de uma estrutura conhecida como biofilme. A complexidade estrutural e fisiológica dos biofilmes levou à ideia de que eles são grupos cooperativos e coordenados, análogos aos organismos multicelulares e os biofilmes formados por esses agregados microbianos podem estar presentes em interfaces ar-líquido ou líquido-líquido, ou mesmo como agregados flutuantes na forma de flocos ou grânulos (NADELL; XAVIER; FOSTER, 2009; XAVIER et al., 2003). A ubiquidade dos biofilmes no ambiente natural, hospedeiros vegetais e animais, sugere fortemente que viver em grupos é crítico para ecologia e evolução bacteriana assim como para sua sobrevivência (HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004).

O tamanho dos biofilmes varia com espessuras da ordem dos milímetros ou mesmo micrômetros, contudo a espessura de alguns biofilmes pode atingir vários centímetros, como no caso dos tapetes de algas. Sendo assim, os biofilmes podem ser definidos como comunidades de micro-organismos imobilizados numa matriz de substâncias poliméricas extracelulares secretadas pelas bactérias e denominadas matriz extracelular. O biofilme funciona como uma barreira protetora hidratada, por conta dessa matriz, entre as células bacterianas e seu ambiente facilitando a sobrevivência sob condições ambientais adversas tais como: radiação ultravioleta, estresses físico-químicos, dessecação e suprimento insuficiente de recursos nutritivos (XAVIER et al., 2003), evidenciando a importância do estabelecimento de comunidades para melhor sobrevivência. É possível ver a fase microbiana planctônica como um mecanismo de translocação de uma superfície para outra, para uma colonização e perspectiva de desenvolver novas comunidades (WATNICK; KOLTER, 2000).

Estudos genéticos sobre biofilmes de uma única espécie mostraram que a formação da sua arquitetura se dá em múltiplas etapas (WATNICK; KOLTER, 1999), requerendo sinalização intercelular (DAVIES et al., 1998) e apresentando um perfil global de transcrição de genes distinto das células planctônicas (BEENKEN et al., 2004). A formação de biofilmes é um processo que outras vias de desenvolvimento bacteriano. Pode surgir competição entre diferentes espécies contidas em um biofilme, ou biofilmes iniciados por células geneticamente idênticas podem ser desbalanceados por uma mutação espontânea. O inverso também é descrito na literatura, um estímulo à produção de biofilme na presença de outro micro-organismo ou molécula disponível (BOMBERGER et al., 2016; GROUTA et al., 2016). Dessa forma, os biofilmes demandam um forte equilíbrio entre competição/cooperação (NADELL; XAVIER; FOSTER, 2009).

Uma alegoria sobre a formação do biofilme bacteriano cunhada por Watnick e Kolter em 2000, o compara com uma vivência no espaço urbano (WATNICK; KOLTER, 2000). É necessário otimizar a vivência em uma cidade. O primeiro passo é a decisão da cidade em que se viverá, para então selecionar o bairro da cidade ao qual apresenta as melhores condições adaptadas às necessidades, para enfim construir uma casa entre muitas outras. Quando a vida na cidade começa a ser desfavorável e estressante, parte-se em busca de outro ambiente. Esses mesmos passos ocorrem no biofilme bacteriano. Primeiro, a bactéria se aproxima da superfície e pode então formar uma associação transitória com a superfície ou outros micro-organismos previamente anexados à mesma. Esta associação transitória permite um lugar para se estabelecer e formar uma associação estável. Finalmente, o biofilme tridimensional é erguido. As micrografias destas etapas na formação de biofilmes por uma única espécie bacteriana são mostradas a seguir (Figura 1).

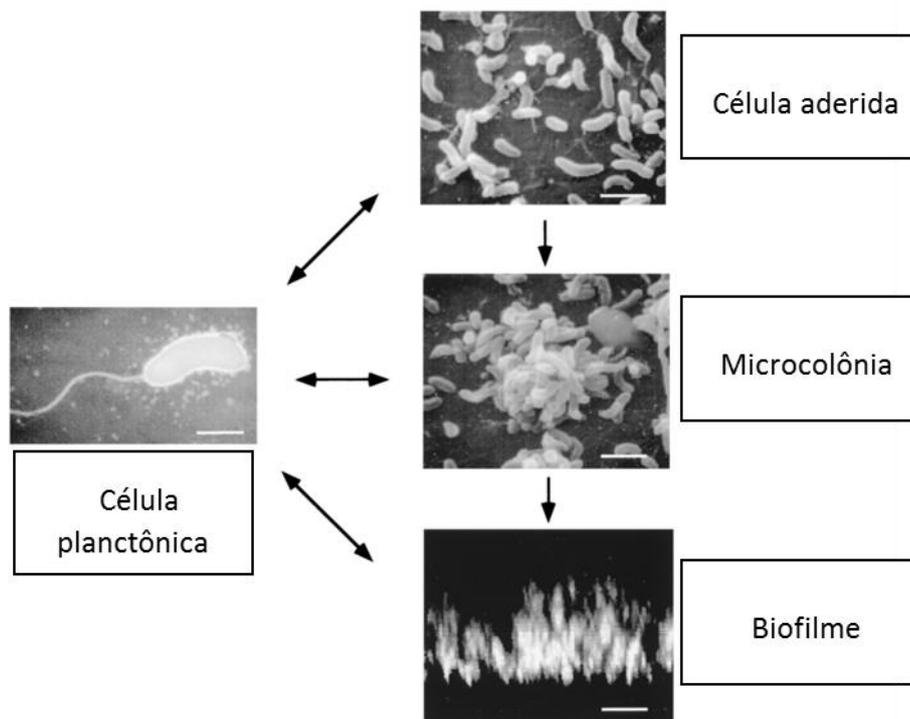


Figura 1. Um estudo microscópico dos passos na formação de biofilmes por *Vibrio cholerae*.

A bactéria planctônica foi visualizada por microscopia eletrônica de transmissão (barra de 1 μM), as células e micro-colônias anexadas foram visualizadas por microscopia eletrônica de varredura (barra de 2 μM) e a micrografia de biofilme representa uma seção vertical através de um biofilme de 20 μM tomado por microscopia de laser de varredura confocal (barra de 10 μM) (WATNICK; KOLTER, 2000).

Embora essas micrografias sejam visões estáticas da formação do biofilme, ocasionalmente ocorre o desprendimento das bactérias associadas ao biofilme (STEWART, 2003). Além das células fixas, há células que mantêm sua associação com o biofilme nadando entre pilares de bactérias associadas ao biofilme. O biofilme, portanto, demonstra um nível de atividade semelhante ao de uma cidade movimentada. O tráfego de pessoas e mercadorias se assemelha a motilidade celular e transferência de nutrientes constantemente. Afinal, uma cidade é feita principalmente das relações que se estabelecem entre os indivíduos.

Dentre as numerosas vantagens da formação biofilme destaca-se o aumento da resistência a antibióticos quando comparadas à células planctônicas (GBEJUADE et al., 2016). Algumas características atribuídas ao crescimento microbiano em biofilmes pode ser explicada invocando fenômenos

de transferência, pelas implicações físicas do crescimento em sistemas geometricamente tão diferentes como é o caso dos biofilmes em comparação com as células livres (STEWART, 2003).

Em células livres, ou planctônicas, o transporte de solutos do meio líquido para uma célula é um processo relativamente rápido, não constituindo um passo limitante para o crescimento. Agregados microbianos, tais como o biofilme, são ambientes densamente empacotados onde o fluxo é limitado, apesar de ocorrerem poros nos biofilmes (DE BEER; SRINIVASAN; STEWART, 1994; STOODLEY; LEWANDOWSKI; DEBEER, 1994) que são verdadeiros “canais de água” e toda a transferência de massa por difusão (DE BEER; SRINIVASAN; STEWART, 1994) um processo muito mais lento (BEULING; VAN DEN HEUVEL; OTTENGRAF, 2000; STEWART, 2003). Em agregados microbianos espessos, grandes distâncias difusionais afetam o transporte de solutos de/para as células bacterianas interiores. Nestas situações formam-se gradientes de solutos no biofilme e a transferência de massa torna-se um processo limitante para os bioprocessos (LEVI et al., 2017; SCHRAMM et al., 1999). Limitações de transferência de massa, que impedem a penetração de antibióticos, foram apontadas como possível causa para a resistência a antibióticos (GBEJUADE et al., 2016; LEVI et al., 2017). Nestes ambientes de gradientes de concentração formados constitui-se micronichos em biofilmes propícios à proliferação de organismos anaeróbios, apesar da presença de oxigênio em solução no meio líquido (DE BEER; SRINIVASAN; STEWART, 1994; LEVI et al., 2017; SCHRAMM et al., 1999).

Da mesma forma que cada cidade pode ser identificada por uma arquitetura característica o biofilme também pode apresentar-se de diferentes formas. A estrutura de cada cidade é extremamente única por conta de como se deu o seu desenvolvimento desde sua fundação até os dias de hoje. Com biofilmes, o processo é similar, contudo os verdadeiros arquitetos atuantes no processo são os micro-organismos. Por estrutura de biofilmes entende-se (1) a forma tridimensional do agregado em conjunto com (2) a distribuição espacial das substâncias imobilizadas, tanto bióticas como abióticas. A estrutura pode então ser descrita por meio de propriedades morfológicas, tais como a

espessura do biofilme, densidade do biofilme e forma da superfície do biofilme. A forma do biofilme define a forma da interface biofilme/líquido através da qual todo o transporte de massa de solutos ocorre, e as distâncias difusionais que definem micro-ambientes. A distribuição espacial de substâncias imobilizadas se deve à distribuição espacial de exopolissacarídeos, células bacterianas (possivelmente de diferentes espécies) e eventualmente de partículas inorgânicas (HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004). Sendo assim é possível dizer que cada comunidade microbiana é única e a estrutura de biofilmes pode demonstrar elevada heterogeneidade espacial e temporal (LEVI et al., 2017; STOODLEY et al., 1999). A figura a seguir ilustra essa massa de aglomerado celular envolto por uma matriz e sua característica amorfa (Figura 2).

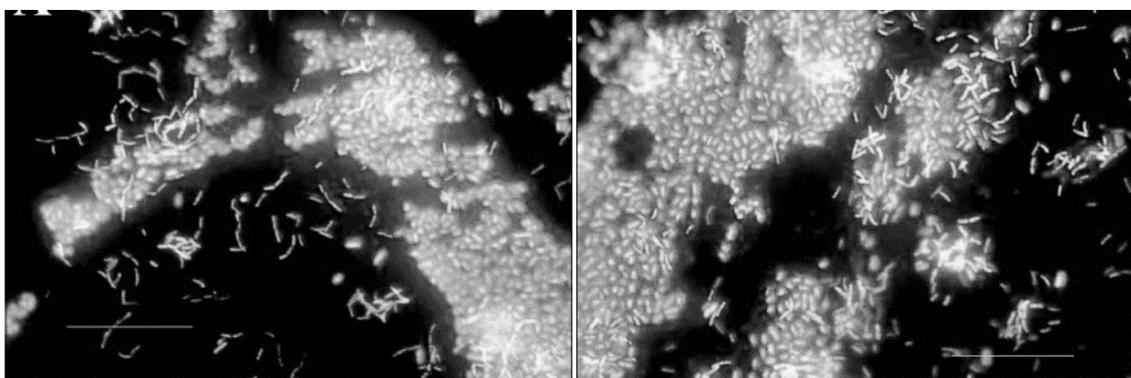


Figura 2. Microscopia epifluorescente de biofilmes polimicrobianos.

Biofilmes cultivados por 7 dias em superfícies de aço inoxidável, corados com 4,6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) e registrados por microscopia de epifluorescência. Observa-se as densidades celulares retidas em uma matriz extracelular. (DONLAN, 2002).

Portanto, a estrutura de biofilmes tem um papel muito importante para a sobrevivência dos micro-organismos. Em conjunto com as condições hidrodinâmicas e fornecimento de nutrientes via difusão, a estrutura é definida pela atividade do biofilme: crescimento das células microbianas e sua divisão, produção e secreção de exopolissacarídeos, fatores externos como forças de atrito tais como hidrodinâmica e outras forças mecânicas.

1.2.2 Aplicações e complicações dos biofilmes

O fenômeno do biofilme impacta uma ampla gama de indústrias, incluindo a indústria do petróleo, de especialidades químicas, da saúde, de

produtos domésticos, de água potável, mineração e utilidades (TIJHUIS; VAN LOOSDRECHT; HEIJNEN, 1994). Como resultado, várias áreas têm os biofilmes como foco: quer para impedir infecções relacionadas com biofilmes ou a sua acumulação indesejada em equipamento industrial, quer para influenciar o desenvolvimento e atividade de um biofilme para uma aplicação bioindustrial particular. O espectro de técnicas utilizadas para a investigação dos biofilmes é igualmente vasto, de acordo com o elevado número de áreas científicas envolvidas, e vai desde vários métodos de microbiologia molecular aplicados a biofilmes mono-específicos cultivados em laboratório, até à utilização de micro-sensores para o estudo de tapetes de algas (LARKUM; KOCH; KÜHL, 2003), passando pela utilização de reatores em escala industrial (TIJHUIS; VAN LOOSDRECHT; HEIJNEN, 1994).

Os biofilmes têm grande importância em estações de tratamento de águas ou de efluentes que removem organismos patogênicos e reduzem a quantidade de matéria orgânica na água através de interação com biofilmes (XAVIER et al., 2003), bioprocessos também utilizam biofilmes tais como a produção de vinagre (BOLETTI, 1921), produção de ácido cítrico (SAKURAI et al., 1997), aplicações farmacêuticas através da produção de metabólitos secundários (OKITA; KIRWAN, 1986), e processos biológicos para a extração de metais a partir de minério (RAWLINGS, 2002).

Em contrapartida, biofilmes também apresentam um impacto negativo. A biocorrosão em equipamentos, contaminação de produtos, perdas energéticas relacionadas com o aumento de atrito, resistência acrescida à transferência de calor e perdas de pressão são alguns dos efeitos adversos da acumulação de biofilmes microbianos (JASS; WALKER, 2000). Há também a acumulação de biofilmes nos cascos de navios que é responsável pelo aumento de atrito e consequentes gastos de combustível (COOKSEY; WIGGLESWORTH-COOKSEY, 1995; SCHULTZ; SWAIN, 2000; WALKER et al., 1995). Numerosas doenças infecciosas, tais como fibrose cística, estão relacionadas com biofilmes, visto que os mesmos podem ocorrer associado a tecidos vivos (COSTERTON, 1999). São comuns infecções causadas pela utilização de dispositivos médicos em ambientes clínicos, tais como cateteres e que estão

de igual modo relacionadas com biofilmes (DONLAN, 2001). Isto é recorrente com biofilmes formados pela *Pseudomonas aeruginosa*, uma espécie modelo presente em diversos ambientes, desde hospitalar até em poços de petróleo, sendo muito reconhecida como causadora da fibrose cística no qual seu biofilme cresce em associação com tecidos do sistema respiratório (COSTERTON, 1999).

A matriz de polímeros extracelulares (EPS), mantém a coesão do biofilme e é responsável pela persistência das infecções relacionadas com biofilmes (COSTERTON; GEESEY; CHENG, 1978; SIMÕES; PEREIRA; VIEIRA, 2003). A EPS protege os micro-organismos de antibióticos de forma eficiente, já que estudos experimentais *in vitro* revelam que células plactônicas em biofilmes são mais resistentes a antibióticos do que células da mesma espécie no estado planctônico (CERI et al., 2001). Além disso, há resistência acrescida a métodos de desinfecção e limpeza com os biofilmes comparando com células bacterianas livres (SIMÕES; PEREIRA; VIEIRA, 2003). Sendo assim os métodos convencionais de desinfecção não são suficientes e requerem por vezes doses elevadas de desinfetante o que gera uma desvantagem pelo ponto de vista ambiental (JASS; WALKER, 2000).

1.3 **Quorum Sensing**

Como forma de estabelecer uma nova colônia, é necessária uma comunicação entre as células de forma que as mesmas possam adequar seu metabolismo conforme o estágio de densidade celular. Através de interações intercelulares, tanto sociais como físicas, juntamente com as propriedades da matriz, o estilo de vida dentro do biofilme é claramente distinto das células bacterianas de vida livre (FLEMMING et al., 2016). Desenvolvendo a alegoria da cidade (WATNICK; KOLTER, 2000), um condomínio só funciona bem caso haja uma comunicação entre os moradores para criar novos espaços coletivos. Para as células o funcionamento é o mesmo, contudo a comunicação se dá por moléculas pertencentes aos sistemas de *Quorum Sensing* (QS). Esta é uma ferramenta essencial para a detecção e adaptação às novas condições

ambientais. Micro-organismos são capazes de detectar uma variedade de pistas temporais e espaciais, e respondê-los com cascatas de transdução de sinal que promovem mudanças na expressão gênica, portanto alterando o comportamento celular. Justamente essa capacidade de resposta a um ambiente dinâmico demonstra que bactérias são capazes de sobreviver em situações favoráveis, neutras e hostis (BASSLER; MILLER, 2013; VAN KESSEL et al., 2015).

Um modelo de comunicação microbiana no gênero *Pseudomonas*, exemplificado na figura seguinte, vem de bactérias de colonização de raízes vegetais que empregam sistemas QS dependentes de moléculas sinalizadoras: as N-Acilhomo-serina lactonas (AHL), para expressar genes de forma dependente da densidade celular (ELASRI et al., 2001; PIERSON et al., 1998). Esse modelo sistema QS em bactérias Gram-negativas possui dois componentes reguladores principais. Um deles é a proteína ativadora da transcrição (proteína receptora) que recebe o sinal da molécula autoindutora, produzida pela sintetase. A recepção de sinal dos autoindutores é dependente da densidade celular, ou seja, ocorre quando se atinge um nível específico. Dessa forma, o indutor se liga e ativa a proteína receptora a qual altera a expressão gênica (DE KIEVIT; IGLEWSKI, 2000). A Figura 3 demonstra essa relação dependente de densidade celular para detecção de AHLs

● = Autoindutor AHL
 ■ = Receptor (Fator de transcrição)

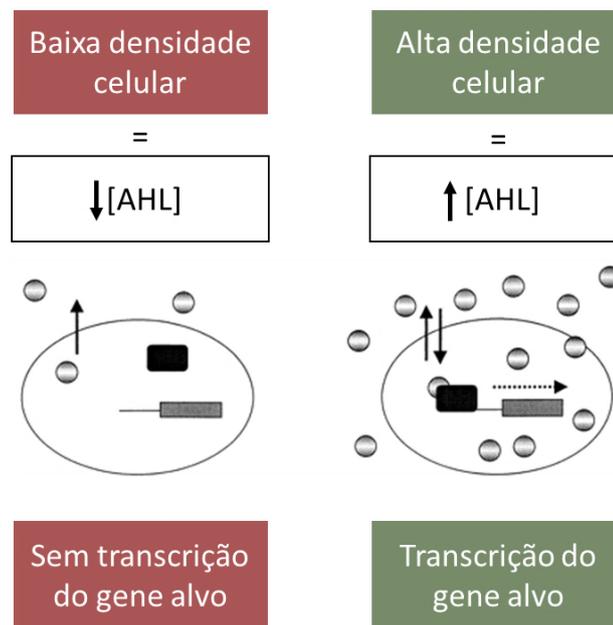


Figura 3. Mecanismos essenciais ao sistema *Quorum sensing*.

QS de *P. aeruginosa* e Gram-negativas envolve dois componentes reguladores: a proteína ativadora da transcrição (proteína receptora) e a molécula do autoindutora produzida pela sintetase. O acúmulo de autoindutores ocorre de forma dependente da densidade celular até atingir um nível específico. Neste momento, o indutor se liga e ativa a proteína receptora (R), que por sua vez altera a expressão gênica (DE KIEVIT; IGLEWSKI, 2000).

Estudos envolvendo cepas mutantes incapazes de produzir AHL revelaram variação na arquitetura de biofilmes. Ao suplementar cepas mutantes com moléculas sinalizadoras AHL, o biofilme mutante, não estruturado e homogêneo, converteu-se em um biofilme semelhante ao selvagem, estruturado e com canais. Esses resultados sugerem que o sistema QS influencia o desenvolvimento estrutural do biofilme (AREVALO-FERRO et al., 2005; STEIDLE et al., 2001). De forma geral, com densidades populacionais suficientes, os sinais atingem as concentrações necessárias para a ativação de genes envolvidos na diferenciação do biofilme. Como os mutantes não apresentavam essa sinalização, sua expressão gênica não era alterada o que acarretava em um biofilme não estruturado para essas cepas (STICKLER et al., 1998).

A sinalização célula-célula não é exclusiva de uma única espécie. Um exemplo são certas bactérias da placa dentária que podem modular a expressão dos genes de outras espécies com as quais formam o biofilme (XIE et al., 2000). Isto demonstra o alto grau de complexidade do QS, de forma que o equilíbrio da expressão gênica é fortemente regulado para se adequar às condições do ambiente e da vizinhança, assim como na “cidade” em que os habitantes constantemente se adaptam a novas circunstâncias. Não apenas para alterar a expressão gênica, o QS também altera a competência genética, ou seja, a captação e incorporação de DNA exógeno por meio da transformação. Dados da literatura demonstram que frequências de transformação apresentam-se 10-600 vezes maiores nos biofilmes do que as células planctônicas (LI et al., 2001).

Atualmente, busca-se criar uma era pós-antibióticos em que diferentes estratégias de combate a patógenos se fazem necessárias. Sendo assim, estão sendo desenvolvidos produtos que tem como alvo justamente o impedimento dessa comunicação entre células, seja específico para uma espécie ou de amplo espectro (BASSLER; SWEM, 2013; NG et al., 2012; PACZKOWSKI et al., 2017).

Não apenas acerca do aspecto de saúde pública, o QS também tem impacto na geração de energia, tratamento de água e desnitrificação. *P. aeruginosa*, por exemplo, é de grande importância nos processos de tratamento de águas residuais devido à sua alta capacidade de biodegradação de muitos compostos orgânicos. Vários sistemas QS que controlam várias funções biológicas de *P. aeruginosa* foram identificados. Há diferentes sistemas QS que se organizam de forma hierárquica controlando fisiologias bacterianas, expressão de determinantes de virulência, metabólitos secundários, motilidade crescente e formação de biofilmes assim como os processos biológicos associados à poluição biodegradável e geração de eletricidade (YONG et al., 2015).

Os processos de tratamento de água residuais dependem de atividade microbiana para decompor matéria orgânica. O lodo ativado inclui um grande

número de micróbios com alta densidade celular, portanto demandando uma complexa comunicação célula-célula bacteriana nesse biofilme. Sendo assim o entendimento do funcionamento do QS permite regular funções e estruturas das comunidades microbianas em lamas ativadas (YONG et al., 2015). Com relação à biorremediação, compostos aromáticos, generalizados em solos, sedimentos e águas, são uma categoria importante de poluentes ambientais persistentes, que demandam preocupação ambiental devido à sua toxicidade, carcinogenicidade e mutagenicidade (CAO; NAGARAJAN; LOH, 2009; PENG et al., 2008). Portanto, a utilização de micro-organismos com sua capacidade de degradação de compostos aromáticos é essencial para a biorremediação.

1.4 Motilidade celular

A forma como as bactérias regulam, montam e giram seus flagelos para nadar em meios líquidos é bem compreendida. O foco da bacteriologia está migrando da vida planctônica para superfícies, o que aumenta o interesse pela motilidade celular (KEARNS, 2010). Porém, a forma como algumas bactérias usam flagelos para deslocar-se sobre superfícies sólidas em uma forma de movimento designada *swarming* ainda não é bem compreendido. A motilidade de *swarming* é definida como um comportamento multicelular caracterizado pelo ágil deslocamento sobre uma superfície sólida ou semi-sólida com o movimento flagelar, como pode ser visto na Figura 4.

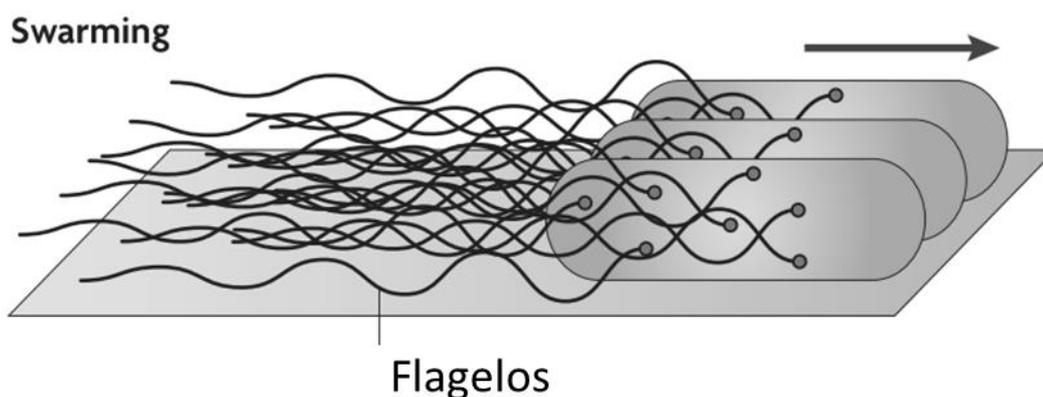


Figura 4. Motilidade celular do tipo *swarming*.

Swarming é o movimento multicelular das bactérias em uma superfície e é alimentado por flagelos helicoidais rotativos (KEARNS, 2010).

A definição da motilidade por *swarming*, não enfatiza o que permanece desconhecido sobre esse comportamento nem a variedade de fenótipos obtida (KEARNS, 2010). É importante destacar a possibilidade da existência de motilidade independente de flagelos, mas depende de surfactantes para reduzir a tensão superficial. Sendo assim, a pressão do crescimento celular desloca as colônias que deslizam sobre o surfactante (BE'ER et al., 2009; KINSINGER; KEARNS; FALL, 2005; MATSUYAMA; BHASIN; HARSHEY, 1995; MATSUYAMA; KANEDA; NAKAGAWA, 1992; MURRAY; KAZMIERCZAK, 2008). Isso mostra como o surfactante facilita o deslocamento celular.

O *swarming* parece ser conservado em Proteobacteria restrito a três grupos, α , β e γ , na qual estão incluídas a *P. aeruginosa* e a *B. thailandensis*. Essa motilidade exige muita energia e condições específicas dependentes do organismo em questão e como seu metabolismo está otimizado. Além disso, os flagelos obviamente são o requisito mais importante e, juntamente com um aumento na biossíntese flagelar, demanda-se um aumento nas interações célula-célula e na produção de um surfactante. (KEARNS, 2010).

Muitas bactérias produzem moléculas anfipáticas que reduzem a tensão entre o substrato e a célula bacteriana, os chamados biossurfactantes (KEARNS, 2010). A Figura 5 apresenta a estrutura de diversos tipos de surfactantes produzidos por bactérias e envolvidos na motilidade de *swarming*.

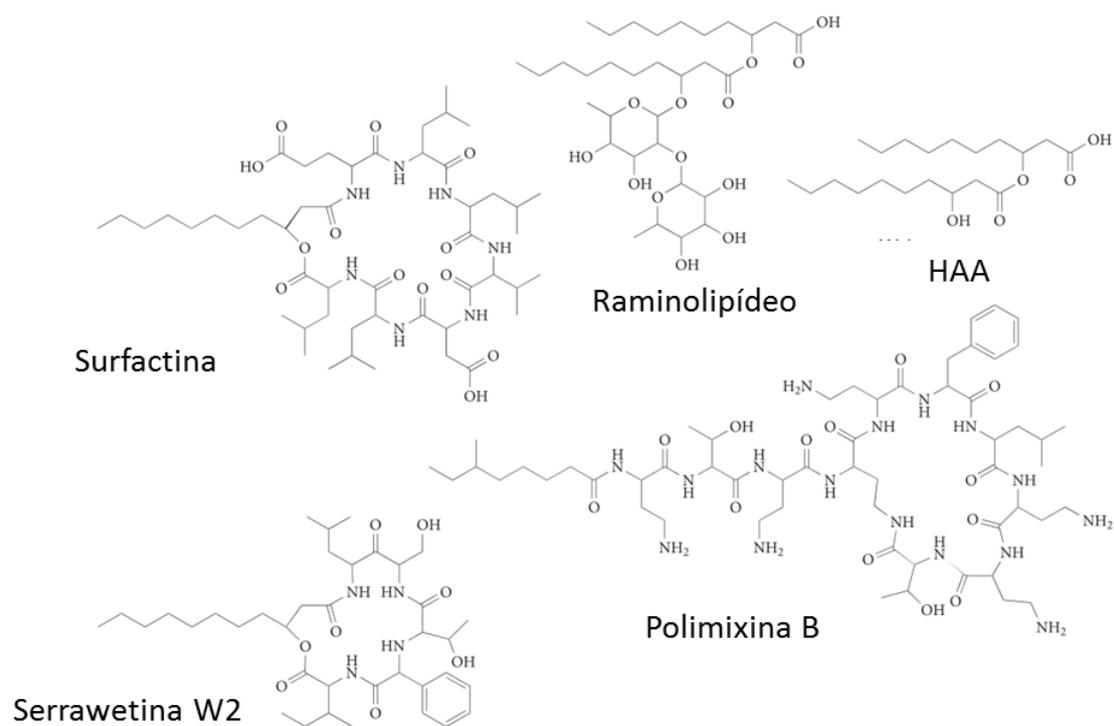


Figura 5. Biossurfactantes bacterianos.

Estruturas de surfactantes produzidos por bactérias e envolvidos no deslocamento do tipo *swarming* (KEARNS, 2010). Destaque para os raminolipídeos que são compartilhados entre as espécies *P. aeruginosa* e *B.thailandensis*.

Os surfactantes aparentam ser a camada lípida e aquosa das células na frente do *swarm* (ALBERTI; HARSHEY, 1990; JULKOWSKA et al., 2004; KEARNS; LOSICK, 2003; RASHID; KORNBERG, 2000; SENESI et al., 2002). O QS regula a produção de biossurfactantes, pois os mesmos são compartilhados pela comunidade e são eficazes somente em alta concentração. Potencialmente a evolução do QS sobre a produção de surfactantes é uma forma de garantir a produção somente quando houver bactérias suficientes para tornar o gasto benéfico (ANTHONI; LINDUM, 1998; EBERL et al., 1996; KEARNS, 2010; MAGNUSON; SOLOMON; GROSSMAN, 1994; OCHSNER; REISER, 1995). Isto pode ser visto na regulação de raminolipídeos por *P. aeruginosa* em que o QS determina a produção de surfactantes pelas bactérias (DOBLER et al., 2016; REIS et al., 2011).

As bactérias que realizam *swarming* formam padrões de colônias macroscópicas em meios sólidos. Os padrões podem assumir formas diferentes, mas a relevância de qualquer padrão específico ainda não está

elucidada e provavelmente todas as bactérias são capazes de produzir uma variedade de padrões. Portanto, a formação de padrões pode ser um começo na regulação do *swarming* e um indicador de fatores ambientais (HIRAMATSU et al., 2005; SHIMADA et al., 2004). A Figura 6 ilustra alguns padrões de *swarming* em meio semi-sólido para melhor elucidação de padrões de *swarming*.

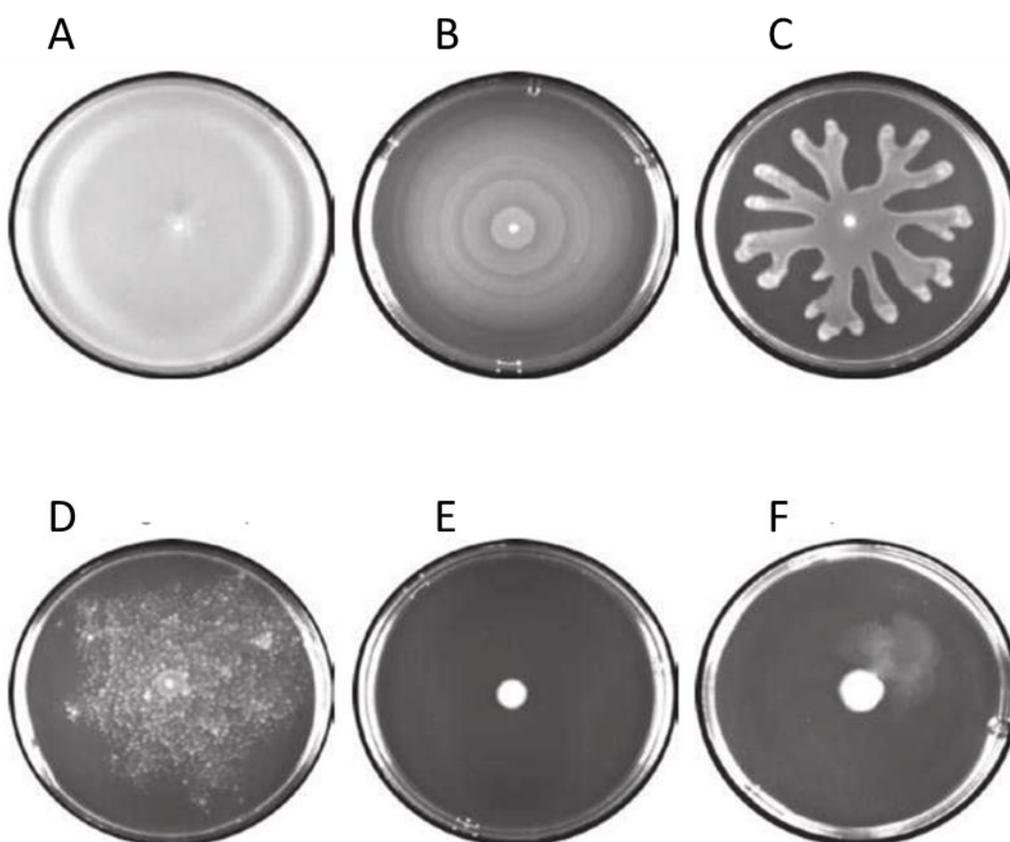


Figura 6. Padrões de formação de colônias.

Os diferentes padrões de formação de colônias podem ser extremamente variados, contudo todos são dependentes da motilidade de *swarming*. A) *Swarm* formado por *Bacillus subtilis* str. 3610; B) O padrão de olho de touro formado por *Proteus mirabilis* str. PM7002; C) Dendritos formados por *Pseudomonas aeruginosa* str. PA14; D) Um vórtice formado por *Paenibacillus vortex* str. V; E) Um isolado mutante sem *swarm* de *B. subtilis* str. 3610; F) Um isolado mutante sem *swarm* de *B. subtilis* str. 3610 com um alargador de supressor mutante à esquerda do local de inoculação (KEARNS, 2010).

O estudo da motilidade ainda precisa ser mais aprofundado, contudo é inegável a sua importância juntamente com a formação de biofilme e o QS na fisiologia do comportamento multicelular em bactérias. Novos mecanismos bioquímicos se fazem necessários para conectar os fenótipos de motilidade a

outras fisiologias celulares mais elucidadas. Contudo, ainda sem essa conexão clara, o *swarming* oferece uma visão citológica da complexidade das relações na “cidade” bacteriana.

1.5 Surfactantes

1.5.1 Visão geral da molécula

Surfactantes são moléculas ativas em superfícies e interfaces, por conta de suas características anfipáticas. Possuem uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica, sendo solúveis tanto em solventes polares quanto apolares e reduzem a tensão interfacial entre duas fases líquidas tais como óleo e água. Como consequência disso, os surfactantes podem apresentar papel detergente, emulsificante, espumante e dispersante, caracterizando-se assim como um grupo de moléculas versáteis (RAZA et al., 2010). Seu uso já é uma prática bem estabelecida, especialmente na indústria do petróleo (AL-MAJED; ADEBAYO; HOSSAIN, 2012) que inclui a recuperação de óleos dos reservatórios, a limpeza das plataformas e a biorremediação de solos (RODRIGUES, 2011; SANTOS et al., 2002), inclusive no caso de derramamento de petróleo (DESAI; BANAT, 1997), onde são apresentados como uma das formas mais efetivas no tratamento de grandes áreas (AL-MAJED; ADEBAYO; HOSSAIN, 2012).

Os produtos cosméticos e de higiene pessoal, incluindo creme dental, shampoo, cremes e maquiagem geralmente são formulados com surfactantes à base de petróleo. Porém, nos últimos anos a tendência de consumo de produtos "verdes" e a conscientização da sustentabilidade vem induzindo a substituição de agentes tensoativos de origem não renovável como é o caso do petróleo por agentes tensoativos naturais, os chamados biossurfactantes (FERREIRA et al., 2017). Como a maioria dos surfactantes atualmente utilizados são produzidos a partir de matérias-primas petroquímicas, os biossurfactantes de origem microbiana são vistos como uma alternativa sustentável e ambientalmente benéfica pois são biodegradáveis e não tóxicos em comparação com os surfactantes químicos sintéticos produzidos *in vitro*.

1.5.2 Biossurfactantes

Como resultado da industrialização global e do aumento da população, houve um aumento alarmante das demandas globais de energia explorando os hidrocarbonetos. Com isso, grandes quantidades de hidrocarbonetos e derivados são liberados para o meio ambiente, ameaçando a saúde e a sustentabilidade do ecossistema. Os ambientes contaminados com hidrocarbonetos servem como um reservatório de micro-organismos capazes de degradá-los e produzir biossurfactantes. Os micro-organismos que crescem nesses ambientes sofreram muitas adaptações incluindo a produção de biossurfactantes como forma de ampliar o acesso a esses substratos hidrofóbicos (JOY SAM, BUTALIA TANVI, SHARMA SHASHI, 2017). Os surfactantes de origem biológica produzidos por bactérias formadoras de biofilmes também reduzem a tensão superficial ou interfacial dos líquidos e atuam como emulsionantes, agentes espumantes e dispersantes com baixa toxicidade, estão encontrando aplicações crescentes na biotecnologia e conduzindo a busca de novos compostos para uma maior exploração nas indústrias de biotecnologia, farmacêutica, engenharia de alimentos, biorremediação e biohidrometalurgia (FECHTNER et al., 2017; PEELE; CH; KODALI, 2016). Comercialmente existem três biossurfactantes disponíveis, os raminolipídeos, soforolipídios e surfactina. No entanto, os raminolipídeos são os únicos aprovados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) para aplicação em produtos alimentícios, cosméticos e farmacêuticos (NITSCHKE; COSTA; CONTIERO, 2005).

O alto custo de produção dos biossurfactantes ainda limita as suas utilizações em larga escala. Para diminuir seu custo é necessário entender melhor o metabolismo dos micro-organismos produtores (RAZA et al., 2010). Sendo assim, a engenharia metabólica vem sendo utilizada para melhoramento e construção de cepas produtoras, concentrando-se especialmente na manipulação de genes ligados, direta ou indiretamente, às vias biossintéticas destas moléculas (RAZA et al., 2010).

Um grande destaque dos biossurfactantes é a produção a partir de fontes renováveis e com características físico-químicas semelhantes aos

surfactantes químicos. Entre os biossurfactantes produzidos e comercializados, destacam-se os raminolipídeos que são produzidos principalmente por bactérias dos gêneros *Pseudomonas* (DAVEY; CAIAZZA; TOOLE, 2003) e *Burkholderia* (DUBEAU et al., 2009; TAVARES et al., 2013) tidos como promissores para aplicação comercial devido a sua versatilidade e eficiência.

1.5.3 Raminolipídeos

A classificação dos raminolipídeos é dentro dos glicolipídeos aniônicos, ou seja, detém moléculas de raminose na porção hidrofílica e ácidos 3-hidroxicanoicos na porção hidrofóbica. Podem ser produzidos a partir de uma variedade de substratos como fonte de carbono e diferentes linhagens de bactérias podem realizar sua biossíntese, no entanto, a principal espécie produtora é *P. aeruginosa* (ABDEL-MAWGOUD; LÉPINE; DÉZIEL, 2010).

Acerca da estrutura, são tipicamente dímeros de ácidos graxos (uma ou duas moléculas de ácido β -hidroxidecanoico), ligados a mono ou dirraminose. Em *P. aeruginosa* é observada a produção de dois subgrupos de raminolipídeos: L-raminosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato e L-raminosil-L-raminosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato também chamados respectivamente de mono e dirraminolipídeos e representados na Figura 7.

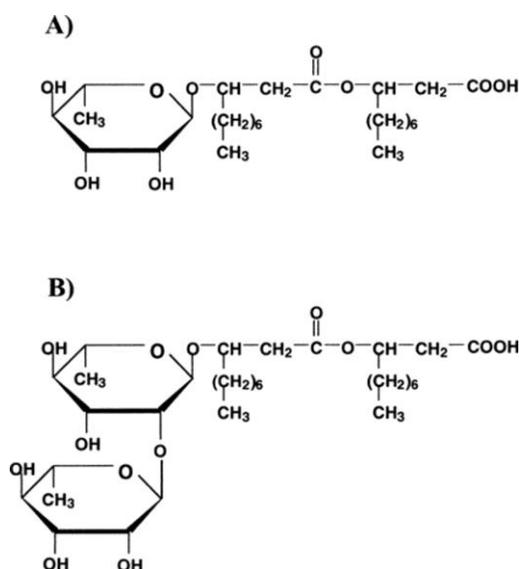


Figura 7. Estrutura de Raminolipídeos.

Monoramminolipídeo (A) e Dirraminolipídeo (B) (OLVERA et al., 1999).

Sabe-se que os raminolipídeos atuam em processos como a assimilação de substratos insolúveis, como hidrocarbonetos (BEAL; BETTS, 2000; ITOH; SUZUKI, 1972; ZHANG; MILLER, 1994), na motilidade celular (KEARNS, 2010), na atividade antimicrobiana (ABALOS et al., 2001; WANG et al., 2005) e na atividade hemolítica (FUJITA; AKINO; YOSHIOKA, 1988)

Com relação à produção de surfactantes, *P. aeruginosa* apresenta uma produção elevada de raminolipídeos e logo se tornou modelo de estudo para se compreender a produção dos biosurfactantes. A biossíntese e a bioquímica dos raminolipídeos têm sido amplamente estudadas, porém sua função exata ainda não está clara. São moléculas com múltiplos papéis, desde a absorção de substratos hidrofóbicos (AL-TAHHAN; SANDRIN; BODOUR, 2000; BEAL; BETTS, 2000; NOORDMAN; JANSSEN, 2002) até alteração de polaridade da superfície celular (AL-TAHHAN; SANDRIN; BODOUR, 2000; CHEN; ZHU, 2005; DÉZIEL et al., 2003) além de atividades antimicrobianas contra outras bactérias (HABA et al., 2003) e podem perturbar os biofilmes de *Bordetella bronchiseptica* (JAEGER et al., 1997). Nos biofilmes de *P. aeruginosa*, acredita-se que raminolipídeos atuem na manutenção de canais de fluidos e o desprendimento de células da comunidade de biofilmes (BOLES; THOENDEL; SINGH, 2005; DAVEY; CAIAZZA; TOOLE, 2003; ESPINOSA-URGEL, 2003). Além disso, atuam como fatores de virulência afetando a função ciliar traqueal normal (READ et al., 1992), inibindo a resposta fagocítica dos macrófagos (MCCLURE; SCHILLER, 1996) e atuando como hemolisinas resistentes ao calor (JOHNSON; BOESE-MARRAZZO, 1980). A motilidade crescente da *P. aeruginosa* é afetada por pelos surfactantes, provavelmente por uma redução da tensão superficial, o que provoca o condicionamento superficial necessário para uma colonização eficiente (DÉZIEL et al., 2003; MATSUYAMA; NAKAGAWA, 1996), dessa forma uma infecção começa a se propagar no hospedeiro. Um dos principais problemas na utilização de *P. aeruginosa* para produzir biosurfactantes em escala industrial é a necessidade de plantas industriais adequadas, por conta da preocupação com biossegurança pela presença do patógeno oportunista.

Uma maneira de evitar este problema é a utilização de bactérias não patogênicas para a produção do biossurfactante de interesse. *Burkholderia* é um gênero próximo de *Pseudomonas* com espécies capazes de produzir os raminolipídeos, tanto patogênicas como *B. pseudomallei*, causadora da melioidosis, como não patogênicas como *B. thailandensis*, originalmente isolada em campos de arroz (DUBEAU et al., 2009; FUNSTON et al., 2016). Além de conter o genoma sequenciado, *B. thailandensis* contém poucas restrições no uso de marcadores de antibióticos para manipulação genética (DUBEAU et al., 2009).

1.5.4 Proteínas atuantes na biossíntese de raminolipídeos

Com os genomas sequenciados, foi possível identificar genes homólogos aos de *P. aeruginosa* responsáveis pela síntese de raminolipídeos em *B. thailandensis*. Essa comparação de genes está ilustrada na Figura 8 em que se indicam os genes responsáveis pelas enzimas da via metabólica de síntese de raminolipídeos. A síntese ocorre inicialmente pela enzima RhlA que gera ácidos 3-hidroxiálcânóicos que são utilizados pelo produto de *rhlB* (raminosiltransferase I) como substratos para ligação de uma molécula de dTDP-L-raminose. O gene *rhlC*, codifica a expressão da raminosiltransferase II que adiciona uma segunda molécula de dTDP-L-raminose (BURGER; GLASER; BURTON, 1966; DOBLER et al., 2016; GLASER, 1963; RAHIM et al., 2001; TAVARES et al., 2013; ZHU; ROCK, 2008).

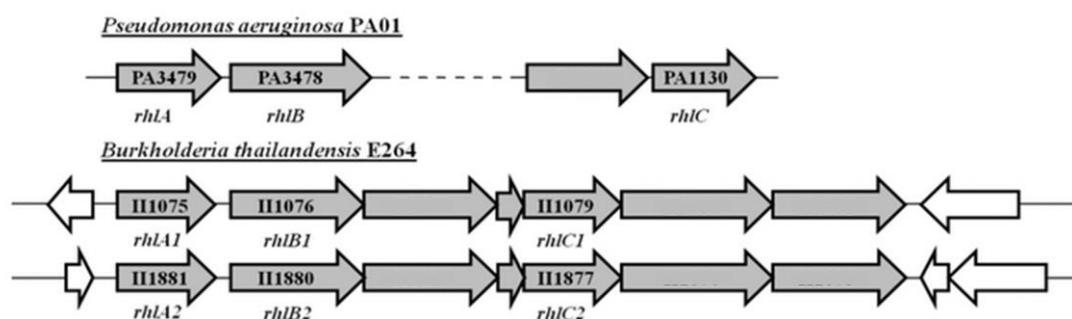


Figura 8. Conjunto genético de *P. aeruginosa* e *B. thailandensis*.

Arranjo genético de *rhlA*, *rhlB* e *rhlC* nos genomas de *P. aeruginosa* PA01 e genes homólogos *rhlA*, *rhlB* e *rhlC* em *B. thailandensis* E264. (DUBEAU et al., 2009).

Além das Rhl, outras proteínas influenciam a via metabólica dos raminolipídeos e seus subsequentes fenótipos. Um estudo feito com *P. aeruginosa* revelou a existência de uma proteína de membrana externa contendo um domínio estrutural de Barril- β , EstA, envolvida na produção de raminolipídeos (VAN DEN BERG, 2010; WILHELM et al., 2007). Devido à similaridade genética com *Pseudomonas* e sendo uma produtora de raminolipídeos, *B. thailandensis* se tornou uma forte candidata a conter um gene que codificaria uma enzima similar à EstA. Seu mecanismo exato não está bem elucidado, contudo seus efeitos são claros na produção de raminolipídeos, motilidade celular por *swarming* e na produção de biofilme (WILHELM et al., 2007).

1.6 Autotransportadoras e a EstA

Bactérias são dependentes da interação com o meio externo seja para a degradação de polímeros orgânicos macromoleculares, ou para o sistema QS, sendo assim, os sistemas de secreção de proteínas são essenciais para a sobrevivência celular. Diferentemente das bactérias Gram-positivas, que têm somente um compartimento intracelular e são capazes de secretar diretamente para o meio externo, as gram-negativas contêm o citoplasma e periplasma. Este último fica localizado entre as duas membranas, interna e externa. Sendo assim, a secreção de proteínas para o periplasma ou para o meio extracelular demanda mecanismos diferenciados dos encontrados em gram-positivas. Esses mecanismos são classificados de I a VI, dependendo do mecanismo e estrutura molecular envolvida.

O sistema de secreção do tipo V corresponde às proteínas autotransportadoras. A maioria das proteínas de membrana contém uma estrutura em Barril- β que fica inserida na membrana externa. O termo autotransportador foi primeiramente utilizado para investigar a protease IgA de *Neisseria gonorrhoeae* (KLAUSER; POHLNER; MEYER, 1993). Inicialmente se pensava que não haveria o envolvimento de outros fatores, sendo assim seriam proteínas que se autossecretavam. Contudo, estudos demonstraram

que o sistema BAM (*β -barrel assembly machinery*) é crucial para o mecanismo das autotransportadoras (KNOWLES et al., 2009, 2011; VAN ULSEN et al., 2014). Após a tradução, essas proteínas são reconhecidas pelo sistema Sec através do peptídeo sinal, o qual é clivado e a proteína liberada no espaço periplasmático. A partir desse ponto ocorre a interação com chaperonas presentes no periplasma que conduzem as autotransportadoras até a membrana externa. Caso a proteína seja secretada para o meio externo, deve haver a clivagem entre o domínio passageiro e o domínio Barril- β (BERNSTEIN, 2007, 2015). Este grupo é caracterizado pela sequência de um peptídeo sinal, um domínio passageiro N-terminal conectado a um domínio de Barril- β (BECKER et al., 2005; VAN ULSEN et al., 2014) ilustrado na Figura 9. Além disso, a estrutura dessas proteínas desperta interesse biotecnológico para a exibição de enzimas nas superfícies celulares bacterianas (BERNSTEIN, 2015). Apesar de sua importância, o mecanismo pelo qual os domínios de passageiros das autotransportadoras são expostos na membrana externa ainda não está claro. A visão clássica é que o domínio hidrofóbico do Barril- β fornece o canal através do qual o passageiro desdobrado se transloca, na parte extracelular (VAN DEN BERG, 2010).

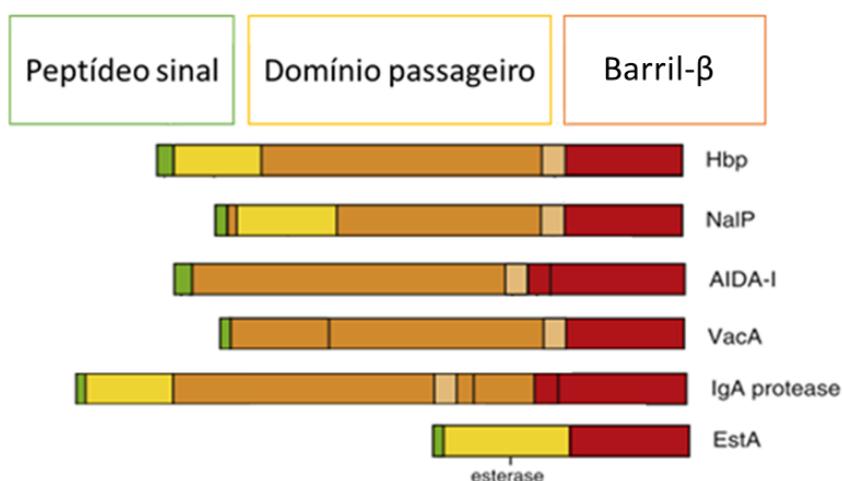


Figura 9. Estrutura básica das autotransportadoras.

Representação esquemática da organização de domínios autotransportadores que mostram uma organização geral de domínio tripartido com um peptídeo sinal (verde), um passageiro (amarelo-laranja) e um domínio β (vermelho) (VAN ULSEN et al., 2014).

A EstA, uma proteína autotransportadora, é uma das enzimas lipolíticas secretadas pela *P. aeruginosa* e se localiza na membrana externa (WILHELM et al., 1999). A Figura 10 ilustra a inserção do domínio β da EstA na membrana externa. As autotransportadoras predominantemente apresentam funções fisiológicas relacionadas à virulência (HENDERSON; NATARO, 2001). A EstA, é essencial para a virulência total em um modelo de rato de infecção respiratória crônica (POTVIN et al., 2003), contudo sua função exata ainda não está elucidada.

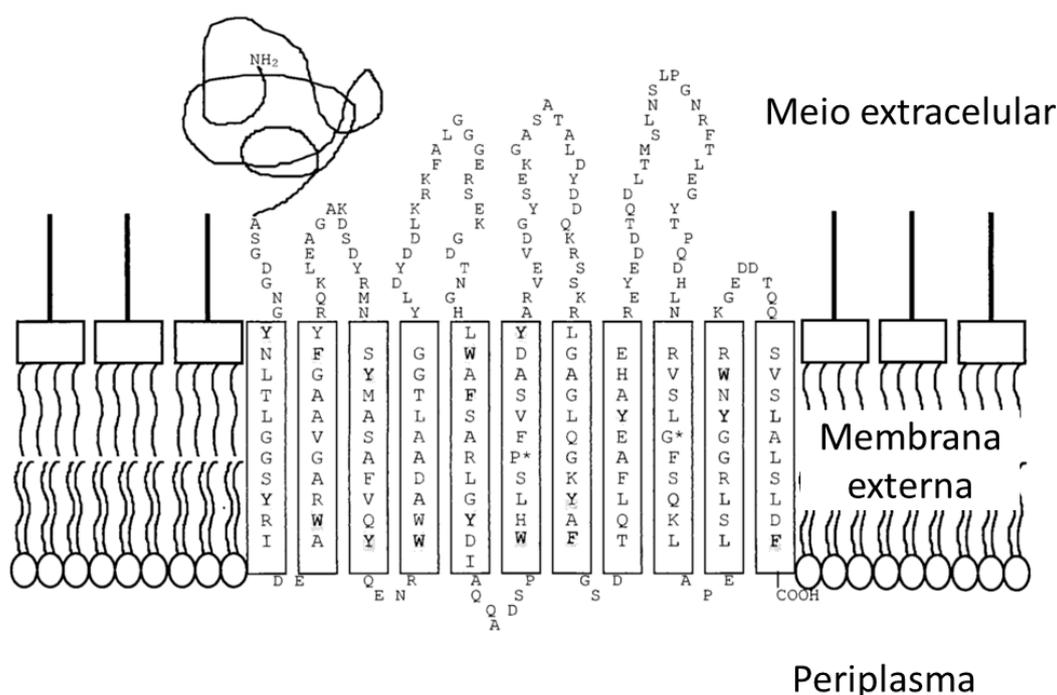


Figura 10. Modelo do domínio C-terminal da esterase EstA de *P. aeruginosa* localizado na membrana externa.

O domínio C-terminal consiste em 11 fitas beta com 10 a 12 resíduos de aminoácidos por cadeia. Os dois aminoácidos totalmente conservados em proteínas pertencentes à família de autotransportadores são marcados com asteriscos (WILHELM et al., 1999).

Existem duas razões principais para se estudar enzimas lipolíticas de *P. aeruginosa*: (i) seu importante papel como fatores de virulência e (ii) seu potencial biotecnológico (WILHELM et al., 1999). Somado a isso está a facilidade de se acessar o banco de dados dos genomas sequenciados e a possibilidade de se comparar sequências para se realizar uma predição gênica. A EstA possui seu domínio passageiro, membro da família de lipases GDSL,

não cortado após a translocação (AKOH et al., 2004) e programas de predição de estrutura secundária prevêm uma estrutura atípica para o domínio passageiro da esterase (VAN DEN BERG, 2010). A Figura 11 mostra as peculiaridades do domínio passageiro da EstA, rico em hélices, em comparação com outras autotransportadoras, com predomínio de estruturas β . Isto a coloca em uma posição de destaque única dentro dos grupos de mecanismos de secreção de autotransportadoras (BERNSTEIN, 2015). A EstA também é de interesse biotecnológico, pois tem sido usado para exibir várias proteínas em superfícies bacterianas (BECKER et al., 2005; VAN DEN BERG, 2010).

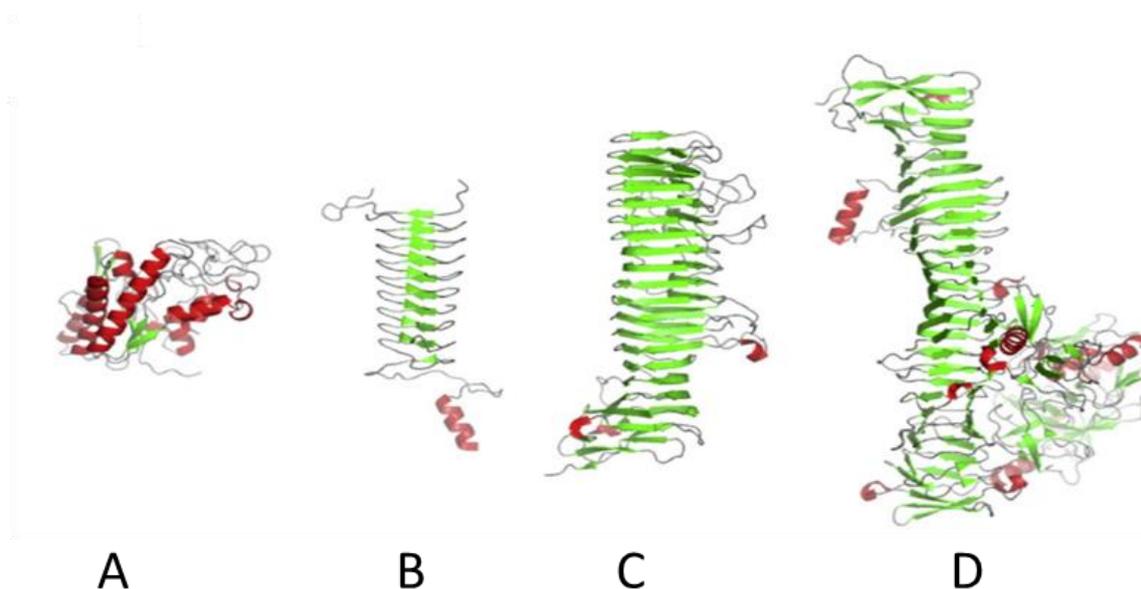


Figura 11. Comparação da estrutura do domínio passageiro.

(A) EstA, (B) YadA (PDB ID: 1P9H), (C) pertactina (PDB ID: 1DAB) e (D) Hbp (PDB ID: 1WXR). As hélices são de cor vermelha, as vertentes β são de cor verde e os laços são coloridos em cinza (VAN DEN BERG, 2010).

Além disso, mostrou-se recentemente que a EstA em *P. aeruginosa* é necessária para a produção de raminolipídeos, motilidade celular e formação de biofilmes. Sendo assim foram analisados fenótipos relacionadas ao biosurfactante em cepas de *P. aeruginosa* de tipo selvagem com um mutante *estA*-negativo e uma cepa superexpressando o *estA* em plasmídeo. A cepa mutante com deficiência da EstA produziu baixos níveis de raminolipídeos, enquanto a superexpressão de *estA* aumentou significativamente o rendimento

de surfactantes no sobrenadante. Além disso, a EstA se mostrou necessária para o *swarming* (WILHELM et al., 2007).

1.7 Interesse biotecnológico da EstA

As lipases também desempenham um papel importante em uma variedade de aplicações biotecnológicas (JAEGER; REETZ, 1998). Este potencial baseia-se na sua capacidade de catalisar a hidrólise de triglicerídeos e a sua síntese a partir de glicerol e ácidos graxos, que podem prosseguir com elevada especificidade e enantioselectividade. Em particular, a EstA de *P. aeruginosa* catalisa a conversão estereosseletiva de uma variedade de aminas, bem como álcoois primários e secundários (JAEGER et al., 1997). Estudos com essa lipase demonstram o princípio de criar um biocatalisador com alta enantioselectividade (REETZ et al., 1997).

O interesse na EstA consiste não apenas na sua atividade, mas também na forma como sua estrutura única se organiza. O *display* de proteínas na superfície celular possui aplicações biotecnológicas como a biocatálise de células inteiras e desenvolvimento de vacinas vivas. A via de secreção de autotransportadoras possui um grande potencial de exibição de superfície devido à sua estrutura modular e simplicidade (BECKER et al., 2005). Os polipeptídeos são constituídos por um sinal N-terminal, um domínio passageiro e uma unidade de translocação C-terminal ancorada em membrana. Dessa forma, através da engenharia genética, é possível modificar o domínio passageiro e exibi-lo na membrana externa de células com uma expressão heteróloga (NICOLAY; VANDERLEYDEN; SPAEPEN, 2015). Estudos com uma variante EstA foram realizados de forma que a estrutura do Barril- β foi utilizada como ancoragem de enzimas lipolíticas para a superfície celular de *Escherichia coli*. A atividade das lipases de *Bacillus subtilis* (LipA), *Fusarium solani pisi* (cutinase) e de *Serratia marcescens* (Lipase de *S. marcescens*; uma das maiores lipases conhecidas) foram exportados de forma eficiente pela autotransportadora EstA modificada (BECKER et al., 2005). A Figura 12 apresenta a estrutura genérica obtida pela manipulação da EstA.

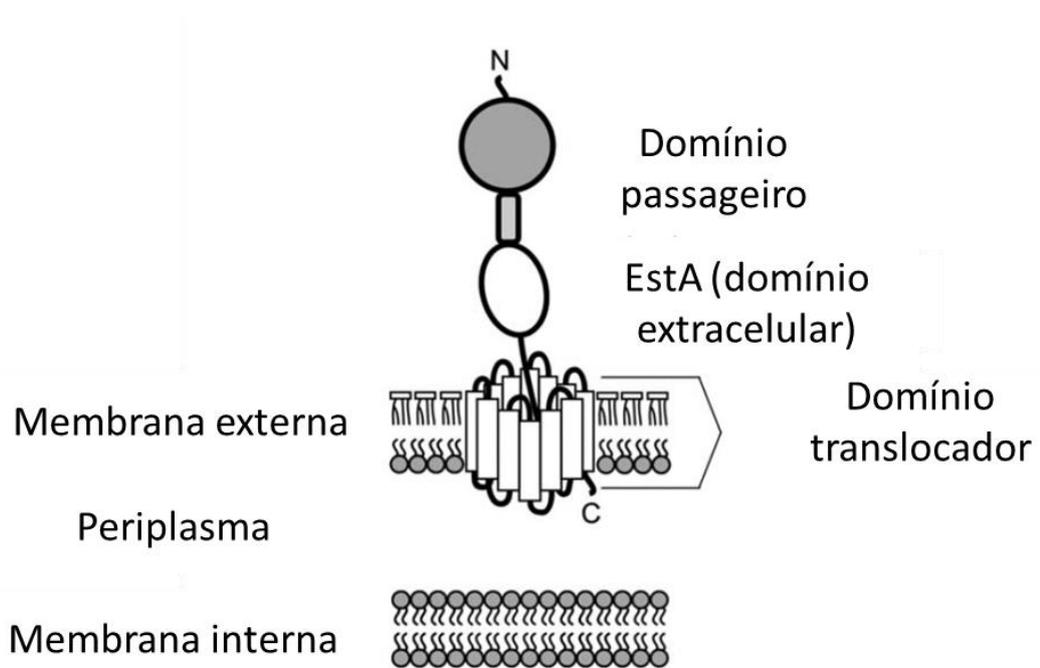


Figura 12. Desenho esquemático da construção EstA autotransportadora utilizada para a exibição de domínios de passageiros heterólogos.

EstA consiste em um domínio de translocador embutido na membrana externa e um domínio de esterase extracelular. Uma seqüência de epítipo de E-tag (GAPVPYPDP-LEPR) foi introduzida na junção do domínio extracelular EstA e do domínio do passageiro de forma a unir a estrutura (BECKER et al., 2005).

Portanto, estruturas das autotransportadora EstA, assim como de potenciais similares, podem ser redesenhadas com outros domínios passageiros e manter seu *display* na superfície celular. Isso leva à possibilidade de se obter biocatalisadores de células inteiras com atividade funcional (BECKER et al., 2005).

2 Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo o estudo estrutural e funcional de um gene de *B. thailandensis* E264, aqui denominado *orfE264*, que codifica uma possível proteína autotransportadora.

2.1 Objetivos específicos

1. Prospecção de autotransportadoras do tipo EstA, através da análise genômica por bioinformática
2. Caracterizar *in silico* a proteína autotransportadora codificada pela *orfE264*.
3. Construir uma cepa de *B. thailandensis* deficiente para a *orfE264*, e sua complementação com *orfE264* e com *estA*.
4. Caracterizar molecularmente o nocaute obtido da cepa deficiente para a *orfE264*
5. Comparação fenotípica quanto à formação de biofilmes para as diferentes linhagens em estudo
6. Comparar a motilidade celular do tipo *swarming* para as diferentes linhagens em estudo

3 Materiais e Métodos

3.1 Análises *in silico*

3.1.1 Prospecção de proteínas do tipo EstA

Foi realizada *a priori* uma prospecção de genes que codifiquem proteínas autotransportadoras no genoma da cepa de *B. thailandensis* E264 (ATCC 700388). Foi realizado uma busca de sequências similares à proteína EstA utilizando banco de dado biológicos Não Redundante através do algoritmo *blastx* (blast.ncbi.nlm.nih.gov), usando-se o e-value 10^{-5} como limite mínimo. Além da busca por similaridade de sequências, houve uma busca dos domínios de interesse nas espécies que compõe o gênero de *Burkholderia*. A busca foi feita através da ferramenta Interproscan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>) e ferramentas do site Integrated Microbial Genomes - IMG (img.jgi.doe.gov, CHEN et al., 2017). Depois utilizou-se a sequência de nucleotídeos da *estA* e comparou-se com os genomas de diferentes *Burkholderia* spp em busca de similaridade.

3.1.2 Identidade entre as sequências

As identidades entre as sequências foram obtidas a partir de diferentes *softwares*: Transporter classification Database (tcd.org) (SAIER et al., 2016; SAIER; TRAN; BARABOTE, 2006); pelo Clustal Omega 2.1 ([ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)) (LI et al., 2015; SIEVERS et al., 2011) e pelo Blast2 (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) (TATUSOVA; MADDEN, 1999). O SmartBlast da mesma plataforma foi utilizado para análise de alinhamentos e comparação com sequências do banco de dados. Como forma de se identificar a posição de domínio autotransportador, utilizou-se a ferramenta Smart (smart.embl.de).

3.1.3 Inferência filogenética

A partir dos resultados anteriores, gerou-se um arquivo multi-fasta com as sequências de potenciais autotransportadoras com similaridade a EstA pelo *software* MEGA 7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016). O alinhamento das sequências escolhidas foi feito através da ferramenta Muscle, do próprio

MEGA. O método utilizado para a construção da árvore filogenética foi o *Neighbour Joining* com valores de bootstrap 1000.

3.1.4 Predição de clivagem do peptídeo sinal

A predição da clivagem do peptídeo sinal foi realizada através do programa SignalP 4.1-CBS (PETERSEN et al., 2011) e Protter (<http://wlab.ethz.ch/protter>).

3.1.5 Modelagem *in silico*

A modelagem feita através do I-Tasser - ZhangLab (zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER) (ZHANG, 2008) como forma de se prever a estrutura da proteína putativa OrfE264 de *B. thailandensis* E264.

A visualização e análise das estruturas se deu através do PyMOL (pymol.org - The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC.), ferramenta gráfica molecular.

3.1.6 Inferência de sequências transmembranares

Estruturas secundárias das sequências foram obtidas através dos softwares Praline (ibi.vu.nl) e PSIPred (BUCHAN et al., 2013; JONES, 1999) em que através das características dos aminoácidos elaborou-se um modelo com a predição estrutural de inserção transmembranar.

3.2 Bactérias, plasmídeos e meios empregados

3.2.1 Meios de cultura empregados

Cepas bacterianas foram cultivadas em meio Luria Bertani (LB) líquido ou ágar caso não descrito em outra metodologia. LB (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) líquido foi composto por 1% (p/v) triptona (Difco Laboratories, Moseley, Reino Unido); 0,5% (p/v) extrato de levedura (Difco) e 0,5% (p/v) NaCl. O meio LB ágar consistiu no meio líquido suplementado com 1,5% (p/v) Bacto Agar (Vetec – Química Fina, Rio de Janeiro, Brasil). O meio foi esterilizado por autoclavação e armazenado à temperatura ambiente. Quando necessário, o meio foi suplementado com antibióticos ampicilina, tetraciclina, higromicina e

cloranfenicol (Sigma Aldrich) listados com suas concentrações finais de uso e marcadores de seleção na Tabela 1.

Tabela 1 Relação dos antibióticos utilizados no estudo e suas concentrações.

Antibiótico	Concentração
ampicilina	40 µg/mL
Tetraciclina	40 µg/mL
Higromicina	75 µg/mL
Cloranfenicol	34 µg/mL

Os estoques dos antibióticos de 40 mg/mL para tetraciclina e 34 mg/mL para cloranfenicol foram preparados em etanol; 75 mg/mL para higromicina foram preparados em água destilada estéril. Todas as soluções de antibióticos foram esterilizadas por filtração utilizando um filtro de 0,22 µm de abertura de malha.

3.2.2 Bactérias e plasmídeos empregados

Todas as cepas foram cultivadas em LB e armazenadas à -80°C em soluções estéreis de 20 % de glicerol (Vetec). As cepas bacterianas utilizadas nesse estudo estão listadas na Tabela 2.

Tabela 2 Relação das cepas utilizadas para o estudo.

Microrganismo	Descrição/Genótipo	Origem/Referência
<i>Escherichia coli</i> JM109	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17</i> (r_k^- , m_k^+), <i>relA1, supE44</i> , $\Delta(lac-proAB)$, [F' <i>traD36, proAB, laqI</i> ^q Z Δ M15]	Promega
<i>Burkholderia thailandensis</i> E264	Cepa Selvagem Gram negativa Produtora de raminolipídeos	Brett PJ, et al., 1998 ATCC [®] 700388 [™]
<i>Burkholderia thailandensis</i> E264 c/ pSIM18	Cepa contendo o plasmídeo com as recombinases do fago γ utilizada para o nocaute	Esse estudo
<i>Burkholderia thailandensis</i> $\Delta orfE264::Cm$	Cepa com nocaute em <i>orfE264</i> e inserção de Cm ^R	Esse estudo
<i>Burkholderia thailandensis</i> $\Delta orfE264::Cm$ c/ pUCP26_ <i>orfE264</i>	Cepa com nocaute em <i>orfE264</i> e inserção de Cm ^R complementada com <i>orfE264</i> contido em um plasmídeo pUCP26	Esse estudo
<i>Burkholderia thailandensis</i> $\Delta orfE264::Cm$ c/ pUCP26_ <i>estA</i>	Cepa com nocaute em <i>orfE264</i> e inserção de Cm ^R complementada com <i>estA</i> contido em um plasmídeo pUCP26	Esse estudo

Para a construção do plasmídeo contendo $\Delta orfE264::Cm$, ou seja, o gene da proteína nocauteado com uma deleção e uma inserção do gene que confere resistência ao cloranfenicol na sequência, foi utilizado o shuttle vector pBlueScript-SK (New England Biolabs, Ipswich-Massachusetts, EUA). O vetor foi clivado com as enzimas de restrição *Bam*HI e ligado com o trecho $\Delta orfE264::Cm$ sintetizado quimicamente com o mesmo sítio de restrição do

plasmídeo pBlueScript-SK. A Figura 13 ilustra o processo de construção do plasmídeo a partir do gene sintético.

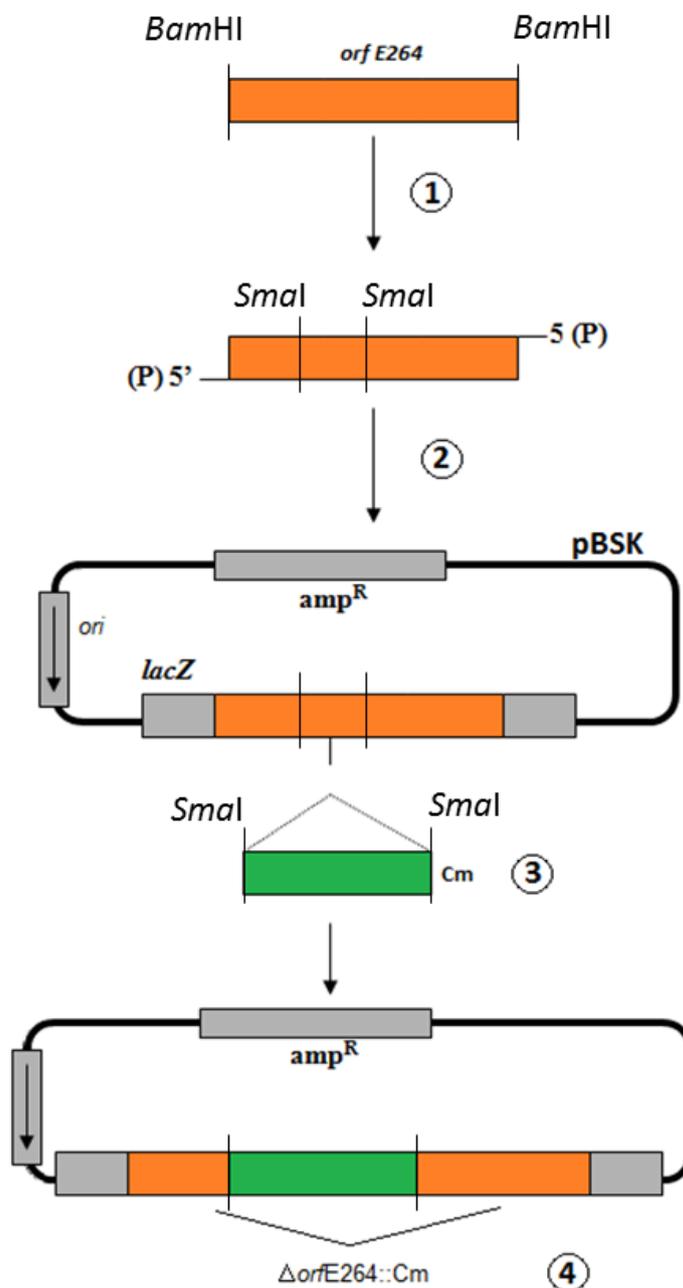


Figura 13 Construção do plasmídeo pBSK Δ orfE264::Cm.

Cliva-se o gene sintético com enzimas de restrição *Bam*HI (1) gerando extremidades que são complementares às do plasmídeo pBlueScript-SK (2). O cassete de cloranfenicol é inserido em uma região específica do gene com os sítios de restrição de *Sma*I (3) nocauteando-o. O resultado é o plasmídeo portando o gene incapaz expressar a proteína OrfE264 a partir de um deleção e inserção de sequência (4).

Para a obtenção do plasmídeo contendo *orfE264* selvagem, ou seja o gene da proteína autotransportadora não modificado, um processo semelhante foi feito utilizando o plasmídeo pUCP26 ao qual foi inserido com clivagem de enzimas de restrição *Bam*HI, porém com a *orfE264* íntegra (Eppoch, Sugar Land TX, EUA). Gerou-se então o pUCP26 contendo *orfE264*. Os plasmídeos utilizados neste estudo estão listados na Tabela 3, sejam eles padrões ou modificados para esse estudo.

Tabela 3 Relação dos plasmídeos utilizados no estudo.

Plasmídeo	Descrição	Origem/Referência
pUCP26	Plasmídeo <i>shuttle</i> , derivado do pUC18, contendo origem de replicação de <i>P. aeruginosa</i>	Doação do Laboratório Herbert Schweizer (WEST et al., 1994)
pUCP26 E264	pUCP26 contendo a <i>orfE264</i> , Tet ^R	Esse estudo
pUCP26 EstA	pUCP26 contendo a <i>estA</i> , Tet ^R	(DOBLER, 2014)
pSIM 18	Vetor contendo 3 recombinases do fago Lambda, Hyg ^R	(DATTA; COSTANTINO; COURT, 2006)
pBlueScript SK	Amp ^R	Promega
pBlueScriptSK- Δ <i>orfE264::Cm</i>	contendo uma deleção e a inserção de resistência à cloranfenicol, Amp ^R	Esse estudo

3.3 Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos sintéticos utilizados como iniciadores nas reações em cadeia da polimerase foram obtidos através da Integrated DNA Technology – IDT (Coralville, IA, EUA) e estão listados na Tabela 4.

Tabela 4. Relação dos primers utilizados nesse estudo

Nome	Sequência (5'-3')	Uso
BT-estA-BamF	TATGGATCCATGCATACCAAATATCGA	PCR
	GGGA	
BT-estA-PstI-R	TATCTGCAGTCAGAACGTGCCGCCCA	PCR
	GCAG	
Cat-F-RBS_Scal	TATAGTACTTTTTTGAGTTATCGAGATT	Sonda
	TT	
Cat-R_Scal	ATAGTACTTTACGCCCCGCCCTGCCA	PCR/ Sonda
	CT	

3.4 Estratégias de manipulação gênica

Construiu-se uma linhagem mutante de *B. thailandensis*, $\Delta orfE264::Cm$, com nocaute do gene *orfE264*, utilizando-se enzimas virais contidas no fago Lambda e recombinação homóloga. Outras linhagens foram construídas a partir desse mutante: 1) complementação *in trans*, com a introdução de um plasmídeo contendo a *orfE264* e 2) uma complementação cruzada, com a introdução de *estA*. Esses plasmídeos foram também adicionados à cepa selvagem a fim de caracterizar os fenótipos produzidos pela superexpressão dos genes *orfE264* e *estA*.

3.4.1 Extração do fragmento $\Delta orfE264::Cm$

O fragmento $\Delta orfE264::Cm$ do plasmídeo pBSK_ $\Delta orfE264::Cm$ foi propagado em *E. coli*. Esse fragmento constitui-se do *orfE264* com uma deleção e a inserção do gene de resistência ao cloranfenicol. Conhecendo a existência de sítios de clivagem por enzimas de restrição do plasmídeo, a enzima *Bam*HI foi utilizada para clivar em dois pontos e obter a sequência desejada. Para isso, aproximadamente 50 ng de DNA plasmidial purificado foram misturados a 0,2 U/ μ L das enzimas de restrição *Bam*HI e tampão Tango yellow (Thermo Scientific) até um volume final de 30 μ L. Essa mistura permaneceu em banho seco a 37 °C por cerca de 16 horas.

Após a digestão, os fragmentos de DNA resultantes foram separados por eletroforese em gel de agarose e purificados utilizando o kit Extração do Gel (Qiagen). Os fragmentos de DNA correspondentes à $\Delta orfE264::Cm$ eluídos foram precipitados com etanol e concentrados. Para isso adicionou-se 2,5 x volume etanol P.A., 3 M Acetato de Sódio (pH 5.2). Centrifugou-se a 13.000 rpm por 15 minutos e lavou-se o pellet com Etanol a 70 %. Centrifugou-se novamente por 5 minutos e secou-se no fluxo laminar para a remoção do etanol e ressuspendeu-se em 20 μ l de água ultrapura.

3.4.2 Construção de mutante $\Delta orfE264::Cm$ em *B. thailandensis* E264 com as recombinases do fago λ

O objetivo de gerar uma cepa nocauteada para *orfE264* levou em conta formação de um mutante apolar, ou seja, através de uma mutação que não afetasse a expressão de eventuais genes do mesmo óperon. Para isso foi feita a inserção sem terminação transcricional. Foi empregado o sistema de recombinação do bacteriófago λ conforme descrito por DATSENKO e WANNER (2000) para obtenção de bactérias recombinantes. As recombinases contidas no plasmídeo pSIM18 (DATTA; COSTANTINO; COURT, 2006) atuam de forma que regiões homólogas presentes no fragmento fossem inseridas no cromossomo. Sendo assim, para a obtenção da mutante a cepa selvagem de *B. thailandensis* E264 (ATCC 700388) foi previamente transformada com o plasmídeo pSIM18 por eletroporação. O plasmídeo pSIM18 está representado abaixo (Figura 14). As recombinases estão sob atuação de um repressor termossensível, sendo assim, seu genes passam a ser expressos em temperatura mais elevada uma vez que o repressor é inativado (CHAN et al., 2007).

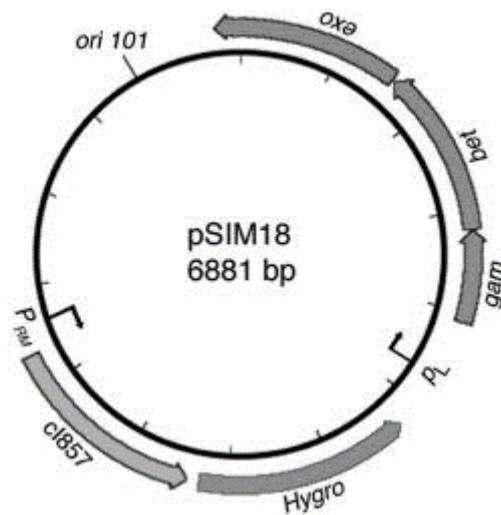


Figura 14. Mapa do pSIM18.

O plasmídeo carrega os genes para as recombinases do fago lambda (*exo*, *beta* e *gamma*) sob repressão de uma proteína termossensível (*c1857*) codificada no mesmo plasmídeo (CHAN et al., 2007).

Cada uma das recombinases possui uma função: a Exo é responsável pela formação de *overhangs* na sequência inserida, ao passo que a Beta atua na recombinação homóloga das regiões similares ao DNA exógeno no genoma da célula assim como sua ligação. A enzima Gama por sua vez atua sobre as nucleases nativas da célula hospedeira que poderiam degradar o DNA exógeno. A Figura 15 ilustra a atuação das enzimas Exo e Beta na inserção da sequência $\Delta orfE264::Cm$ na cepa *B. thailandensis* E264 portando o pSIM18.

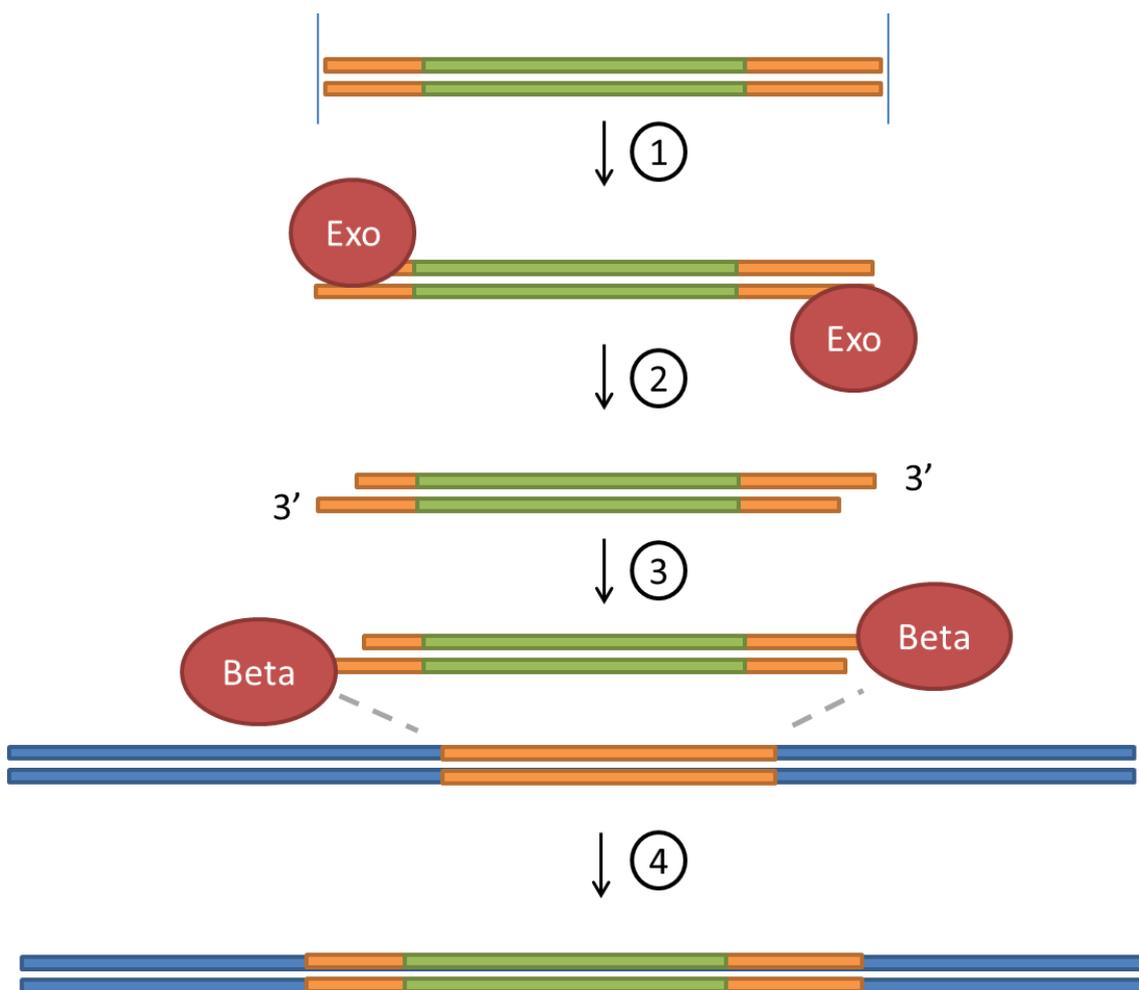


Figura 15. Mecanismo de funcionamento das recombinases Exo e Beta do bacteriófago lambda.

A enzima Exo é responsável pelos overhangs na sequência inserida, a Beta atua na recombinação homóloga do DNA exógeno no genoma da célula e sua ligação. (1) As extremidades do fragmento de DNA sintético $\Delta orfE264::Cm$ são reconhecidas pela enzima Exo, (2) formam-se extremidades coesivas sobre as quais (3) a enzima Beta atua gerando a recombinação homóloga entre a sequência genômica e a exógena permitindo assim (4) o nocaute da *orfE264* (laranja) por uma sequência de cloranfenicol (verde), obtida por uma deleção seguida de uma inserção.

Para o preparo das células competentes para introdução do fragmento mutagenizado, um inóculo com *B. thailandensis* E264 contendo o pSIM18 foi feito em 4 mL LB com higromicina a 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Alíquotas de 1 mL foram tomadas e mantidas à 42°C por uma hora para indução da expressão das recombinases Red Lambda. Após esse período, células competentes foram preparadas. Adicionou-se o fragmento $\Delta orfE264::Cm$ e realizou-se uma eletroporação em uma cubeta pré-refrigerada (2 mm – BioRad). Os fragmentos

foram eletroporados para o interior da bactéria utilizando o Gene Pulser (BioRad) a 2.5 kV, 25 μ F e 200 Ohms. Plaqueou-se em meios LB com cloranfenicol a 34 μ g/mL. Colônias isoladas resistentes ao cloranfenicol foram reinoculadas em LB com cloranfenicol a 34 μ g/mL à 42°C O/N, a fim de curar o pSIM18, visto que o plasmídeo não se replica sob estas condições de temperatura. Foi selecionada a colônia que havia sido curada do plasmídeo pSIM18 mediante seleção para perda da resistência à higromicina.

3.4.3 Estratégias de transformação e complementação *in trans*

Como forma de inserir os plasmídeos pBSK Δ *orfE264::Cm* e pUCP26_*orfE264*, as cepas de *B. thailandensis* e *E. coli* foram transformadas por eletroporação. *E.coli* foi selecionada para propagar os plasmídeos disponíveis para que posteriormente pudessem ser extraídos.

3.4.4.1. Extração de plasmídeos

O DNA plasmidial foi preparado usando QIAprep™ Miniprep para DNA plasmidial (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante. O QIAprep miniprep é um procedimento que usa o método de lise alcalina modificado de Birnboim e Doly (1979). As bactérias são lisadas em condições alcalinas e o lisado é posteriormente neutralizado e ajustado para condições de ligação de alto teor de sal para purificação na membrana de gel de sílica. Resumidamente, 3 ml de culturas O/N de *E. coli* em LB foram centrifugados a 5 000 xg durante 5 min, a 4 ° C. As células bacterianas sedimentadas foram ressuspensas em 250 μ l de Buffer P1, que contém RNAse A. Após suspensão, as células bacterianas foram lisadas em NaOH / SDS, adicionando 250 μ l de tampão P2 e invertendo suavemente o tubo para misturar. O lisado foi então neutralizado e ajustado para condições de ligação de alto teor de sal por adição de 350 μ l de tampão N3. A suspensão foi centrifugada durante 10 minutos a 10 000 xg , a 4 ° C. O sobrenadante foi então aplicado a coluna QIAprep e centrifugada durante 1 min a 3.000 xg , a 4 ° C. A coluna foi lavada uma vez com tampão PB de 500 μ l (contendo cloridrato de guanidina e isopropanol). Uma lavagem final foi realizada adicionando 750 μ l de PE tampão (contendo etanol) na coluna e centrifugando duas vezes durante 1 min, a 3.000 g, a 4 ° C, para secar a membrana de gel de sílica. O DNA foi eluído pela adição de 50 μ l

de água ao centro da coluna, seguido por 1 min de incubação e centrifugação durante 1 min a 3.000 xg, a 4 ° C

3.4.4.2. Determinação da concentração e pureza de DNA

A quantificação de DNA e avaliação de pureza se deu por absorvância em Nanodrop One (Thermo Scientific). A análise espectrofotométrica baseia-se nos princípios de que os ácidos nucleicos absorvem a luz ultravioleta em um 260 nm. A pureza da amostra foi determinada usando o cálculo de absorvância a 260 nm/280 nm. A proporção foi utilizada para avaliar a pureza dos ácidos nucleicos. Para o DNA puro, A260 / 280 foi considerado ~ 1.8 para avaliar a contaminação proteica baseado na absorção de luz a 280 nm principalmente pelos os aminoácidos aromáticos.

3.4.4.3. Transformação por eletroporação

Culturas de bactérias cultivadas foram recolhidas durante a fase exponencial e alíquotas de 1 mL foram centrifugadas a 16.000 xg, por um ou dois minutos. As células foram lavadas em 1 mL de uma solução de 300 mM de Sacarose e centrifugadas duas vezes. As células foram ressuspensas em 100 µL da mesma solução para cada tubo. Caso o pellet formado fosse insuficiente, o conteúdo de dois tubos era combinado empiricamente.

Aproximadamente 350 ng de DNA plasmidial foram adicionados a 100 µL de bactérias competentes. A mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação pré-refrigerada (2 mm – BioRad). Os plasmídeos foram eletroporados para o interior da bactéria utilizando o Gene Pulser (BioRad) a 2.5 kV, 25 µF e 200 Ohms. Imediatamente após a eletroporação as células foram transferidas para 1 mL de meio LB. As culturas foram incubadas por 1 hora a 37°C, sob agitação. Entre 20 e 100 µl de cultura foram plaqueadas em meio ágar LB na presença do antibiótico apropriado para a marca de seleção. As placas foram incubadas durante a noite a 37°C.

3.4.4 Comprovação do nocaute $\Delta orfE264::Cm$

Southern blot é uma técnica utilizada para verificar se uma sequência de DNA específica está ou não presente na amostra em análise, no caso presente, o genoma inteiro de um organismo. Além da detecção da sequência

no genoma, é possível obter informações sobre a massa molecular e a quantidade relativa existente dessa sequência de DNA específica. O seu nome foi dado em homenagem ao seu inventor, Edwin Southern, um biólogo inglês que desenvolveu a técnica em 1970 na Universidade de Edimburgo. Nesse estudo, foi feita uma versão adaptada dessa estratégia, que corresponde à amplificação por PCR do gene mutagenizado seguido da transferência do produto para uma membrana de Nylon carregada positivamente e hibridação com uma sonda específica.

3.4.4.4. Extração de DNA genômico (gDNA)

A extração do DNA genômico das cepas selvagem e mutante se deu através do kit GeneJET (Thermo Fischer Scientific). O processo se dá através de centrifugações consecutivas utilizando os reagentes presentes que determinam a força de interação do gDNA com a sílica.

3.4.4.5. PCR comparativo

A reação da PCR para amplificar fragmentos distintos entre as cepas selvagem e nocauteada foi realizada com os reagentes da polimerase Phusion (Thermo-Scientific) utilizando o tampão da reação CG, uma vez que o alto conteúdo de citosinas e guaninas do genoma da *B. thailandensis* dificultava a amplificação em condições padrões do tampão High-fidelity, e 3mM de magnésio de concentração final. A quantidade de DNA genômico foi de 80 ng e de DNA plasmidial, como controles, de 5 ng no total da reação. Os primers utilizados foram BT-estA-BamF e Cat-R_ScaI. A ciclagem se procedeu 98 °C por 5 minutos, 30 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 55 °C por 20 segundos e 72 °C por 1 minuto, ao final, uma extensão de 72 °C por 10 minutos.

3.4.4.6. Eletroforese

As amostras de DNA foram analisadas por eletroforese através de gel de agarose. Géis de agarose foram preparados por dissolução de agarose (Sigma) em tampão TAE quente (40 mM Tris-acetato pH 8,0, EDTA 1 mM) até uma percentagem final de 0,8% (p/v). Amostras de DNA (5 µl-30 µl), diluídas em tampão de amostra 6x (Thermo) foram aplicadas no gel de agarose preparado. Escadas de DNA 1kb (Thermo) foram usados como padrões de

peso molecular. A eletroforese foi realizada de forma constante, 80-110 V em 1x tampão TAE. O gel foi submetido a coloração com banho de brometo de etídeo (0,5 µg/ml) por 20 minutos e as bandas de DNA foram visualizadas sob luz ultravioleta.

3.4.4.7. Transferência do gDNA para uma membrana de Nylon

Após a eletroforese em agarose e lavagem do brometo de etídeo, realizou-se uma lavagem com água e banho em solução desnaturante (0,6 M NaCl, 0,2 N NaOH) por 45 minutos em leve agitação para formação da cadeias simples de DNA. Esta etapa é essencial, uma vez que apenas DNA em cadeia simples tem a capacidade de hibridar com a sonda além de degradar possíveis RNAs ainda presentes. Após a desnaturação, realizou-se uma lavagem com água e banho em solução neutralizante (1 M Tris, 1M NaCl, pH 7.0-7.5) por 45 minutos com leve agitação. Em seguida realizou-se a transferência do DNA do gel para uma membrana de nylon carregada positivamente (Hybond-N, Amershan, GE) embebida em 6x SSPE (0,9 M NaCl, 60 mM NaH₂PO₄.H₂O e 6 mM EDTA, pH 7.4). A transferência ocorreu por capilaridade, através de pressão aplicada uniformemente distribuída sobre o gel com o auxílio de papel filtro embebido em água destilada, levando à imobilização do DNA sobre a membrana por 16h. A Figura 16 ilustra o processo de transferência.

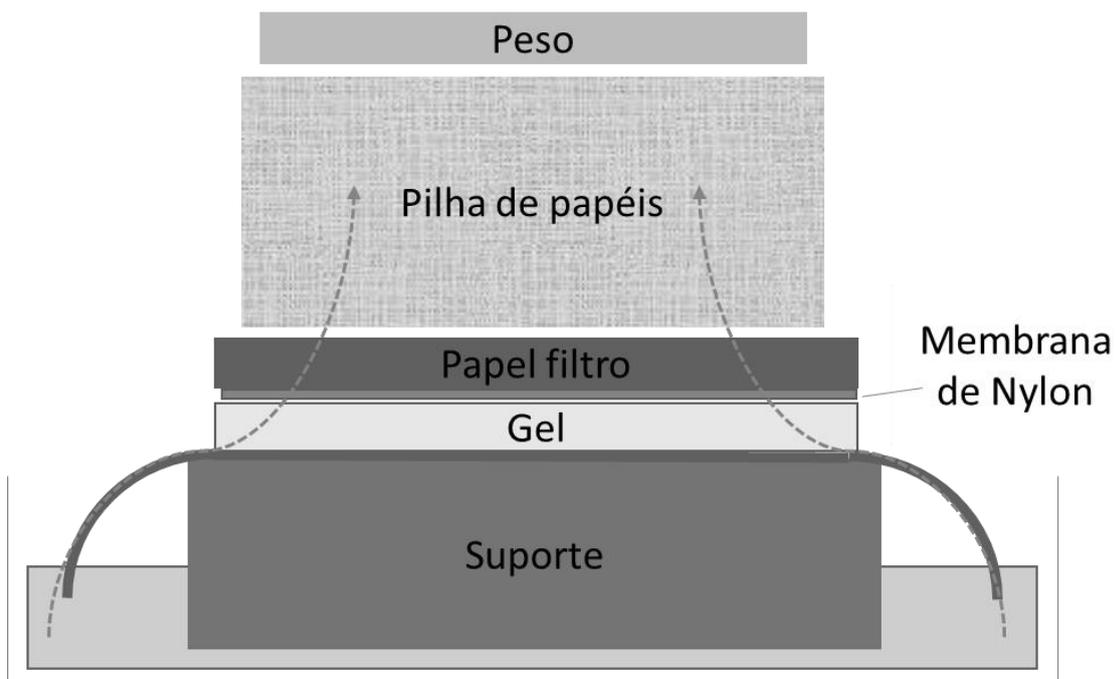


Figura 16. Esquema da montagem da estrutura do Southern blot.

A transferência do produto de PCR para a membrana de nylon carregada positivamente ocorre por capilaridade do tampão para o maço de papel.

Após a transferência, o gel foi novamente corado com brometo de etídeo para garantir que o DNA foi transferido e a membrana colocada dentro da estufa a 37 °C para secar. Depois, a membrana foi colocada dentro de uma embalagem plástica e exposta à radiação ultravioleta no transiluminador por 2 minutos, para fixar permanentemente o DNA à superfície por *cross-link*.

3.4.4.8. Elaboração de sondas com DIG

As sondas de DNA marcadas com DIG foram obtidas a partir do método de marcação de DNA com iniciação aleatória e hibridação de oligonucleotídeos randômicos utilizando o kit DIG – Labelling® (Roche, Mannheim, Germany). Resumidamente, a cadeia de DNA complementar ao molde fornecido foi sintetizada pela enzima de Klenow que utiliza os terminais 3'-OH dos oligonucleotídeos como iniciadores e uma mistura de desoxirribonucleotídeos contendo DIG-11-DUTP para alongamento. Isso resultou na incorporação de digoxigenina (DIG) no DNA recém-sintetizado.

3.4.4.9. Elaboração da sonda Cm

Primers para amplificar uma sequência específica do cassete presente no gene $\Delta orfE264::Cm$ foram utilizados para elaborar o molde para síntese da sonda Cm com o kit o DIG – Labelling® (Roche, Mannheim, Germany).

A reação de PCR para amplificar a sonda Cm se procedeu com os reagentes da polimerase *Pfu* (Thermo-Scientific) utilizando 4 mM de Magnésio de concentração final. A quantidade de DNA plasmidial do pBSK- $\Delta orfE264::Cm$ foi de 5 ng na reação. Os primers utilizados foram Cat-F- RBS_Scal e Cat-R_Scal. A ciclagem se procedeu 95 °C por 1 minuto, 25 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 60 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto, ao final, uma extensão de 72 °C por 10 minutos.

3.4.4.10. Elaboração da sonda *orfE264*

A elaboração da sonda *orfE264* se procedeu com a digestão dupla do plasmídeo pUCP26_*orfE264*. Após uma eletroforese em agarose, o fragmento de interesse foi extraído do gel usando o QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Este sistema é projetado para isolar DNA de soluções aquosas e agarose. Os buffers de ligação nos kits de rotação QIAquick fornecem concentrações de sais e condições de pH para adsorção de DNA à membrana de sílica. Resumidamente, fatias de gel de agarose contendo os fragmentos de DNA de interesse foram excisados e subsequentemente solubilizados no buffer QG, seguido pela ligação à membrana de gel de sílica. Sais indesejados, impurezas e as proteínas foram lavadas com tampão contendo etanol, PE. O DNA foi eluído com água.

Esse DNA foi utilizado como molde para síntese da sonda *orfE264* com o kit o DIG – Labelling® (Roche, Mannheim, Germany).

3.4.4.11. Hibridização

Foi feito um tratamento prévio da membrana em tampão de hibridização aquecido à 68 °C por cerca de 1 h. Adicionou-se à 2,5 mL de solução de hibridização a 65 ng de sonda desnaturada por aquecimento a 95 °C seguido de resfriamento em gelo. Retirou-se a solução de hibridização e a membrana foi selada em plástico em contato com a sonda. Incubou-se *overnight* à 50 °C

com leve agitação para ocorrer o reconhecimento da sonda pelas fitas desnaturadas de DNA na membrana. Lavou-se, em agitação, duas vezes por 5 min com 2x SSC (0.3 M NaCl, 34 mM Citrato de sódio, pH 7,0), SDS 0,1 %, e duas vezes por 15 min com 0,1x SSC (15 mM NaCl, 1.7 mM Citrato de sódio, pH 7,0, SDS 0,1%) preaquecido à 68 °C.

3.4.4.12. Revelação

A revelação se deu conforme o protocolo DIG-Labeling (Roche). A membrana foi lavada com Washing buffer por 5 min, incubada em *Blocking Solution* por 30 min e posteriormente na *Antibody Solution* por mais 30 min. Lavou-se duas vezes com *Washing Buffer* por 15 min. Equilibrou-se a membrana em *Detection Buffer* por 5 min e incubou-se na *Color Substrate Solution*, no escuro. O ganho de cor foi acompanhado com a reação ocorrendo no escuro e a reação foi pausada no momento desejado com com H₂O destilada.

3.5 Análise dos fenótipos celulares complementares

3.5.1 Quantificação dos biofilmes aderentes

Inoculou-se 5 réplicas de 1:10 das suspensões padronizadas por D.O._{600nm} de 1 em LB em orifícios de microplacas de poliestireno de 24 ou 96 poços (controles negativos feitos com o meio LB) e manteve-se à 30°C por 24 horas. Em seguida retirou-se o meio e as células planctônicas, lavou-se com salina 0,85 % para remoção das células não aderidas, adicionou-se 1 mL de metanol por 15 minutos para a fixação dos micro-organismos. Após a remoção do metanol, corou-se com Cristal Violeta 0,5 % por 20 minutos. Lavou-se com água para remoção do excesso de corante e ressuspendeu-se o corante com ácido acético glacial 33 %. A densidade óptica das soluções foi medida em espectrofotômetro SpectraMax (Molecular Devices, Sunnyvale – California, EUA), com o comprimento de onda de 570 nm (STEPANOVIC et al., 2000).

Os resultados foram tratados por ANOVA de um fator e o teste de Tukey da “diferença honestamente significativa”, uma vez que os dados se apresentam em uma distribuição normal com $p < 0,01$.

3.5.2 Motilidade celular por *Swarming*

Como forma de analisar o deslocamento bacteriano em meio semi-sólido, placas 2 % LB e 0,5 % agar foram preparadas e inoculadas com as células (KEARNS, 2010; WILHELM et al., 2007). As cepas retiradas do estoque à -80°C foram reativadas 5 mL de meio LB. Quando necessário, suplementadas com antibióticos (tetraciclina 40 $\mu\text{g/mL}$). Plaqueou-se um mesmo inóculo de células com D.O._{600nm} normalizada. Comparou-se os crescimentos através do registro de imagem em fotodocumentador e câmera (Canon) em intervalos de tempo entre 24 e 48h.

4 Resultados e discussão

4.1 Análises *in silico*

4.1.1 Prospecção de genes que codifiquem produtos proteicos semelhantes à família EstA

Tendo em vista o grande potencial da EstA e a similaridade filogenética entre os gêneros *Pseudomonas* e *Burkholderia*, realizou-se a prospecção de genes homólogos a *estA* dentro de espécies do gênero *Burkholderia*. Esta busca revelou três principais resultados para genes que codifiquem uma proteína putativa nas espécies relacionadas na Figura 17.

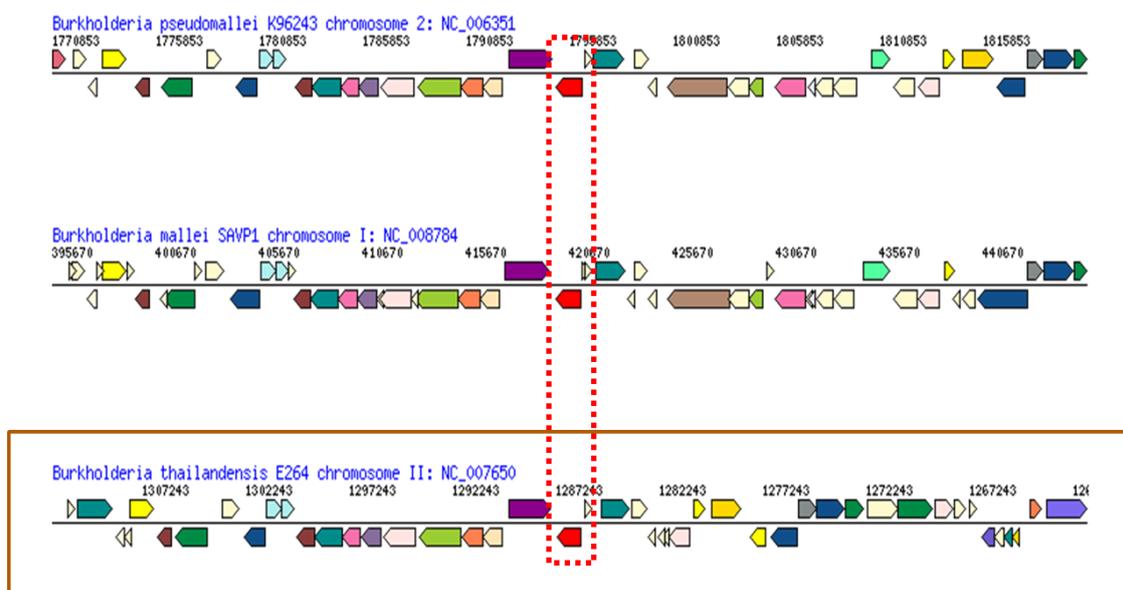


Figura 17. O gene *estA*-like e seus homólogos.

A prospecção realizada revelou homologia em relação à proteína EstA de *P. aeruginosa* nas espécies *B. pseudomallei*, *B. mallei* e *B. thailandensis* pertencentes ao gene em vermelho destacado.

Além do valor vinculado à *B. thailandensis* por ser um modelo para espécies patogênicas do grupo (BRETT; DESHAZER; WOODS, 1998; HARAGA et al., 2008a; SMITH et al., 1997), seu genoma estar sequenciado e facilidade de manipulação em laboratório, a escolha da espécie para estudo se

deu por conta das perspectivas acerca da produção de biossurfactantes do tipo raminolípídeo com alto valor agregado e vasta aplicação industrial (DUBEAU et al., 2009; TORIBIO; ESCALANTE; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2010). Foi escolhida então a cepa *B. thailandensis* E264 como modelo de estudo por conta dos fatos acima mencionados.

A análise do gene, designado neste estudo de *orfE264*, revela uma proteína putativa com estrutura de domínios similares à EstA da *P. aeruginosa*, ou seja, um domínio de lipase no N-terminal e uma autotransportadora em Barril- β no C-terminal (Figura 18).

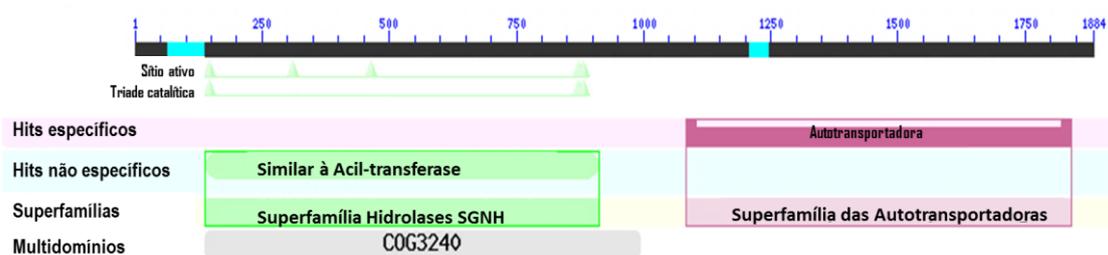


Figura 18. Prospecção de genes *estA*-like em *B. thailandensis*.

Indicou-se a presença de uma proteína putativa detentora de uma hidrolase associada a um domínio autotransportador Barril- β .

4.1.2 Identidade entre as sequências OrfE264 e EstA

Como forma de determinar o grau de identidade entre as sequências de aminoácidos da OrfE264 e da EstA, diferentes *softwares* foram empregados, uma vez que determinados algoritmos podem realizar alinhamentos de diferentes formas e com *scores* destoantes.

As porcentagens de identidade analisadas foram obtidas pelo Transporter classification Database - TCDB (SAIER et al., 2016; SAIER; TRAN; BARABOTE, 2006) de 23 %; pelo Clustal Omega 2.1 (LI et al., 2015; SIEVERS et al., 2011) de 23,89 %; e pelo Blast2 (TATUSOVA; MADDEN, 1999) 24%.

4.1.3 Filogenia

Com o Blast convencional (blast.ncbi.nlm.nih.gov), obteve-se a identidade entre a EstA e a OrfE264 de 28 %. Para isso, precisou-se restringir a busca de homologia para dentro de *P. aeruginosa*. O uso do SmartBlast da mesma plataforma possibilitou a geração da árvore a seguir em que foi

automaticamente levada em conta a presença de uma proteína homóloga à EstA de *P. aeruginosa*, aqui designada OrfE264 em referência à cepa E264 de *B. thailandensis*.

O SmartBLAST é um serviço que relaciona táxons mais próximos a uma sequência de aminoácidos e avalia a relação filogenética entre o banco de dados e o *input*. Busca-se três melhores correspondências do banco de dados de proteínas não redundantes, juntamente com as duas melhores correspondências dos proteomas completos de espécies de referência bem estudadas de forma que haja duas espécies de organismos diferentes como referência. Dessa forma, a busca pela OrfE264 retorna, como espécies referências, a soja e a *P. aeruginosa* PAO1 (Figura 19).

Ambas as referências detêm uma transferase transportadora de ácido graxo da subfamília SGNH, GDSL esterase/lipase, o mesmo grupo em que a OrfE264 é predita. Não é surpreendente para a PAO1, uma vez que os gêneros *Burkholderia* e *Pseudomonas* são muito próximos a ponto de terem sido considerados apenas um gênero por muito tempo (CURRIE, 2003; YABUUCHI et al., 1992). Já para a soja ser utilizada como referência, é curioso por conta da distância filogenética entre as espécies. Nem a EstA ou a OrfE264 estão com seu papel metabólico bem ilustrado, contudo essa relação com a transferase da soja e seu papel com os ácidos graxos levanta curiosidades sobre a perspectiva de atuação das autotransportadoras no metabolismo dos raminolipídeos, moléculas detentoras de ácidos graxos (ABDEL-MAWGOUD; LÉPINE; DÉZIEL, 2010).

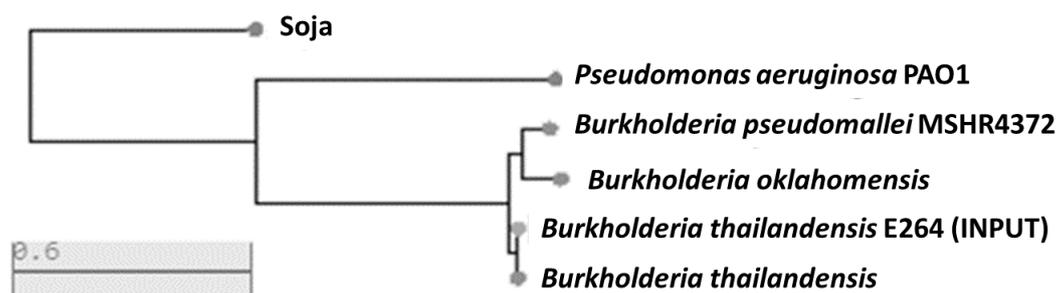


Figura 19. Árvore filogenética gerada pelo SmartBlat.

A partir do input da sequência da OrfE264, foi gerada uma árvore filogenética resgatando resultados do Blast na plataforma do NCBI e comparando-os com espécies com maior identidade, ou seja as pertencentes dentro do gênero *Burkholderia* com espécies referência conhecidas: *P. aeruginosa* PAO1 e a soja. As sequências resgatadas foram a GDSL-esterase/lipase da soja, PA4921 da PAO1, GDSL-like Lipase/Acilhidrolase hipotética de *B. pseudomallei*, o *input* OrfE264 e uma autotransportadora com domínio contendo esterase de *B. thailandensis* respectivamente.

Analisando o alinhamento que deu origem à árvore filogenética anterior observa-se que as identidades entre todas as sequências se concentram no N-terminal, onde se identifica a possível lipase da OrfE264. A região correspondente à autotransportadora não apresenta identidade. Contudo através de uma seleção exclusiva entre espécies de *Burkholderia*, aumenta-se a identidade entre as sequências de forma que se estende para a porção do Barril- β , crucial para o mecanismo das autotransportadoras (KNOWLES et al., 2009, 2011; VAN ULSEN et al., 2014). Este resultado indica fortemente que dentro do gênero, o domínio autotransportador é conservado. Os alinhamentos estão ilustrados a seguir (Figura 20).

A



B

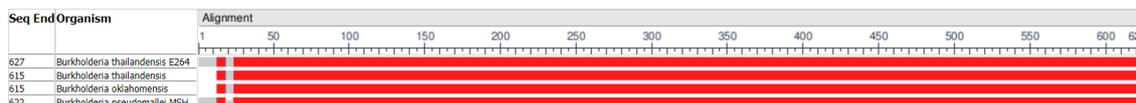


Figura 20. Alinhamento entre as sequências utilizadas na filogenia por SmartBlast.

O alinhamento em vermelho é estritamente localizado na região N-terminal quando se compara todas as sequências (A). Ao alinhar apenas os integrantes do gênero *Burkholderia*, observa-se que as identidades se estendem por toda a sequência (B). Representa-se um forte indicativo de que a grande parte da diferença entre a OrfE264 e a EstA de fato se localiza na sequência de aminoácidos do Barril-β.

Como forma de se identificar a posição do domínio autotransportador da OrfE264, utilizou-se a ferramenta Smart (smart.embl.de). A partir dos resultados, elaborou-se a imagem da OrfE264 (Figura 21) em que a região autotransportadora, ou seja, a correspondente pelo Barril-β foi destacada em azul. O que se destaca é que, quando comparada com a figura anterior, o domínio da autotransportadora da OrfE264 se inicia praticamente onde não há mais alinhamento ao comparar todas as sequências, ao passo que passa a ser alinhado dentro do gênero. Isso demonstra-se como uma potencial região conservada dentro de *Burkholderia*.

MHTKYRG TALRRMKIDSKQTRAVAAIALGIALALPAAACAQAFYALGDSLTDNGRVVRLTGILPNATSTIFRN
 GRSSNGPVWAEYLP SLIGARFAPDDDYAINGALSGHGGYLNIIPTRWRLPGFVDQVDQLIAAHPRLRGD
 DLVGIWIGTNDQDLTKASLNGIEPFLGVPRPANIAEMSAYTLTNLNAQVRRLLIGIGARQFVILNLNDANGTR
 PGYVDYNGKLPADLVQFSRQGVNVHLFDVSGLLNQMRNPSAYGLNDAPDVQCRHVPSCNGGVVGLQN
 TYLTADGTHMMSVHEYIALYLANQLNAPAAISTAPALGLDVARASALSALNMTDSGPLGAPRVALSD **KLSL**
FADVGYTRNFHGAANGIDAFDSVEMFSIGADYKLSAESSAGALFSSGNASGSIAGGQGRIGMHAYRLGFY
HAFDRAGLFRSVYGAGWSQYRLDRGAVLPGAISHTTGDFGGLVKAGFLPPLGGARLGPVADIGYAQLV
TRGYAEEGDPILAQDVG VQRLKGV SAGAGVRFAAPLAAIGLRAGELSAEAHLRHDAFGDRTLVT AQRYAPG
LPISTAVD GASATYERLSVALTVNPAKRWRGKLA VQADLGN AQRRSYTLLALLGGTF

Figura 21. Destaque do domínio autotransportador para a OrfE264.

Destacou-se em azul a sequência correspondente ao domínio autotransportador da OrfE264 que potencialmente ancora a proteína na membrana. Obtido pelo software Smart.

A partir das informações dos *blasts* gerados, obteve-se as sequências de forma a evitar espécies repetidas e elaborou-se uma filogenia. Foi utilizado o programa MEGA, que é uma plataforma que integra várias ferramentas de análises evolutivas.

A árvore gerada reflete as análises anteriores em que por conta das similaridades, podem ser identificados dois grandes grupos: *Pseudomonas* e *Burkholderia*, sendo a *P. mesoacidophila* exceção dentro de *Burkholderia* (Figura 22). Esses dois grandes grupos corroboram a separação entre os gêneros há algumas décadas atrás (YABUUCHI et al., 1992) devido à maior similaridade entre determinados integrantes do grupo; a OrfE264 entra portanto como um peso a favor da distinção da evolução que divergiu os ancestrais de *Pseudomonas* e *Burkholderia*. Além disso, revela-se a importância da estrutura terciária para a função da OrfE264 e da EstA, pois baseando-se estritamente na sequência primária, as diferenças entre elas são evidentes. Sendo assim, se faz necessária uma análise da estrutura terciária das proteínas.

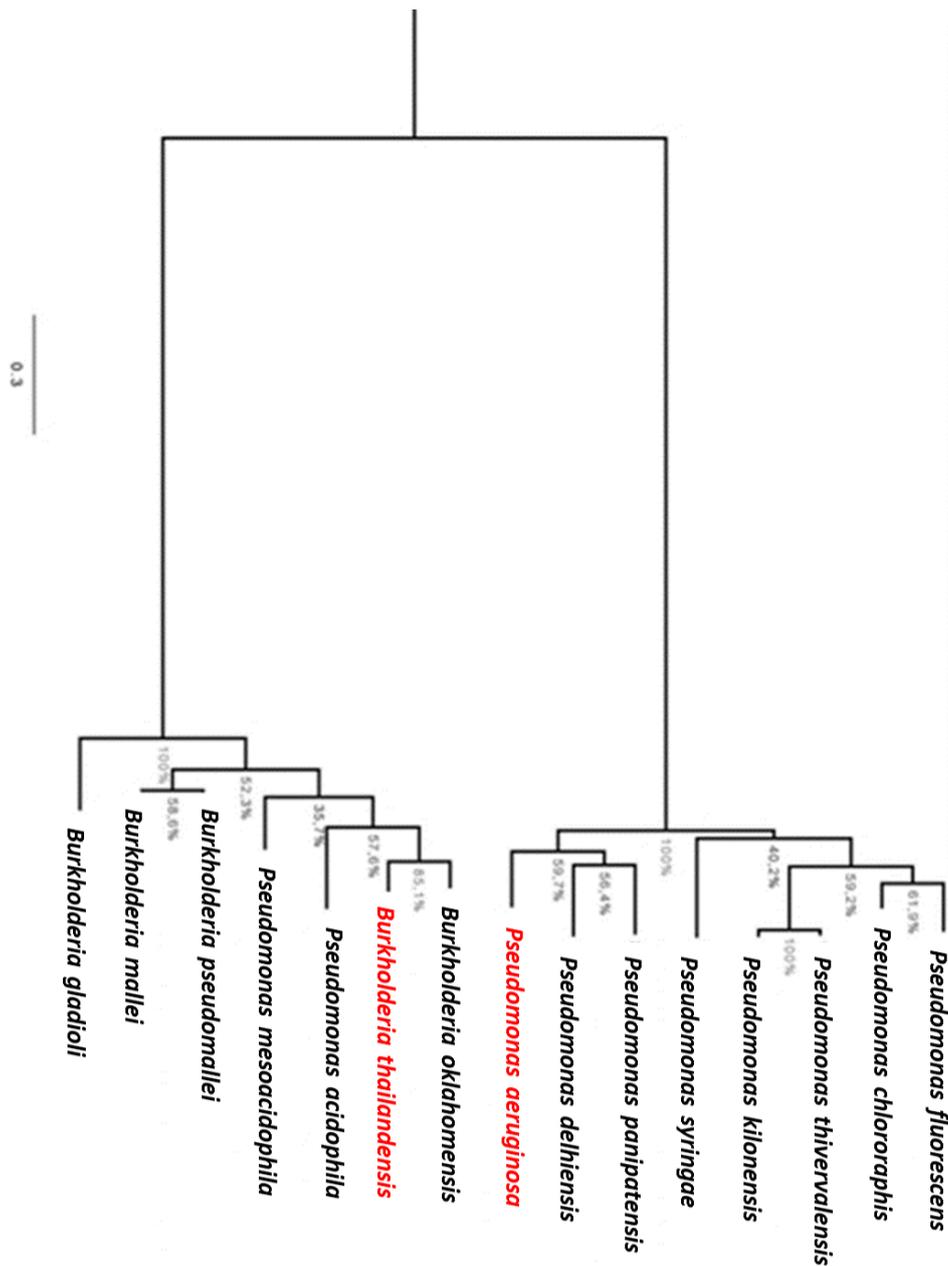


Figura 22. Filogenia de autotransportadoras.

Árvore com Neighbor-Joining de 1000 bootstraps a partir de sequências de autotransportadoras vinculadas a esterases. Identifica-se dois grandes grupos: *Pseudomonas* e *Burkholderia*. A EstA, de *P. aeruginosa* pertencente ao primeiro grupo e a OrfE264, de *B. thailandensis* pertencente ao segundo grupo, estão destacadas. As diferenças nas sequências primárias das proteínas as agrupam em diferentes ramos dentro da filogenia.

Essa filogenia reflete a existência potencial de outras proteínas com características similares à OrfE264 e a EstA que também são desconhecidas estruturalmente e funcionalmente. Além disso, a *B. thailandensis* como modelo para suas contrapartes patogênicas integrantes do gênero (HARAGA et al.,

2008a) apresenta-se mais uma vez como candidata para estudo de alternativas na potencial era pós-antibiótica com possibilidade de se elaborar alvos para o *Quorum-Sensing* e formação de biofilme (BASSLER; SWEM, 2013; NG et al., 2012; PACZKOWSKI et al., 2017), sendo as proteínas similares à EstA um potencial alvo de terapia pois estão vinculadas a fenótipos com características virulentas.

4.1.4 Predição de clivagem do peptídeo sinal

O grupo das autotransportadoras é caracterizado pela sequência de um peptídeo sinal, um domínio passageiro N-terminal conectado a um domínio de Barril- β (BECKER et al., 2005; VAN ULSEN et al., 2014). A predição de clivagem de peptídeo sinal da sequência de uma proteína costuma ser feita com o uso de *softwares* que comparam a sequência fornecida com o banco de dados triado. No caso das análises apresentadas a seguir, foi realizada uma submissão baseada em bactérias Gram-negativas como forma de permitir melhor predição dessa clivagem. Com o uso do programa SignalP-4.1, o resultado é oferecido em *scores*. Cada um deles possui uma função determinante na definição do sítio de clivagem:

- *C-score* (pontuação do site de clivagem bruto): Distinguir sites sinal clivagem peptídeo de todo o resto. A numeração da posição do sítio de clivagem é imediatamente após o local de clivagem (o primeiro resíduo na proteína madura).
- *S-score* (marcador peptídeo de sinal): Distinguir posições dentro de peptídeos sinal de posições nas proteínas maduras e de proteínas sem peptídeos de sinal.
- *Y-score* (local de clivagem): Uma combinação (média geométrica) do C e da inclinação do S, resultando em uma melhor predição do local de clivagem do que com o C bruto.

A importância de se compreender cada um dos *scores* consiste na possibilidade de ocorrer múltiplos C-Scores de alto pico, ou seja, múltiplas possibilidades de clivagem sendo apenas uma a real região. O *Y-score* distingue entre C- picos qual seria o mais possível sítio de clivagem utilizando

para isso a informação obtida do S-Score advinda do conhecimento sobre clivagens em outras proteínas com e sem peptídeo sinal.

Além disso, outros fatores são apresentados no resultado fornecido pelo *software*, dentre eles o D-score. Este consiste na pontuação de discriminação, ou seja, é uma média ponderada da média S e do máximo Y. Este é o score utilizado determinar se há um peptídeo sinal ou se se trata de peptídeos não sinalizadores. De forma geral, para as proteínas não secretadas todas as pontuações representadas na saída SignalP devem idealmente ser muito baixas (perto do valor alvo negativo de 0,1).

A sequência da OrfE264 foi analisada pelo *software* e seus resultados coletados e analisados. A partir dos Scores coletados é possível fazer a análise dos possíveis sítios de clivagem. Analisando a predição dos scores a figura a seguir revela que a OrfE264 apresenta diferentes sítios com maior potencial de clivagem. É necessário relacionar-se esses sítios obtidos pelo C-score com dados obtidos de outras proteínas com e sem peptídeo sinal para determinar o mais provável sítio de clivagem a partir do S-Score. Sendo assim, o resultado obtido da comparação entre esses dados, ou seja, o Y-Score indica que a OrfE264 pode ser inserida no grupo de proteínas secretadas via sinalização por peptídeo sinal como pode ser visto nos dados a seguir. Sendo assim, é possível afirmar que sua sequência sofre um processamento pós-traducional com a clivagem de uma parte da proteína, o peptídeo sinal, após o reconhecimento e passagem da mesma por um sistema de secreção. Dessa forma, através do *software* é possível determinar que a OrfE264 possui potencial participação na via de proteínas secretadas. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 23.

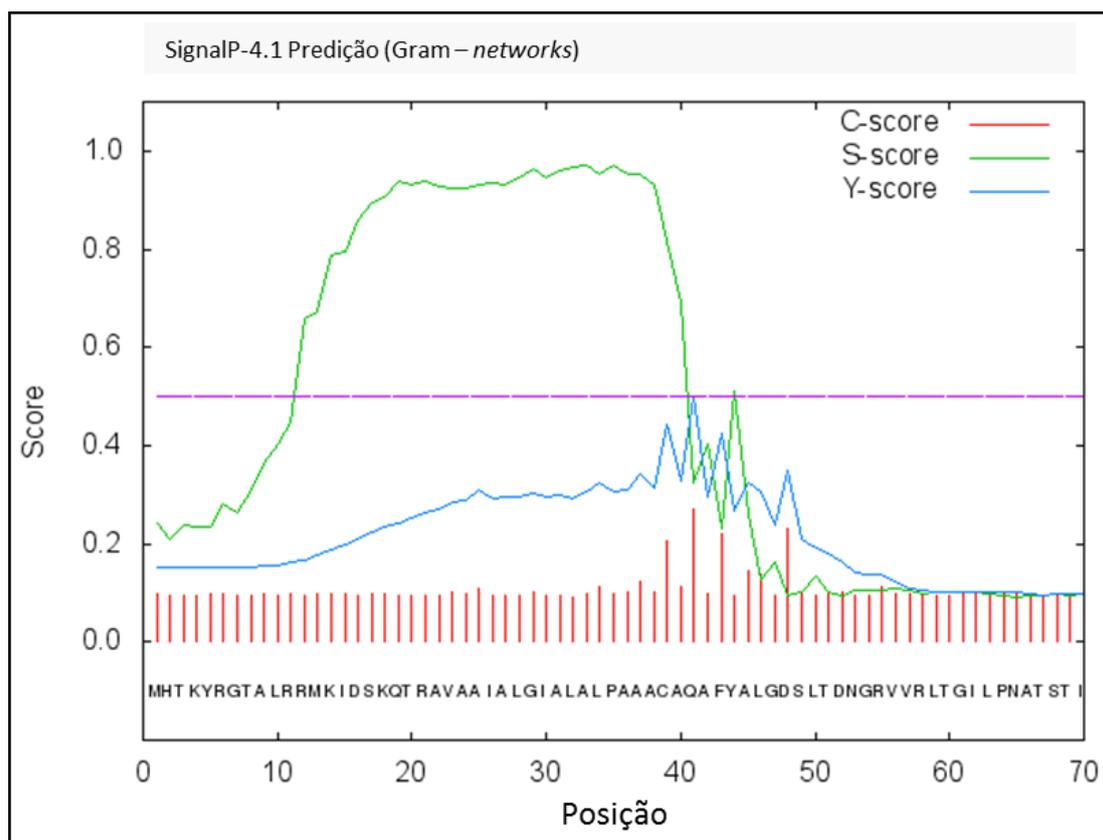


Figura 23. Predição de clivagem de peptídeo sinal da OrfE264.

Como pode ser observado, o resultado fornecido pelo SignalP indica mais de um pico indicado pelo C-Score. O suporte do Y-Score indica o provável sítio de clivagem entre os aminoácidos 40 e 41.

Sendo assim, partir dos resultados apresentados pelo *software*, identifica-se um potencial sítio de clivagem da OrfE264 entre os aminoácidos 40 e 41 o que corresponde ao peptídeo sinal, característico das autotransportadoras.

Utilizando outra ferramenta de identificação de clivagem do peptídeo sinal, Protter (<http://wlab.ethz.ch/protter>), identifica-se o sítio de clivagem no aminoácido 42. Essa ferramenta utiliza o banco de dados Uniprot para buscar possíveis sítios de clivagem similares. A Figura 24 ilustra a região de clivagem em vermelho em toda a extensão da proteína.

4.1.5 Modelagem estrutural tridimensional da OrfE264

Através da modelagem estrutural da proteína putativa via I-tasser, identificou-se a similaridade estrutural entre a autotransportadora de *B. thailandensis* e a da *P. aeruginosa*. A modelagem da OrfE264 se deu com a busca de *templates* pelo *software* de forma que o modelo foi gerado em cima da proteína de estrutura conhecida mais próxima: a própria EstA. Para tal, utilizou-se as informações da cristalografia do modelo 3knv.1.A (VAN DEN BERG, 2010).

O modelo gerado escolhido, entre dois fornecidos pelo *software*, se deu pelo maior C-score (1.11). A confiança de cada modelo é medida quantitativamente pelo C-score, calculado com base na significância dos alinhamentos do modelo de encadeamento e nos parâmetros de convergência das simulações de montagem da estrutura. É importante ressaltar que o *software* utilizou o modelo da EstA presente no PDB como forma de caracterizar a OrfE264 e o C-score elevado representa a similaridade estrutural alta entre o *input* e o *template*. A pontuação C está tipicamente na faixa de [-5, 2], onde uma pontuação C de um valor maior significa um modelo com maior confiança.

O TM-score é uma escala proposta para medir a semelhança estrutural entre duas estruturas. O propósito de propor o TM-score é resolver o problema do RMSD, muito utilizado para avaliar a qualidade de modelos mas que é sensível ao erro local. Dadas as diferenças entre as sequências primárias e como o RMSD é uma distância média de todos os pares de resíduos em duas estruturas, um erro local (por exemplo, uma desorientação da cauda) acarretará em um grande valor RMSD, embora a topologia global esteja correta (ZHANG; SKOLNICK, 2004). Um TM-score > 0,5 indica um modelo de topologia correta, o modelo da OrfE264 obteve um TM-score = 0.87 ± 0.07 e RMSD = $5.3 \pm 3.4 \text{ \AA}$. Sendo assim, avaliando-se o TM-Score, pode-se dizer com segurança que o modelo da OrfE264 é bem representativo e possui uma estrutura terciária similar à EstA.

A Figura 25 apresenta a modelagem da OrfE264 com a representação da EstA cristalografada como forma a ressaltar a conservação na estrutura terciária entre ambas as proteínas.

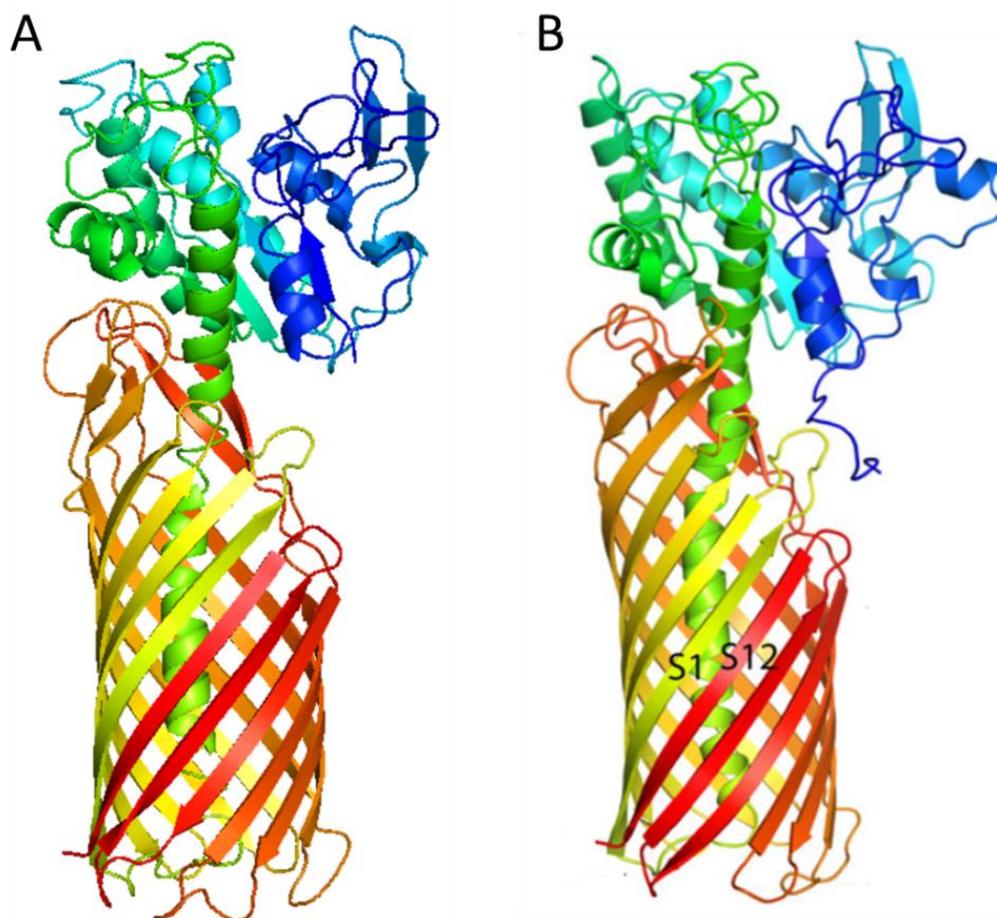


Figura 25. Comparação entre modelos OrfE264 e cristalografia da EstA

Observa-se a alta similaridade entre a OrfE264 (A) e a EstA (B) obtida pela cristalografia (VAN DEN BERG, 2010). Apesar das diferenças significativas entre as sequências primárias, a conformação das autotransportadoras apresenta uma conservação estrutural. As autotransportadoras estão coloridas numa graduação de azul escuro no N-terminal para vermelho escuro no C-terminal.

Para evidenciar com mais detalhes a similaridade estrutural entre ambas, as estruturas foram sobrepostas para identificar as características conservadas em termos tridimensionais dos principais domínios das autotransportadoras. A Figura 26 ilustra essa sobreposição.

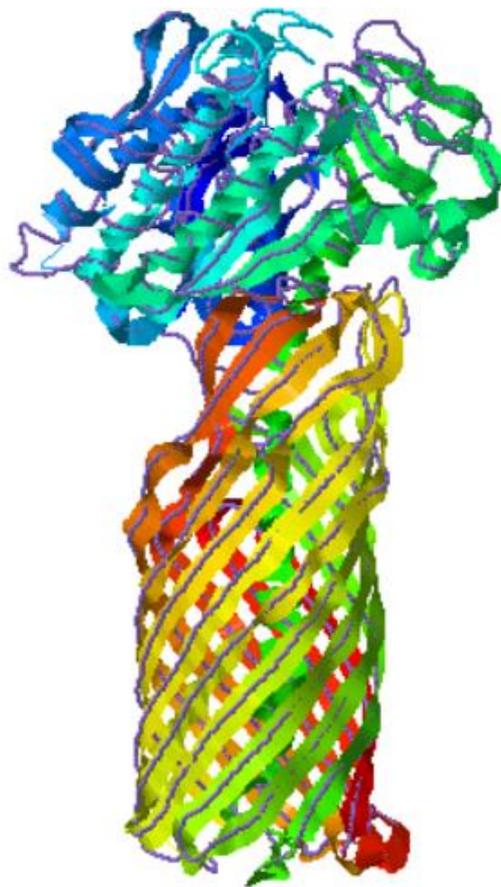


Figura 26. Análise comparativa por sobreposição do modelo da OrfE264 e a estrutura cristalográfica da EstA

Para analisar a similaridade da modelagem com proteínas do banco de dados, utiliza-se como base o template de EstA (em roxo) 3kvn.1.A (VAN DEN BERG, 2010). Destaca-se assim as similaridades estruturais entre a OrfE264 e a EstA. OrfE264 colorido como um arco-íris de azul escuro no N-terminal para vermelho escuro no C-terminal. EstA demarcada em roxo.

Como pode ser analisado, apesar de não ser polido com outras ferramentas de modelagem, o modelo da OrfE264 apresenta-se como um bom indicativo do potencial da proteína ser de fato uma autotransportadora da família EstA. A sobreposição das estruturas terciárias é evidente apesar das diferenças na sequência primária. Isto revela um potencial de aplicabilidade biotecnológica para a OrfE264 tal qual como foi feito com as modificações na EstA como forma de organizar enzimas de *display* na membrana externa heterologamente (BECKER et al., 2005).

4.1.6 Inferência de regiões transmembranares

Análises das sequências com outros *softwares* também identificam as similaridades entre as sequências da OrfE264 e da EstA. O Praline

(zeus.few.vu.nl) é uma ferramenta que identifica características de sequências alinhadas, mesmo com baixo grau de identidade. Esse processo foi adotado para examinar as similaridades entre a OrfE264 e a EstA em relação a estrutura secundárias (Figura 27). O que se ressalta é a presença concomitante entre as alfa-hélices e as folhas-beta em ambas as sequências, revelando que os aminoácidos, apesar de diferentes, conservam características estruturais em comum. Por conta dessa conservação de características de cargas positivas/negativas e hidrofílicas/hidrofóbicas, nota-se que há a conservação da posição das estruturas secundárias entre as sequências.

Uma outra análise utilizando a ferramenta PSIPred com a OrfE264 corrobora a predição das folhas-beta (Figura 28). Apesar de algumas diferenças entre a previsão da estrutura formada por alguns aminoácidos, de uma forma geral ambas as predições são correspondentes.

Como forma de se avaliar as similaridades em termos de estrutura secundária dentro do modelo 3D, comparou-se a cristalografia de EstA (VAN DEN BERG, 2010) e com o modelo da OrfE264 elaborado. A Figura 29 apresenta a comparação entre estruturas secundárias destacadas dentro das proteínas.

```

..... 10 ..... 20 ..... 30 ..... 40 ..... 50
(PRED) EstA -----MIRMALKPL VAACLLASLS TAPQAAPSPY STLTVVFGDSL
(PRED) OrfE264MHTKYRGTAL RRMKIDSKQT RAVAAIALGI ALALPAAACA QAFYALGDSL

..... 60 ..... 70 ..... 80 ..... 90 ..... 100
(PRED) EstA SDAGQFPDPA GPAGSTSRET NVGPTYQNGS GEIFGPTAPM LLGNQLGIAP
(PRED) OrfE264TDNGRVRIT GILPNATSTI FRNGRSSN-- ---GPVWAE YLPSLIGAR-

..... 110..... 120..... 130..... 140..... 150
(PRED) EstA GDLAASTSPV NAQQGIADGN NWAVGGYRTD QIYDSITAAN GSLIERDNTL
(PRED) OrfE264-----FAPDD DYAINGALSG HGGYLNIIPT RPTWRSPLPGF

..... 160..... 170..... 180..... 190..... 200
(PRED) EstA LRSRDGYLVD RARQGLGADP NALYYITGGG NDFLQGRIL- -----
(PRED) OrfE264VDQVDQLIAA HPR---LRG DDLVGIWIGT NDQDLTKASL NGIEPFLGVP

..... 210..... 220..... 230..... 240..... 250
(PRED) EstA ---NDVQAQ QAAGRLVDSV QALQQAGARY IVVWLLPDLG LTPATFGGPL
(PRED) OrfE264R PANIAEMSA YTLTNLNAQV RRLIGIGARQ FVILNLNDAN GTRPGY----

..... 260..... 270..... 280..... 290..... 300
(PRED) EstA QPFASQLSGT FNAELTAQLS QAGANVIPLN IPLLLKEGMA NPASFGLAAD
(PRED) OrfE264-----VDYNG KLPADLVQFS RQGVNVHLFD VSGLLNQMRR NPSAYGLNDA

..... 310..... 320..... 330..... 340..... 350
(PRED) EstA QNLIGTCFSG NGCTMNPTYG INGSTPDP SK LLFND SVHPT ITGQRLIADY
(PRED) OrfE264PDVQCRHVPS CNGG----- ---VVGLQNT YLTADGTHMM TSVHEYIALY

..... 360..... 370..... 380..... 390..... 400
(PRED) EstA TYSLLSAPWE LTLLEPMAHG TLRAYQDELRSQWQADWENW QNV---GQWR
(PRED) OrfE264LANQLNAPAA ISTAPALGLD VARASALSAL NMTDSGPLGA PRVALSDKLS

..... 410..... 420..... 430..... 440..... 450
(PRED) EstA GFVGGGGQRL DFDSQDSAAS GDNGYNLTL GGSYRIDEAW RAGVAAGFYR
(PRED) OrfE264LFADVGYTRN FHGAANGIDA FDSDEVEMFSI GADYKLSAES SAGALFSSGN

..... 460..... 470..... 480..... 490..... 500
(PRED) EstA QKLEAGAKDS DYRMNSYMAS AFVQYQENRW WADAALTCGY LDYDDLKRRKF
(PRED) OrfE264ASGS IAGGQG RIGMHAYRLG FYHAFDRAGL FVRSYVGAGW SQYR-LDRGA

..... 510..... 520..... 530..... 540..... 550
(PRED) EstA ALGGGERSEK GDTNGHLWAF SARLGYDIAQ QADSPWHLSP FVSADYARVE
(PRED) OrfE264VLPG---AIS AHTTGFD FGG LVKAGFLFPL G---GARLGP VADIGYAQLV

..... 560..... 570..... 580..... 590..... 600
(PRED) EstA VDGysekgas ATALDYDDQK RSSKRLGAGL QGKYAFGS-- --DTQLFAEY
(PRED) OrfE264TRGYAEEDP ILAQDVGVQR LKGVSAAGAV RFAAPLA AIG LRAGELSAEA

..... 610..... 620..... 630..... 640..... 650
(PRED) EstA AHEREYEDDT QDLTMSLNSL PGNRFTLEGY TPQDHLNRVS LGFSQKLAPE
(PRED) OrfE264HLRHDAFGDR -TLVTAQRYA PGLPISTAVD GASATYERLS VALTVNPAKR

..... 660..... 670.....
(PRED) EstA LSLRGGYNWR KGEDD-TQQS VSLALS LDF
(PRED) OrfE264WRGKLAVQAD LGNAQR RSYT LLALLGGTF

```

Figura 27. Predição de estruturas secundárias entre a EstA e a OrfE264 por Praline.

Através do Praline, as previsões de estruturas secundárias são elaboradas a partir de um alinhamento entre as sequências. Isto permite a comparação das localizações das alfa-hélices (em vermelho) e folhas beta (em azul) através de um diagrama.

```

1 M H T K Y R G T A L R R M K I D S K Q T R A V A A I A L G I A L A L P A A A C A Q A F Y A L G D S L 50
51 T D N G R V V R L T G I L P N A T S T I F R N G R S S N G P V W A E Y L P S L I G A R F A P D D D Y 100
101 A I N G A L S G H G G Y L N I I P T R P T W R S L P G F V D Q V D Q L I A A H P R L R G D D L V G I 150
151 H I G T N D Q D L T K A S L N G I E P F L G V P R P A N I A E M S A Y T L T N L N A Q V R R L I G I 200
201 G A R Q F V I L N L N D A N G T R P G Y V D Y N G K L P A D L V Q F S R Q G V N V H L F D V S G L L 250
251 N Q M R R R N P S A Y Q L N D A P D V Q C R H V P S C N G G V V G L Q N T Y L Y A D G T H M M T S V H 300
301 E Y I A L Y L A N Q L N A P A A I S T A P A L G L D V A R A S A L S A L N M T D S G P L G A P R V A 350
351 L S D K L S L F A D V G Y T R N F H G A A N G I D A F D S D V E M F S I G A D Y K L S A E S S A G A 400
401 L F S S G N A S G S I A G G Q G R I G H H A Y R L G F Y H A F D R A G L F V R S Y V G A G W S Q Y R 450
451 L D R G A V L P G A I S A H T T G F D F G G L V K A G F L F P L G G A R L G P V A D I G Y A Q L V T 500
501 R G Y A E E G D P I L A Q D V G V Q R L K G V S A G A G V R F A A P L A A I G L R A G E L S A E A H 550
551 L R H D A F G D R T L V T A Q R Y A P G L P I S T A V D G A S A T Y E R L S V A L T V N P A K R W R 600
601 G K L A V Q A D L G N A Q R R S Y T L L A L L G G T F

```

Figura 28. Predição de estruturas secundárias da OrfE264 por PSIPred.

Através do PSIPred, elaborou-se a previsão das estruturas secundárias da sequência da OrfE264. Em rosa destacam-se as alfa-hélices e em amarelo as folhas-β.

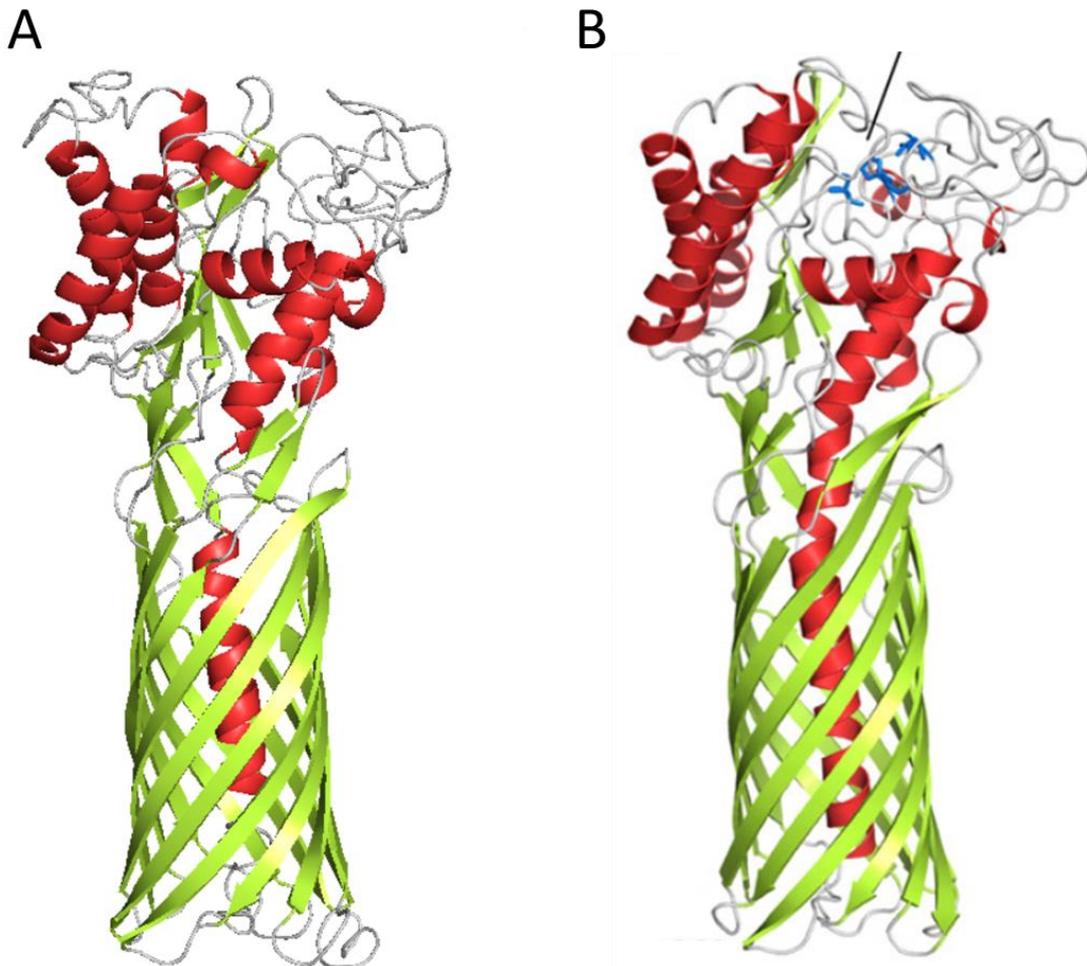


Figura 29. Comparação entre modelos OrfE264 e cristalografia da EstA

Observa-se a similaridade entre a OrfE264 (A) e a EstA (B) obtida pela cristalografia (VAN DEN BERG, 2010). Apesar das diferenças significativas entre as sequências primária, a conformação das autotransportadoras apresenta alta similaridade nas estruturas secundárias e como elas se organizam na proteína. Alfa-hélices coloridas em vermelho e folhas-beta em verde.

Buscou-se elaborar um modelo da inserção das sequências na membrana externa da bactéria, contudo para a OrfE264, os bancos de dados acessados pelos softwares não possuem a informação necessária para alocar os resíduos de aminoácidos em suas posições na membrana celular. Sendo assim, o Protter foi utilizado para gerar um modelo da EstA e similar ao elaborado pelos autores que a descreveram (WILHELM et al., 1999, 2007) com suas 11 regiões hidrofóbicas atravessando a membrana que provavelmente correspondem ao Barril- β que ancora a proteína na membrana externa e a cristalografia (VAN DEN BERG, 2010). É importante destacar que o algoritmo utilizado pelo Protter expõe *loops* apenas para a membrana externa e não para o periplasma, como ocorre no modelo inicial da EstA, representado na Figura 10 (WILHELM et al., 1999, 2007). Este modelo da EstA gerado pelo Protter serviu de base sobre o qual se desenvolveu uma inferência de como seria um modelo para a OrfE264 (Figura 30). As informações das características dos aminoácidos da OrfE264 foram resgatadas das análises do Praline (Figura 27) e PSIPred (Figura 28).

O resultado apresentado a seguir revela as similaridades entre as duas proteínas e suas regiões transmembranares assim como o potencial de aplicabilidade da OrfE264 e sua estrutura de autotransportadora tal qual como foi feito com a EstA (BECKER et al., 2005). A estrutura dessas proteínas desperta interesse biotecnológico para a exibição de enzimas nas superfícies celulares bacterianas (BERNSTEIN, 2015) tal como pode ser visto na Figura 12.

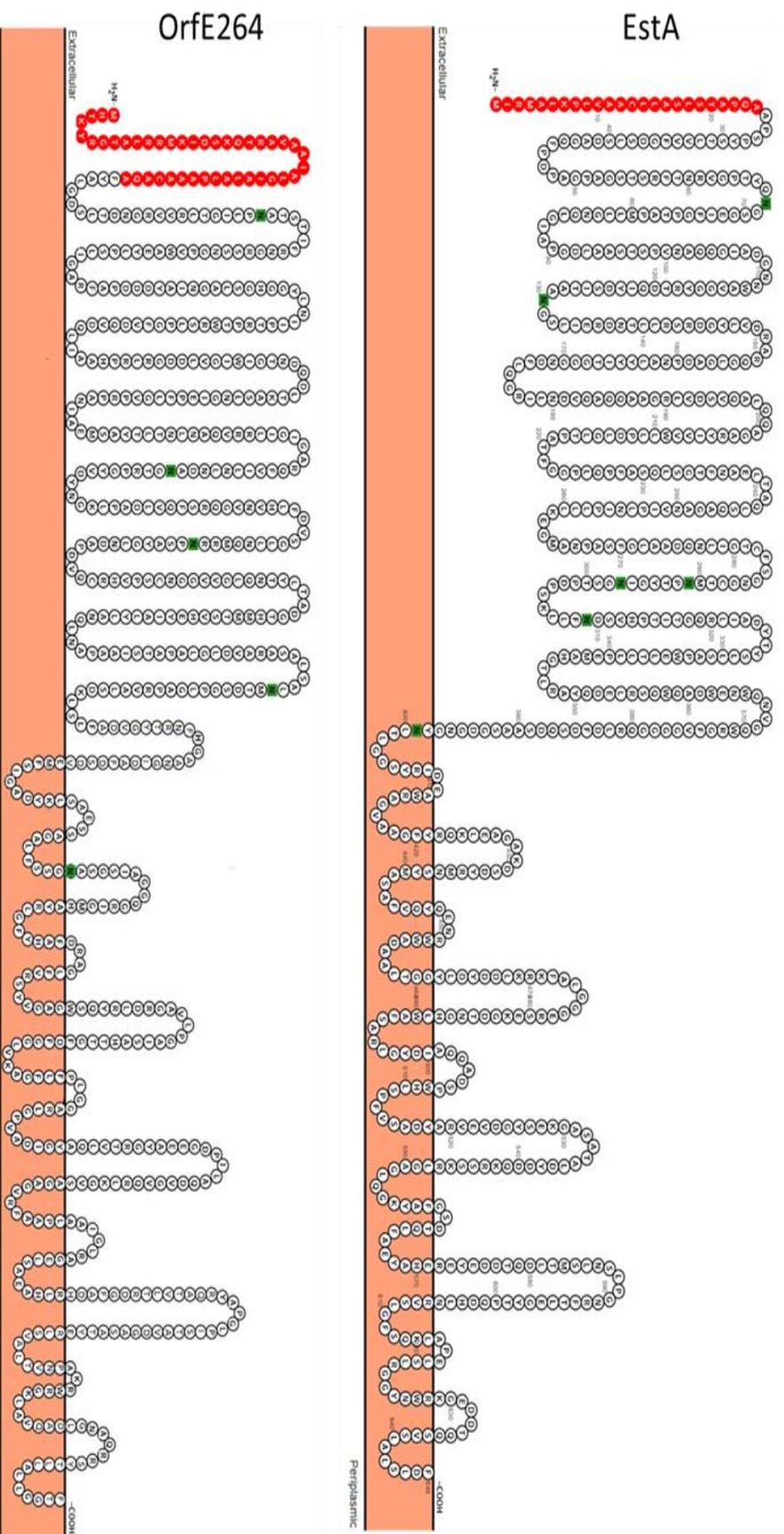


Figura 30. Modelo transmembrantar da Esta via Protter e proposta para OrfE264.

Elaborou-se um modelo transmembrantar da Esta (>sp|O33407|ESTA_PSEAE) utilizando as informações contidas no Uniprot. Dessa forma resgatou-se os domínios transmembranares do banco de dados para localizar os resíduos em um diagrama 2D. Em vermelho identifica-se a clivagem do peptídeo sinal. A partir desse modelo e dos dados do Praline, elaborou-se manualmente um modelo para a OrfE264 com base nas características dos aminoácidos presentes no alinhamento com o

4.2 Engenharia genética

A utilização das recombinases do pSIM18 (DATSENKO; WANNER, 2000; DATTA; COSTANTINO; COURT, 2006) se mostrou uma excelente estratégia para edição genômica em *B. thailandensis*. A utilização de um fragmento de DNA contendo regiões flanqueantes homólogas às sequências do genoma permitiu com sucesso a substituição do gene original pelo gene sintético mutante. O desenho da sequência se deu com base nas regiões de *Sma*I nativas, representadas em azul na Figura 31, sendo assim realizou-se uma deleção de um trecho da sequência com o uso desses sítios, representado em cinza, e uma posterior inserção do cassete de gene que confere resistência ao cloranfenicol, em verde na Figura 32. Sendo assim, a construção final do gene $\Delta orfE264::Cm$ resultou portanto em uma deleção seguida de uma inserção do cassete, como ilustrado abaixo. Esse gene foi construído utilizando um plasmídeo pBlueScript que originou o pBSK $\Delta orfE264::Cm$, representado na Figura 33.

GAATTCTTTTCGAATACGAGAAGGGCTCGCCACGAGCCTCGGACGAC**ATG**CATACCAAATATCGAGGGACGGCGCTCC
 GCCGAATGAAAATCGATTTCGAAGCAAACGCGCGCGGTTGCGGGCGATCGCGCTCGGCATCGCGCTGGCGCTGCCCGCGG
 CGGCTTGCGCCAAAGCGTTCTACGCGCTCGGCGACAGCCTGACCGACAACGGCCGCGTCTGAGGTTGACCGGCATCC
 TGCCGAACGCGACGTCGACGATCTTTCGCAACGGCCGCTCGTTCGAACGGCCCGGTGTGGGCCGAATACTTCCCGAGCC
 TGATCGGCGCGGATTCGCGCCCGATGACGATTACGCGATCAACGGCGCGCTGAGCGGGCACGGCGGCTATCTCAACA
 TCATCCCGACGCGCCGACTTGGCGCTCGCTG**CCCGGG**TTTCGTCGATCAGGTCGATCAACTGATCGCCGCGCATCCGC
 GCTTGGCGGGGACGATCTGGTCGGCATCTGGATCGGCACCAACGACCAGGATCTGACCAAGGCGAGCCTGAACGGCA
 TCGAGCCGTTTCTCGGCGTGCCTCGGCGGCAACATCGCGGAAATGAGCGGTACACGCTCACGAACCTCAATGCGC
 AGGTGCGGCGGTTGATCGGGATCGGCGCGCGCCAGTTCGTGATCCTGAACTTGAACGACGCCAACGGCACGCGGCCG
 GATATGTCGACTACAACGGCAAGCTGCCCGCGGATCTCGTGCAGTTCCTCGCGCAAGGTGTCAACGTTACCTGTTCCG
 ACGTGTGCGGCTGCTGAACAGATGCGCCGCAATCCGTCGCGATACGGGCTGAACGACGCGCCGACGTCGAATGCC
 GCCACGTGCCGTCCTGCAACGGCGGCGTCTGCGGCTGCAAAACACCTATCTCACGGCGGACGGCACGACATGATGA
 CGAGCGTGCACGATACATCGCTCTCTACCTCGCGAATCAGTGAATGCGCCGCGCGGATCTCGACCGCGCGCGCGC
 TCGGGCTCGACGTCG**CCCGGG**CGAGCGCGCTGTGCGGCGTGAACATGACCGACGCGGGCCGCTCGGTGCGCCGCGT
 TCGCGCTGTGCGACAAGCTGTGCTGTTGCGCCGAGCTCGGCTATACGCGCACTTTTACGGCGCGGCAACGGCATCG
 ACGGTTTCGACAGCGATGTCGAGATGTTCTCGATCGGCGCGGACTACAAGCTGTCCGCTGAGTCGAGCGCGCGCGC
 TCTTTTCGAGCGGCAACGCGAGCGGCTCGATCGCGCGCGGCAAGGGCGGATCGGATGCATGCATACCGGCTCGGCT
 TCATCATGCGTTTCGACCGCGCGGCTGTTTCGTGCGTTCGTACGTCGCGCGCAGGCTGGAGCCAGTATCGGCTCGATC
 GCGGCGCGGTGCTGCCGGGGGCGATCAGCGCGCATAACCACGGCTTCGATTTTCGGCGGGCTCGTCAAGGCCGATTCC
 TGTTCGCCGTTGGCGCGCGCGGCTTGGCCCGTTCGCGACATCGGTCAGCGCAGCTCGTCACGCGCGGCTACGCGG
 AGGAGGGGACCCGATCTCGCGCAGGACGTCGGCGTGCAGCGGCTGAAGGGCGTAAGCGCCGAGCGGGCGTGGCGT
 TCGCGGCGCGCTCGCGCGGATCGGCGTGCAGCGCGCGGAGTGTGTCGCGCAGGCGCACCTGCGGCACGATGCGGTTCCG
 GCGACCGCACGCTCGTCACGGCCAGCGTTATGCGCCCGTCTGCCGATCAGCACGGCCGTCGATGGCGCGAGCGCGA
 CCTATGAGCGGCTGTGCGTTCGCGCTCACCGTGAATCCCGCAAGCGGTGGCGGGGCAAGCTCGCCGTGCAGGCGGATC
 TCGCAACGCGCAGCGCGCTTTCGTACACGCTGCTCGCGTGTGGCGGCGACGTT**TGAGGATCC**

Figura 31. Sequência do gene *orfE264*.

Ilustra-se os sítios *Bam*HI em amarelo no início e final da sequência sintética a fim de se inserir no pBlueScript, o ATG inicial da sequência *orfE264* e o TGA final do *orfE264*. Em azul estão presentes os sítios *Sma*I utilizados para a inserção do cassete e em cinza destaca-se a região deletada da sequência.

GGATCCTTTTCGAATACGAGAAGGGCTCGCCACGAGCCTCGGACGAC**ATG**CATACCAAATATCGAGGGACGGCGCTCC
 GCCGAATGAAAATCGATTTCGAAGCAAACGCGCGCGGTTGCGGGCGATCGCGCTCGGCATCGCGCTGGCGCTGCCCGCGG
 CGGCTTGCGCCAAAGCGTTCTACGCGCTCGGCGACAGCCTGACCGACAACGGCCGCGTCTGAGGTTGACCGGCATCC
 TGCCGAACGCGACGTCGACGATCTTTCGCAACGGCCGCTCGTTCGAACGGCCCGGTGTGGGCCGAATACTTCCCGAGCC
 TGATCGGCGCGGATTCGCGCCCGATGACGATTACGCGATCAACGGCGCGCTGAGCGGGCACGGCGGCTATCTCAACA
 TCATCCCGACGCGCCGACTTGGCGCTCGCTG**TGACCCCGG**TTTTTGAGTTATCGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGC
TAAAATGGAGAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATATATCCCAATGGCATCGTAAAGAATTTTGGAGGCATT
TCAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTCAGCTGGATATTACGGCCTTTTTAAAGACCGTAAAGAAAAA
TAAGCACAAGTTTTATCCGGCTTTATTCACATTTTCGCCGCTGATGAATGCTCATCCGGAATTCGGTATGGCAAT
GAAAGACCGTGAGCTGGTGATATGGGATAGTGTTCACCCCTGTTACACCGTTTTCCATGAGCAAACTGAAACGTTTTTC
ATCGCTCTGGAGTGAATACCAGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATATTCGCAAGATGTGGCGTGTTCACGGTGA
AAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTTATTGAGAATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCCG
TTTTGATTTAAACGTGGCCAATATGGACAACCTTTCGCGCCCGTTTTTCACCATGGGCAAAATATATACGCAAGGCGA
CAAGGTGCTGATGCTGAGCTGGCGATTACAGTTTATCATGCGCTCTGTGATGGCTTCCATGTCGCGCGAATGCTTAATGA
ATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGCGTAACCCGGG****CGAGCGCGCTGTGCGGCGTGAACATGACCGAC
 AGCGGCGCGTTCGGTGCGCCGCGTGTGCGGCTGTGCGACAAGCTGTGCTGTTTCGCGCAGCTCGGCTATACGCGCAAC
 TTTACGGCGCGGCAACGGCATCGACGCGTTCGACAGCGATGTCGAGATGTTCTCGATCGGCGCGGACTACAAGCTG
 TCCGCTGAGTCGAGCGCGCGCGCTCTTTTCGAGCGGCAACGCGAGCGGCTCGATCGCGCGCGGCAAGGGCGGATC
 GCGATGCATGCATACCGGCTCGGCTTCTATCATGCGTTTCGACCGCGCGGCGCTGTTTCGTGCGTTCGTACGTCGCGCGA
 GGCTGGAGCCAGTATCGGCTCGATCGCGCGCGGCTGCTGCCGGGGCGATCAGCGCGCATAACCACGGCTTCGATTTCC
 GCGGGCTCGTCAAGGCCGATTCCTGTTCCCGCTTGGCGCGCGCGGCTTGGCCCCGTTCGCGACATCGGTTACGCG
 CAGCTCGTCACGCGCGGCTACGCGGAGGAGGGCGACCCGATCCTCGCGCAGGACGTCGGGCTGCAGCGGCTGAAGGGC
 GTAAGCGCGGAGCGGGCGTGCCTTTCGCGCGCGCTTCGCGGCGATCGGGCTGCGCGCGCGCGAGTGTCCGCGCGAG
 GCGCACCTGCGGCACGATGCGTTTCGGCGACCGCACGCTCGTCACGGCCAGCGTTATGCGCCCGGCTGCGCGATCAGC
 ACGCGGCTCGATGGCGCGAGCGCGACCTATGAGCGGCTGTGCGTTCGCGCTCACCGTGAATCCCGCAAGCGGTGGCGG
 GGCAAGCTCGCCGTGCAGGCGGATCTCGGCAACGCGCAGCGCGCTTTCGTACACGCTGCTCGCGTGTGGCGGCGACG
 TTT**TGAGGATCC**

Figura 32. Sequência do gene Δ *orfE264*.

Ilustra-se os sítios *Bam*HI em amarelo no início e final da sequência sintética inserida no pBlueScript, o ATG inicial do cassete de cloranfenicol em vermelho, e o TGA final em rosa do *orfE264*. Em verde está a sequência do gene que confere resistência ao cloranfenicol precedido de sua região upstream com o RBS (em amarelo). Em azul estão presentes os sítios *Sma*I utilizados para a inserção do cassete.

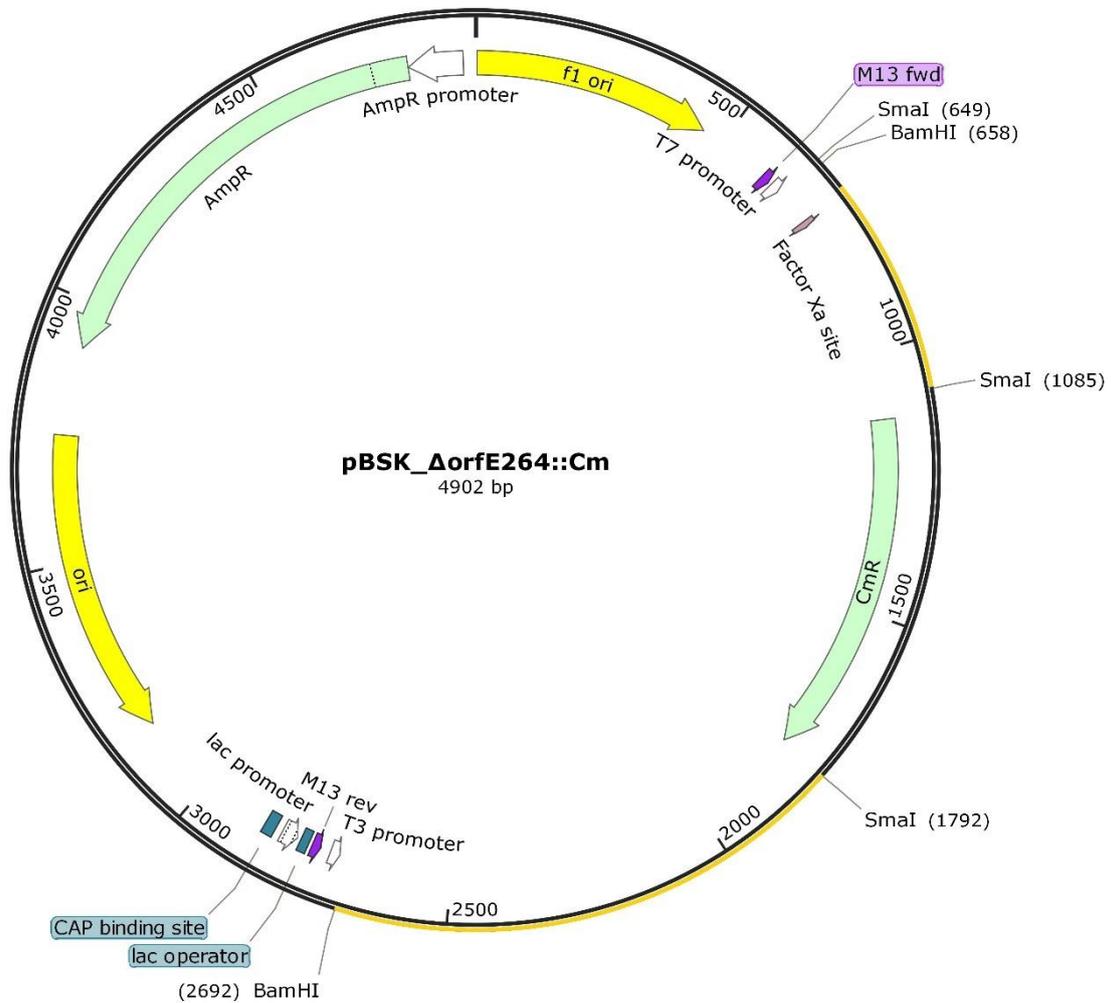


Figura 33. Mapa do pBSK_ΔorfE264::Cm.

O plasmídeo pBluescript-SK atua como arcabouço para o gene sintético *orfE264*, destacado em amarelo, inserido através das enzimas de restrição *Bam*HI e interrompido por um cassete de cloranfenicol, inserido pelas enzimas de restrição *Sma*I, originalmente presentes no gene. O processo foi realizado pela Epoch Life Sciences. Esse cassete de cloranfenicol está sob regulação do promotor T7. Mapa elaborado pelo software SnapGene Viewer.

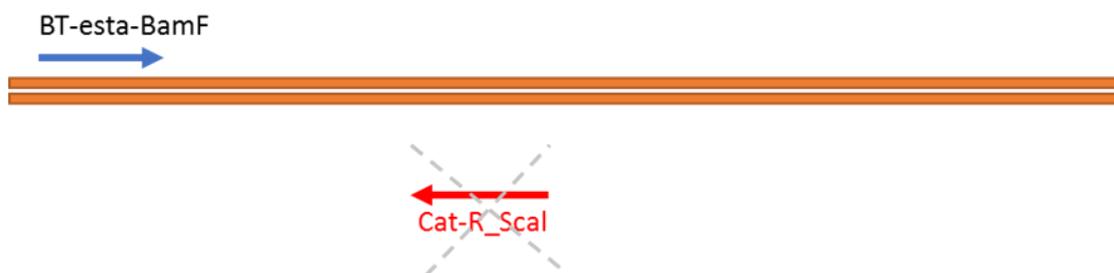
O gene $\Delta orfE264::Cm$ construído foi clivado do plasmídeo com enzimas de restrição e purificado através da extração de banda do gel de agarose. Sendo assim, foi possível construir a cepa de *B. thailandensis* com o gene *orfE264* substituído por uma sequência interrompida pelo cassete da cloranfenicol-acetil-transferase com o objetivo de nocauteá-lo e obter uma bactéria mutante incapaz de sintetizar a proteína.

Ainda se fazia necessária a confirmação do nocaute no genoma, sendo assim se procedeu com a metodologia do Southern Blot. A utilização de uma sonda específica para uma sequência de DNA permitiu explorar as possibilidades da construção $\Delta orfE264::Cm$, com suas regiões similares à *orfE264* e com sua sequência do gene da cloranfenicol-acetil-transferase.

O primeiro passo consistiu em extrair o DNA genômico das cepas selvagem e $\Delta orfE264::Cm$. A utilização de um kit otimizou e normalizou com sucesso essa etapa. Em seguida esses DNAs genômicos foram utilizados como molde de uma reação de PCR utilizando um set de primers capaz de amplificar do início da sequência da *orfE264* até o final do cassete.

A princípio o próprio PCR já seria suficiente para indicar a alteração da sequência, uma vez que não haveria como um dos primers se alinharem na sequência selvagem, contudo dada a complexidade do genoma, se faz necessário o uso de uma sonda que reconheça uma região maior para evitar que regiões arbitrárias tenham sido amplificadas. Também é essencial a presença de controles como forma de garantir o funcionamento da reação, sendo assim os plasmídeos pUCP26_*orfE264*, com o gene selvagem da *orfE264*, e o pBSK_ $\Delta orfE264::Cm$, com o gene contendo a interrupção da sequência, serviram a esse propósito. A Figura 34 ilustra os primers da reação e o mapeamento de seu anelamento assim como a reação de PCR resultante do processo na Figura 35.

orfE264



$\Delta orfE264::Cm$

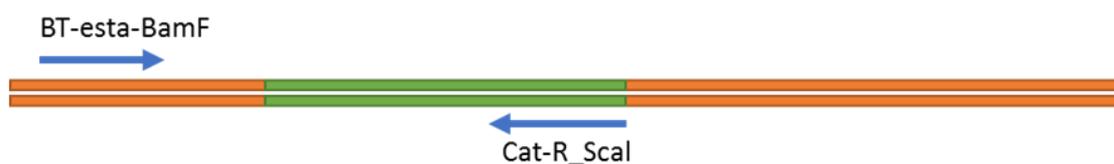


Figura 34. Mapeamento das regiões amplificadas por PCR.

Apenas haverá o anelamento dentro da sequência com a inserção do cassete de cloranfenicol (verde) pelo primer reverso (Cat-R_ScaI) na sequência $\Delta orfE264::Cm$, ao passo que o primer forward anela em ambas as sequências. Sendo assim a reação apenas amplificará a sequência com o nocaute com 1806pb.

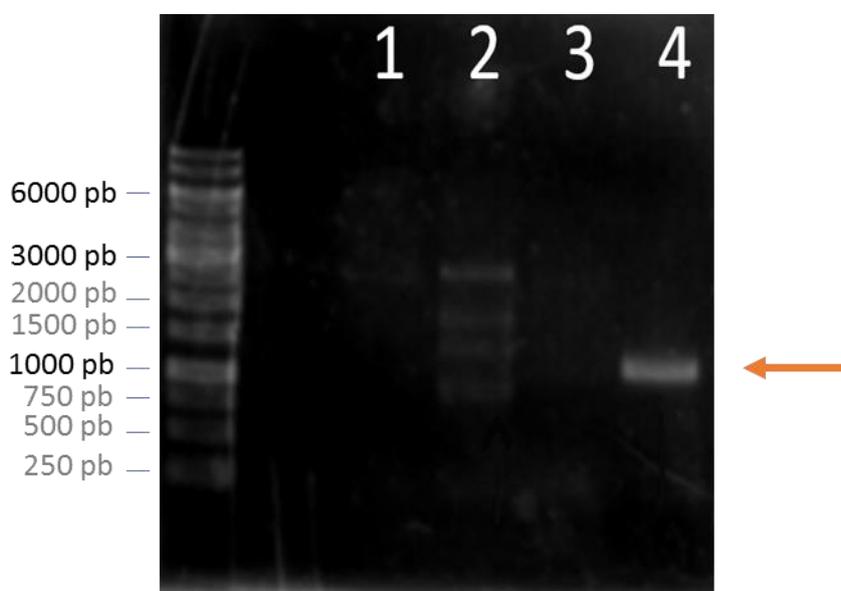


Figura 35. Eletroforese dos produtos do PCR comparativo.

A figura ilustra os produtos amplificados a partir dos templates (1) gDNA selvagem, (2) gDNA Mutante $\Delta orfE264::cm$, (3) pUCP26_ *orfE264*, (4) pBSK $\Delta orfE264::cm$. Produto obtido com tamanho esperado de 1086 pb destacado pela seta vermelha.

Para se proceder com o Southern Blot, se faz necessária uma sonda com nucleotídeos modificados. Como forma de analisar as sequências amplificadas, duas sondas foram geradas: uma sendo a *orfE264* com 1931 pb obtida a partir da extração do fragmento do gene do plasmídeo pUCP26_*orfE264* e a outra com a sequência da cloranfenicol-acetiltransferase, obtida pelo uso de primers específicos para amplificá-la por PCR usando como molde o plasmídeo pBSK_ Δ *orfE264*::Cm e com 701 pb. A elaboração da sonda é uma marcação com DIG-nucleotídeos que consiste na reação da enzima Klenow associada com a presença de primers randômicos e abastecida com nucleotídeos modificados. Isso permite o reconhecimento desses nucleotídeos por um anticorpo conjugado a uma enzima que utiliza o NBT/BCIP como substrato para gerar uma marcação colorimétrica. Marcação essa que fica localizada na altura da banda do gel de agarose transferido, o que permite a determinação dos tamanhos das amostras de DNA. A Figura 36 ilustra o processo de elaboração de cada uma das sondas. Dessa forma, com a possibilidade de uso de ambas as sondas, foi realizado um PCR com o gDNA da cepa selvagem e o gDNA da cepa Mutante Δ *orfE264*::*cm*, também se utilizou o pBSK_ Δ *orfE264*::*cm* como controle positivo. Foram realizados dois géis de agarose em conjunto e transferência para a membranda de Nylon para ambas as amostras a serem analisadas pelas sondas *orfE264* e *cm*. O Southern blot, após a transferência, se procedeu de forma individual para cada uma das sondas.

Depois da revelação, o que se evidenciou nas membranas foi um sinal consideravelmente mais forte da sonda *cm* do que da sonda *orfE264* (Figura 37). Essa variação possivelmente deve-se a quantidade de bases identificadas por cada uma delas, pois a sonda *cm*, apesar de ser menos extensa, possui uma cobertura muito maior do que a sonda *orfE264*. Pelo resultado, evidencia-se a presença de uma única banda quando o DNA genômico mutante foi empregado como template, diferentemente do que era observado no gel de agarose com a identificação de múltiplas bandas no produto obtido do plasmídeo controle pBSK_ Δ *orfE264*::Cm. Isto se deve à sensibilidade do método que detecta os produtos de PCR do plasmídeo distribuídos pelo gel.

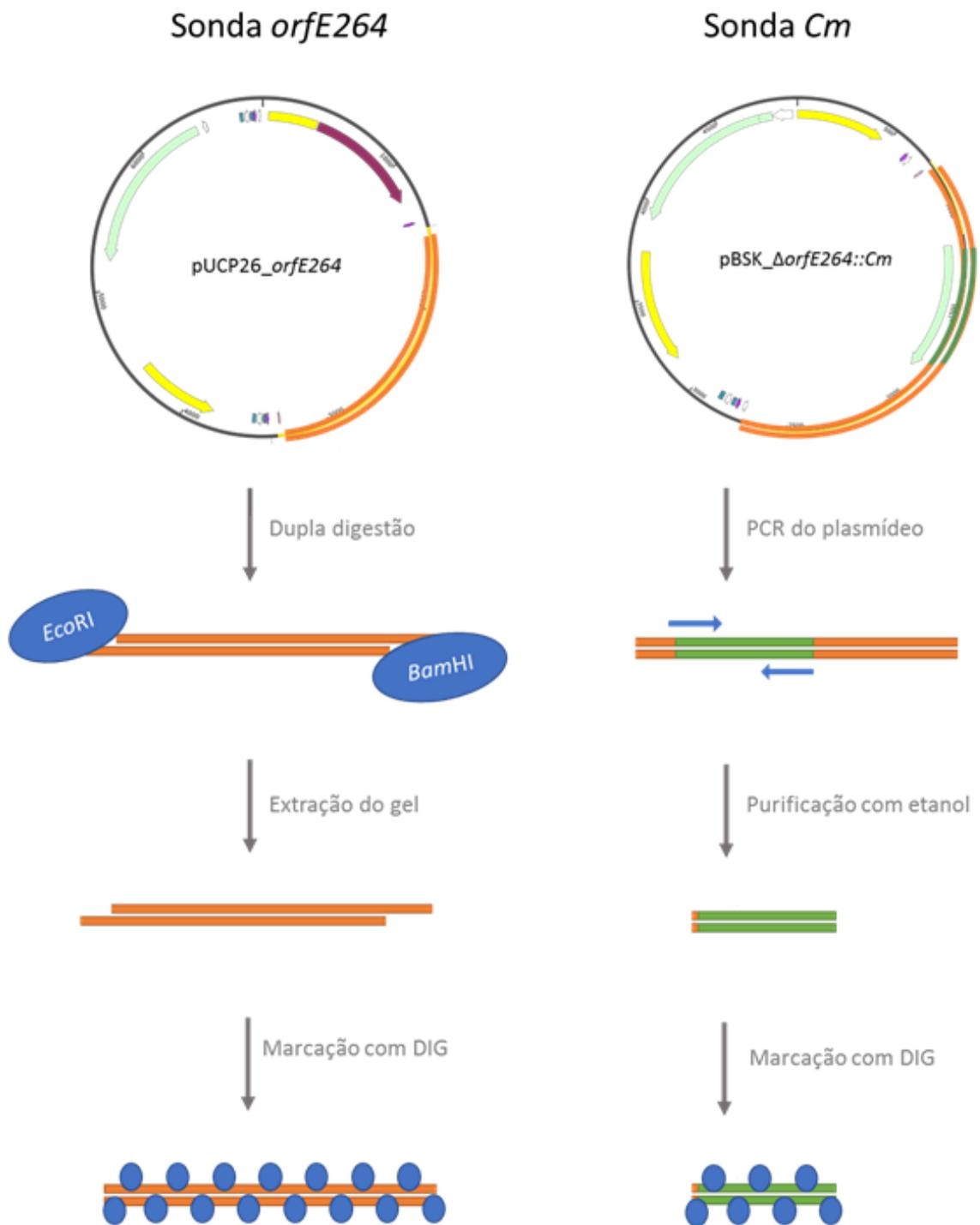


Figura 36. Processo de elaboração das sondas.

A sonda *orfE264* foi obtida a partir de um fragmento plasmidial removido por dupla digestão e extração de banda de gel de agarose para ser marcado com DIG. A sonda *Cm* foi obtida a partir de uma reação de PCR purificada para ser marcada com DIG.

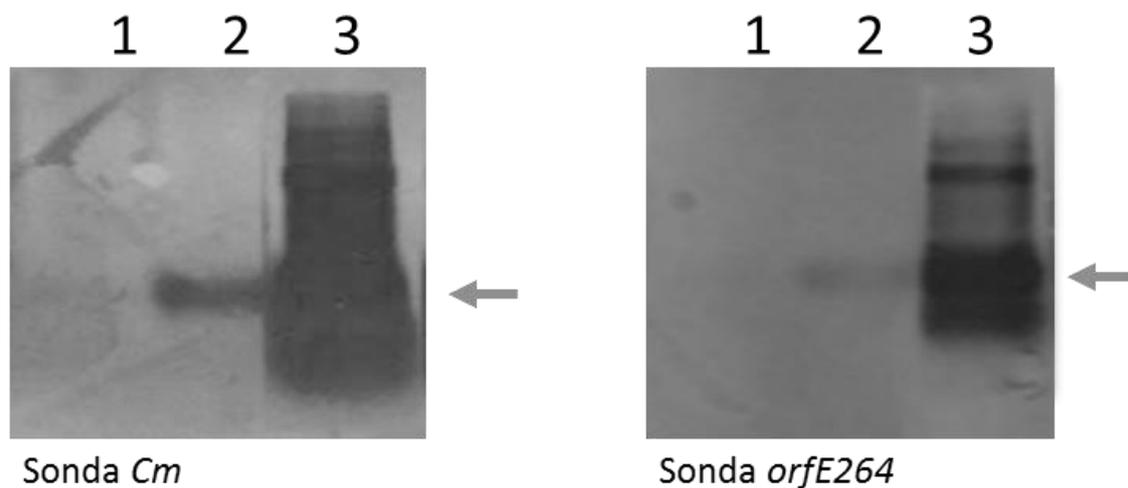


Figura 37. Southern Blot com sondas específicas para *orfE264* e para o cassete de cloranfenicol (*Cm*).

As setas indicam as posições dos alvos nos produtos de PCR do gDNA mutante $\Delta orfE264$ e no plasmídeo contendo o gene $\Delta orfE264$. (1) gDNA selvagem *B. thailandensis* E264, (2) gDNA Mutante *B. thailandensis* E264 $\Delta orfE264::Cm$, (3) pBSK_ $\Delta orfE264::Cm$ amplificado.

Não se pode deixar de notar a presença de múltiplas bandas no plasmídeo, contudo uma explicação possível para a presença dessas múltiplas bandas é o fato de haver diferentes formas plasmidiais restantes ainda no produto de PCR que não são resolvidas e também a concatenação de fragmentos de PCR devido à alta concentração e ao elevado conteúdo de CG.

Portanto o Southern Blot e a combinação de sondas foram uma estratégia eficiente na proposta de se localizar o nocaute no genoma de *B. thailandensis* a partir da detecção do cassete de cloranfenicol em gDNA.

4.3 Complementação plasmidial

Como forma de se avaliar a importância da OrfE264, o plasmídeo pUCP26 contendo o gene *orfE264* foi inserido na cepa mutante nocauteada para comparação e avaliação de recuperação de fenótipo. Além disso, o plasmídeo pUCP26 contendo o *estA* foi inserido na cepa mutante para avaliação da expressão heteróloga. A seguir ilustra-se os mapas das construções plasmidiais finais utilizadas para a complementação *in trans* da cepa mutante desse estudo com *orfE264* (Figura 38) ou *estA* (Figura 39).

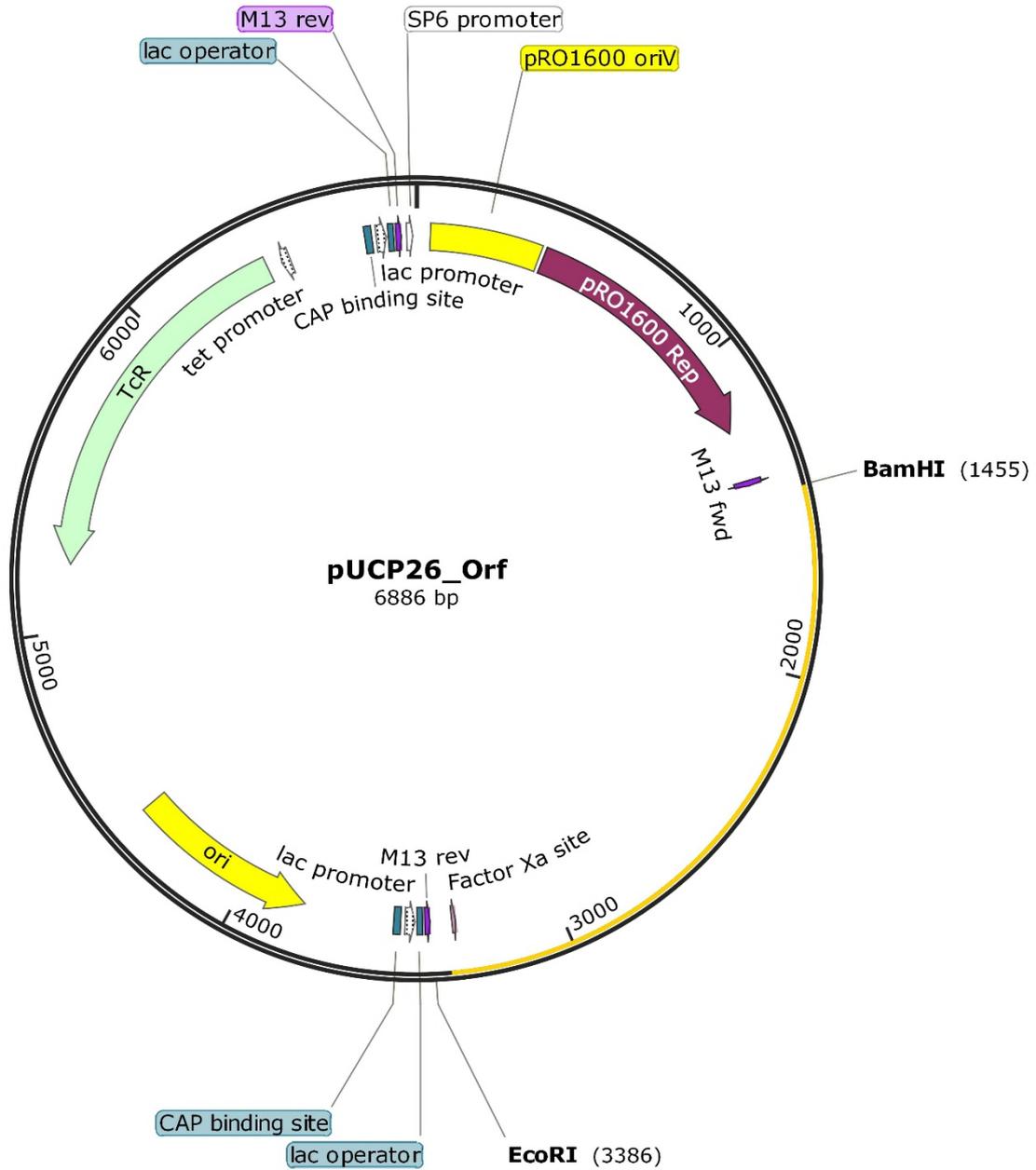


Figura 38. Mapa do pUCP26_orfE264.

O plasmídeo pUCP26 atua como arcabouço para o gene sintético *orfE264*, destacado em amarelo, inserido através das enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI* pela Epoch Life Sciences (Sugar Land TX, EUA). Esse gene está sob regulação de um promotor lac. Mapa elaborado pelo software SnapGene Viewer.

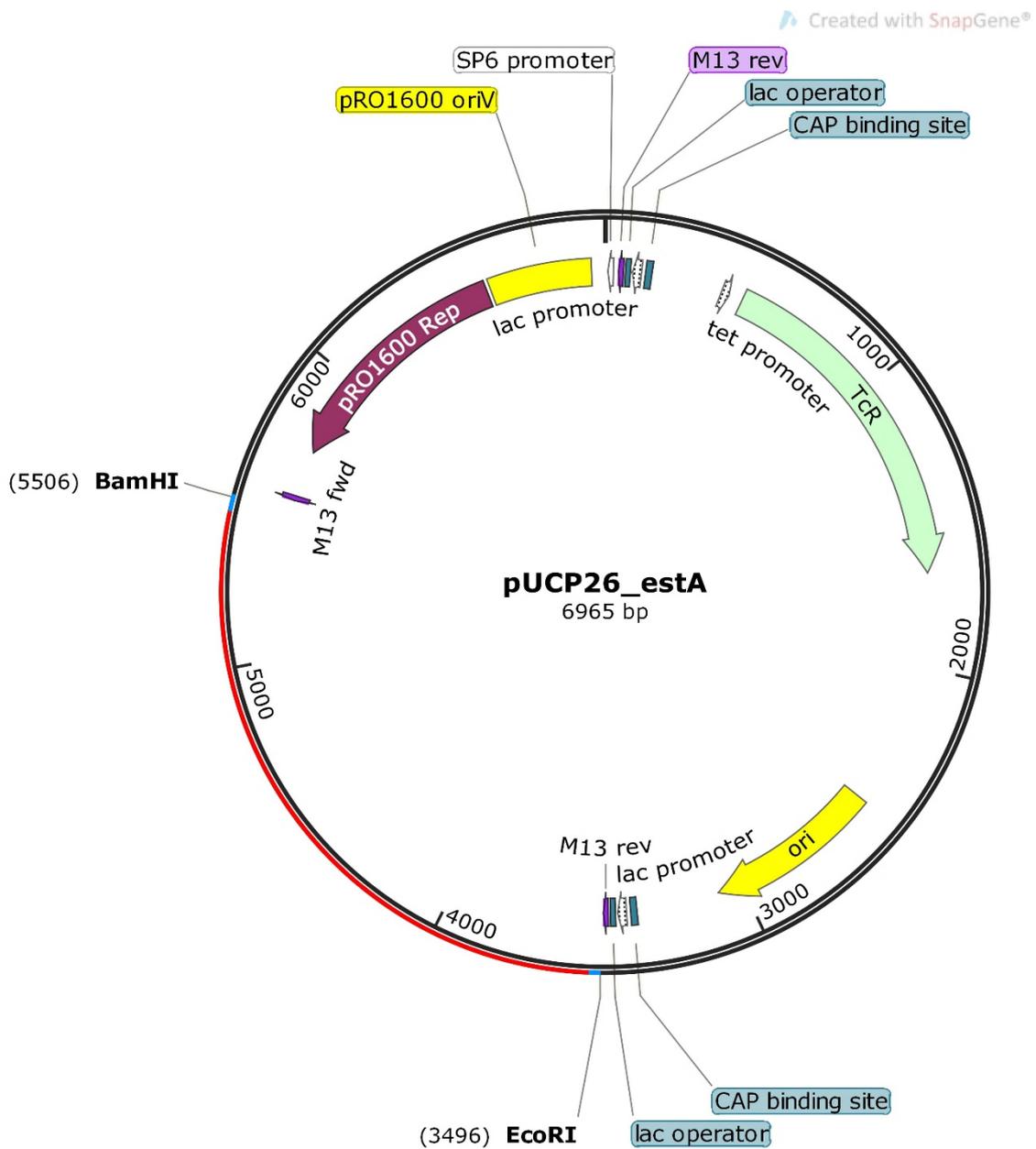


Figura 39. Mapa do pUCP26_estA.

O plasmídeo pUCP26 atua como arcabouço para o gene sintético *estA* destacado em vermelho, inserido através das enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI* pela Epoch Life Sciences (Sugar Land TX, EUA) (DOBLER, 2014). Esse gene está sob regulação de um promotor *lac*. Mapa elaborado pelo software SnapGene Viewer.

Dessa forma, a partir da cepa mutante foi possível realizar diferentes combinações para se estudar os efeitos da expressão da OrfE264 ou da EstA na *B. thailandensis*. Os plasmídeos pUCP26 contendo *orfE264* ou *estA* foram introduzidos nas variantes de forma que fosse possível obter os mais diversos fenótipos. A Figura 40 ilustra a coleção de cepas utilizadas nesse estudo.

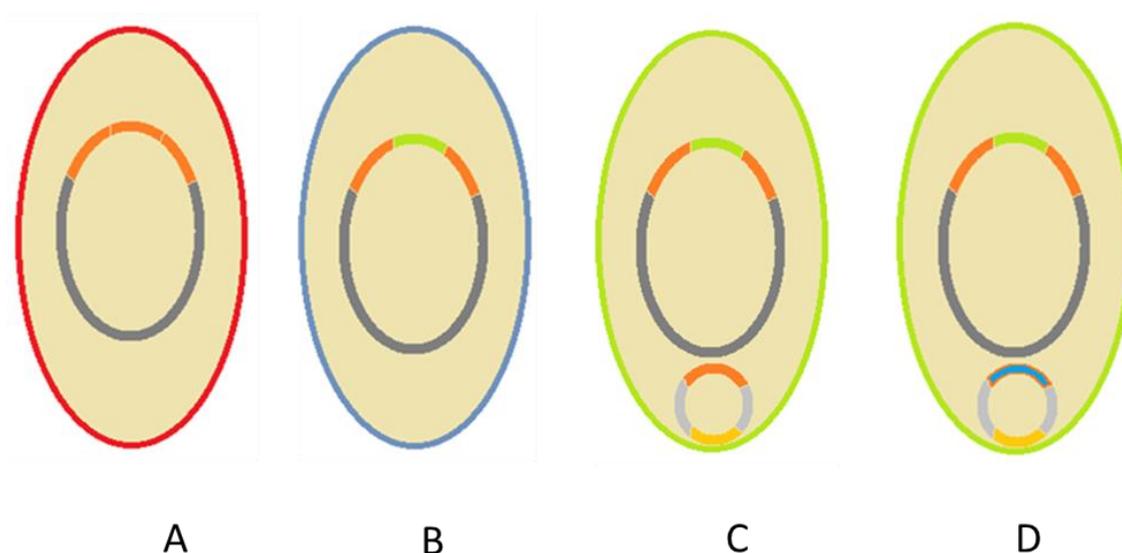


Figura 40. Esquema das cepas de *B. thailandensis*.

(A) Cepa selvagem; (B) *B. thailandensis* E264 Δ *orfE264*, (C) Cepa *B. thailandensis* E264 Δ *orfE264* com plasmídeo contendo a *orfE264*; (D) *B. thailandensis* E264 Δ *orfE264*::Cm complementada com plasmídeo contendo *estA*.

4.4 Análise dos fenótipos celulares

4.4.1 Quantificação de biofilme aderente

Como forma de se avaliar os efeitos da OrfE264 no fenótipo de formação de biofilme, inoculou-se as cepas em placas multipoços de poliestireno e o biofilme aderido foi dosado com cristal violeta. O que se revelou nesse resultado, ilustrado na Figura 41, é a formação deficiente de biofilme pela cepa nocauteada para a OrfE264. Seu biofilme é quantitativamente menor em comparação à cepa selvagem a ponto de ser visível sem a necessidade de espectrofotômetro por não apresentar uma intensidade tão forte de coloração por cristal violeta. Essa deficiência é restaurada ao fenótipo selvagem uma vez

que os genes *orfE264* ou *estA* sejam expressos por complementação plasmidial. Inclusive os níveis levemente mais elevados podem ser explicados pelo fato do pUCP26 ser um plasmídeo multicópias de expressão constitutiva em *B. thailandensis*, o que possivelmente gera uma carga extra de expressão.

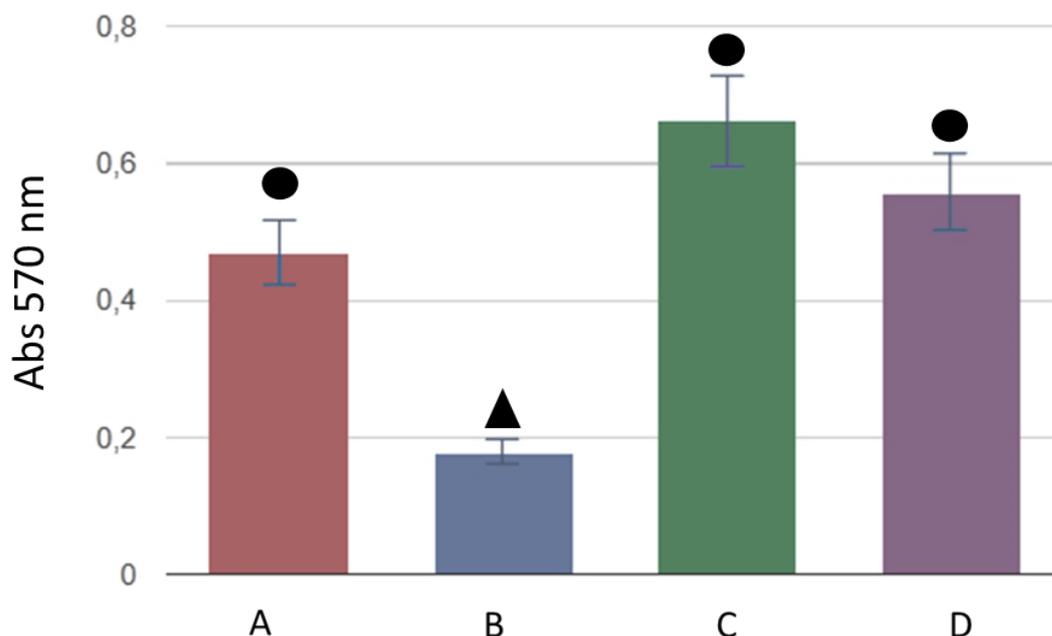


Figura 41. Quantificação de biofilmes aderentes crescido em placas de 24 multipoços de poliestireno.

A formação de biofilme apresenta-se deficiente na cepa nocauteada para *orfE264*. (A) Cepa selvagem *B. thailandensis* E264; (B) *B. thailandensis* E264 $\Delta orfE264::Cm$, (C) *B. thailandensis* E264 $\Delta orfE264::Cm$, complementada com plasmídeo expressando a *orfE264*; (D) *B. thailandensis* E264 $\Delta orfE264::Cm$ complementada com plasmídeo expressando a *estA*. Teste de Tukey, $p < 0,01$ agrupa A,C e D em um conjunto (indicado pelos círculos) e B em outro (indicado pelo triângulo). Isto revela o potencial de complementação plasmidial para restauração do fenótipo.

Os dados foram tratados com ANOVA uma vez que ocorria a distribuição normal e $p < 0,01$. Sendo assim, se procedeu com um teste de Tukey da diferença honestamente significativa como forma de identificar grupos dentro do n-amostal. Identificou-se um grupo estatisticamente diferente formado pela mutante $\Delta orfE264::Cm$ em comparação com as demais.

Uma possível explicação para esse fenótipo obtido entre as cepas é a possibilidade da OrfE264, assim como observado para EstA, atuar no metabolismo de raminolipídeos, os quais por conta de suas propriedades anfipáticas gerariam poros no biofilme (DE BEER; SRINIVASAN; STEWART,

1994). A ausência desses poros na cepa mutante potencialmente geraria uma difusão dificultada, o que seria um fator limitante para a formação de biofilmes já descrito (LEVI et al., 2017; SCHRAMM et al., 1999). Com essa dificuldade de difusão, ocorreria a menor disponibilidade de oxigênio, e um biofilme cultivado *in vitro* não teria o micronicho de anaeróbios, uma vez que a *B. thailandensis* não apresenta metabolismo fermentativo. Dessa forma, a ausência da OrfE264 potencialmente afetaria a sobrevivência das células sem a formação de poros no biofilme pois a *B. thailandensis* é uma aeróbia estrita e a ausência desses canais acarretaria a formação de um micronicho anaeróbio o que incapacitaria a sobrevivência da comunidade. Uma vez complementada, as cepas passam a expressar ou a OrfE264 ou a EstA e restauram o fenótipo possivelmente pela formação desses canais que viabilizam a oxigenação.

Outro fator, é a possibilidade de ocorrer a interferência no sistema QS. A comunicação celular e a percepção da densidade populacional são essenciais para a formação de biofilme (AREVALO-FERRO et al., 2005; ELASRI et al., 2001; PIERSON et al., 1998; STEIDLE et al., 2001). Estudos com mutantes deficientes para o sistema QS revelam os efeitos gerados na formação de biofilme e restaurados com a complementação (STICKLER et al., 1998). Uma vez que a função da EstA e da OrfE264 não estão descritas, pode-se pensar que atuem de alguma forma na comunicação célula-célula e que por conta disso se observe o fenótipo deficiente com o nocaute e a restauração com a complementação plasmidial.

O uso da *B. thailandensis* como modelo é importante para se identificar alternativas para o controle de formação de biofilme por outras bactérias patogênicas tal como ocorre em catéteres (DONLAN, 2001) ou em enfermidades como é a fibrose cística (COSTERTON, 1999). Na potencial era pós-antibiótica, o QS e a formação de biofilme vinculadas a doenças são potenciais alvos alternativos (BASSLER; SWEM, 2013; NG et al., 2012; PACZKOWSKI et al., 2017), sendo as proteínas similares à EstA um potencial *bottle-neck*. Além disso, com o impacto gerado pelo biofilme na indústria, seja como fator negativo, com a biocorrosão, como fator positivo, biorremediação

(YONG et al., 2015), *B. thailandensis* entra como modelo de estudo para otimização dos processos.

4.4.2 Motilidade celular

A motilidade celular está vinculada à produção de biossurfactantes e à atividade de EstA, sendo assim é de se esperar que a OrfE264 tivesse influência sobre esse fenótipo de deslocamento celular. O *swarming*, como descrito anteriormente, é um tipo de motilidade bacteriana dependente do movimento flagelar em superfícies. A análise da distribuição das células selvagens e nocauteadas demonstra um espalhamento muito mais eficiente quando há a presença da OrfE264 funcional. A Figura 42 apresenta o deslocamento de 5 pontos de inóculos das duas cepas de forma que se observa uma camada de células bem menos espessa e mais expandida para a cepa selvagem e uma sobreposição de camadas celulares mais densas para a cepa nocauteada.

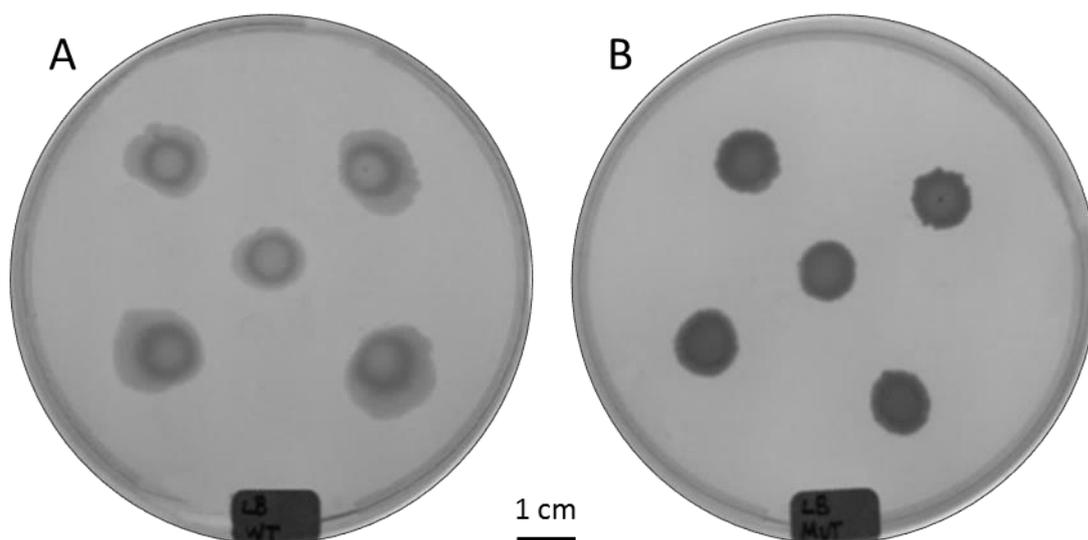


Figura 42. Comparativo das cepas de *B. thailandensis* crescidas em meio semi-sólido após 48h.

(A) Cepa selvagem *B. thailandensis* E264; (B) *B. thailandensis* E264 Δ orfE264::Cm.

Análises envolvendo as outras cepas deste estudo também foram realizadas. Os resultados revelaram a capacidade de gerar diferentes padrões pela *B. thailandensis*. Ainda não estão elucidadas as vias responsáveis pelo

swarming e sua regulação, contudo os efeitos gerados pela expressão da OrfE264, assim como ocorre com a EstA, são visivelmente importantes. O que falta é determinar o mecanismo de ação e como se estabeleceria uma rota metabólica. A figura a seguir mostra além dos padrões visuais do *swarming*, as diferenças entre os deslocamentos celulares com os perfis genéticos das cepas, principalmente em como a cepa nocauteada (B) se comporta de forma diferente das demais. A análise da motilidade ilustrada na Figura 43 usa como parâmetro a distribuição da cepa nocauteada (B) e demonstra mais claramente a restauração dos fenótipos com a complementação plasmidial tanto pela *orfE264* (C) quanto pela *estA* (D) quando comparada com a cepa selvagem (A). Para isso círculos com o tamanho delimitado pela $\Delta orfE264::Cm$ foram dispostos sobre as outras cepas como forma de analisar o deslocamento a partir do espaço ocupado pela mutante nocauteada.

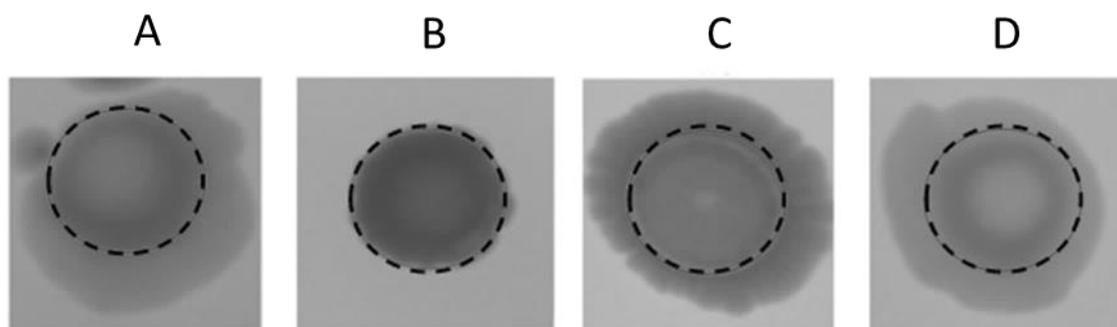


Figura 43. Motilidade celular por *swarming*.

(A) Cepa selvagem *B. thailandensis* E264; (B) *B. thailandensis* E264 $\Delta orfE264::Cm$, (C) *B. thailandensis* E264 $\Delta orfE264::Cm$, complementada com plasmídeo expressando o *orfE264*; (D) *B. thailandensis* E264 $\Delta orfE264::Cm$ complementada com plasmídeo expressando o *estA*. Os círculos pontilhados possuem o mesmo diâmetro medido a partir do ponto de inóculo da cepa *B. thailandensis* E264 $\Delta orfE264::Cm$ com 1.13 centímetros.

Apesar da literatura não esclarecer de forma conclusiva tanto o fenômeno de *swarming* como o papel das autotransportadoras no deslocamento celular a importância de sua presença é cada vez mais clara. Estudos mais aprofundados ainda são necessários, contudo é evidente a conexão entre a funcionalidade da OrfE264 com os fenótipos de deslocamento bacteriano do tipo *swarming*.

Realizando um paralelo com os raminolipídeos, pode-se fazer uma análise do possível papel atuante da OrfE264 e da EstA sobre os biossurfactantes. Os surfactantes podem gerar uma película límpida e aquosa que precede as células facilitando o *swarming* (ALBERTI; HARSHEY, 1990; JULKOWSKA et al., 2004; KEARNS; LOSICK, 2003; RASHID; KORNBERG, 2000; SENESI et al., 2002). Sendo a produção de raminolipídeos regulada pelo QS, estes são eficazes somente em alta concentração e, como foi levantado anteriormente, o QS pode ter evoluído para garantir que sejam produzidos somente quando houver bactérias suficientes para tornar o gasto benéfico (ANTHONI; LINDUM, 1998; EBERL et al., 1996; KEARNS, 2010; MAGNUSON; SOLOMON; GROSSMAN, 1994; OCHSNER; REISER, 1995). Isto pode ser visto na regulação de raminolipídeos por *P. aeruginosa* em que sistemas distintos de QS regulam a produção de surfactantes (DOBLER et al., 2016; REIS et al., 2011). O nocaute da OrfE264 teria potencialmente afetado a produção de raminolipídeos ou o QS. A restauração do fenótipo por complementação plasmidial restaura, portanto, a capacidade de motilidade do tipo *swarming*.

5 Conclusão

- Através da prospecção de autotransportadoras do tipo EstA, através da análise genômica por bioinformática foi possível identificar a OrfE264 em *Burkholderia thailandensis* com uma estrutura de domínios de interesse caracterizada por uma esterase e um barril- β
- A caracterização *in silico* da proteína autotransportadora codificada pela *orfE264* revelou grande similaridade estrutural e funcional com a EstA de *Pseudomonas aeruginosa*. na estrutura terciária Isto é de extrema importância para um melhor entendimento dessa família de proteínas e de como o sistema de secreção de autotransportadoras se estrutura.
- A estratégia para construção de uma cepa de *B. thailandensis* deficiente para a *orfE264* com recombinases virais foi bem sucedida assim como a complementação com *orfE264* e com esta por plasmídeos.
- Através da caracterização molecular do nocaute, comprovou-se a alteração no gDNA da cepa deficiente para a *orfE264* pela interrupção gênica.
- A comparação fenotípica quanto à formação de biofilmes para as diferentes linhagens em estudo revelou a perspectiva da OrfE264 e a EstA serem análogas funcionalmente uma vez que a complementação cruzada com EstA também restaurou o fenótipo.
- A motilidade celular do tipo *swarming* revelou a importância da expressão da OrfE264 para o deslocamento celular e as diferentes linhagens em estudo revelaram que é possível restaurar este fenótipo por complementação cruzada com a EstA.

6 Perspectivas

- Localização da OrfE264 nos compartimentos celulares da membrana externa, periplasma e citoplasma, através de fracionamento celular seguido de imunomarcação.
- Análise estrutural dos biofilmes aderentes por microscopia de fluorescência confocal.
- Investigação do envolvimento da OrfE264 na produção de raminolipídeos
- Papel da OrfE264 na interação com o hospedeiro vegetal *Oryza sativa L.* e com outras espécies bacterianas

7 Referências

ABALOS, A. et al. Physicochemical and Antimicrobial Properties of New Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from Soybean Oil Refinery Wastes. **American Chemical Society**, v. 17, n. 5, p. 1367–1371, 2001.

ABDEL-MAWGOUD, A. M.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. **Rhamnolipids: Diversity of structures, microbial origins and roles** *Applied Microbiology and Biotechnology* Springer-Verlag, , 25 maio 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00253-010-2498-2>>. Acesso em: 17 abr. 2017

AKOH, C. C. et al. GDSL family of serine esterases/lipases. **Progress in Lipid Research**, v. 43, n. 6, p. 534–552, 2004.

AL-MAJED, A.; ADEBAYO, A.; HOSSAIN, M. A sustainable approach to controlling oil spills. **Journal of environmental management**, v. 113, p. 213–227, 2012.

AL-TAHHAN, R.; SANDRIN, T.; BODOUR, A. Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3262–3268, 2000.

ALBERTI, L.; HARSHEY, R. Differentiation of *Serratia marcescens* 274 into swimmer and swarmer cells. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 8, p. 4322–4328, 1990.

ALLAN, D.; DANCE, B. Melioidosis and Glanders as Possible Biological Weapons. In: FONG, I. W.; ALIBEK, K. (Eds.). . **Bioterrorism and Infectious Agents**. New York, NY: Springer New York, 2005. p. 99–145.

ANTHONI, U.; LINDUM, P. N-Acyl-L-Homoserine Lactone Autoinducers Control Production of an Extracellular Lipopeptide. **Journal of bacteriology**, v. 180, n. 23, p. 6384–6388, 1998.

AREVALO-FERRO, C. et al. Biofilm formation of *Pseudomonas putida*

IsoF: The role of quorum sensing as assessed by proteomics. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 87–114, 2005.

BASSLER, B. L.; MILLER, M. B. Quorum Sensing. In: **The Prokaryotes**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 495–509.

BASSLER, B.; SWEM, L. Inhibition of quorum sensing-mediated processes in bacteria. **US Patent 8,568,756**, v. 1, n. 19, 2013.

BE'ER, A. et al. *Paenibacillus dendritiformis* bacterial colony growth depends on surfactant but not on bacterial motion. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 18, p. 5758–5764, 2009.

BEAL, R.; BETTS, W. Role of rhamnolipid biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 1, p. 158–168, 2000.

BECKER, S. et al. A generic system for the *Escherichia coli* cell-surface display of lipolytic enzymes. **FEBS Letters**, v. 579, n. 5, p. 1177–1182, 2005.

BEENKEN, K. E. et al. Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 14, p. 4665–4684, 15 jul. 2004.

BERNSTEIN, H. D. Are bacterial “autotransporters” really transporters? **Trends in Microbiology**, v. 15, n. 10, p. 441–447, 2007.

BERNSTEIN, H. D. Looks can be deceiving: Recent insights into the mechanism of protein secretion by the autotransporter pathway. **Molecular Microbiology**, v. 97, n. 2, p. 205–215, 2015.

BEULING, E. E.; VAN DEN HEUVEL, J. C.; OTTENGRAF, S. P. P. Diffusion coefficients of metabolites in active biofilms. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 67, n. 1, p. 53–60, 5 jan. 2000.

BOLES, B. R.; THOENDEL, M.; SINGH, P. K. Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. **Mol Microbiol**, v. 57, n. 5, p. 1210–1223, 2005.

BOLETTI, F. T. Manufacture of vinegar. In: MARSHALL, C. E. (Ed.). . **Microbiology; a textbook on microorganisms general and applied**. 3rd. ed. [s.l.] Philadelphia,P. Blakiston's Son & Co.[c1921], 1921. p. 636–648.

BOMBERGER, J. et al. Federation proceedings. **The FASEB Journal**, v. 30, n. 1 Supplement, p. 1223.23-1223.23, 1 abr. 2016.

BRETT, P. J.; DESHAZER, D.; WOODS, D. E. *Burkholderia thailandensis* sp. nov., a *Burkholderia pseudomallei*-like species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, n. 3, p. 1–7, 1998.

BUCHAN, D. W. A. et al. Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. W1, p. W340–W348, 2013.

BURGER, M. M.; GLASER, L.; BURTON, R. M. Formation of rhamnolipids of *Pseudomonas aeruginosa*. **Methods in Enzymology**, v. 8, n. C, p. 441–445, 1966.

BURKHOLDER, W. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. **Phytopathology**, v. 40, p. 115–118, 1950.

CAO, B.; NAGARAJAN, K.; LOH, K. C. Biodegradation of aromatic compounds: Current status and opportunities for biomolecular approaches. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 2, p. 207–228, 2009.

CERI, H. et al. The MBEC assay system: Multiple equivalent biofilms for antibiotic and biocide susceptibility testing. **Methods in Enzymology**, v. 337, p. 377–385, 2001.

CHAN, W. et al. A recombineering based approach for high-throughput conditional knockout targeting vector construction. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 8, 2007.

CHEN, G.; ZHU, H. lux-Marked *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide production in the presence of rhamnolipid. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 41, n. 1, p. 43–48, 2005.

CHEN, I.-M. A. et al. IMG/M: integrated genome and metagenome comparative data analysis system. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D507–D516, 4 jan. 2017.

COOKSEY, K. E.; WIGGLESWORTH-COOKSEY, B. Adhesion of bacteria and diatoms to surfaces in the sea: A review **Aquatic Microbial Ecology**, 1995. Disponível em: <<http://www.int-res.com/abstracts/ame/v09/n1/p87-96/>>. Acesso em: 21 jun. 2017

COSTERTON, J. W. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318–1322, 1999.

COSTERTON, J. W.; GEESEY, G. G.; CHENG, K. How Bacteria Stick. **Scientific American**, v. 238, n. 1, p. 86–95, 1978.

CURRIE, B. J. Melioidosis: An important cause of pneumonia in residents of and travellers returned from endemic regions **European Respiratory Journal**, 2003. Disponível em: <<http://erj.ersjournals.com/content/erj/22/3/542.full.pdf>>. Acesso em: 22 jul. 2017

DATSENKO, K. A.; WANNER, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 12, p. 6640–5, 6 jun. 2000.

DATTA, S.; COSTANTINO, N.; COURT, D. L. A set of recombinering plasmids for gram-negative bacteria. **Gene**, v. 379, n. 1–2, p. 109–115, 1 set. 2006.

DAVEY, M. E.; CAIAZZA, N. C.; TOOLE, G. A O. Rhamnolipid Surfactant Production Affects Biofilm Architecture in. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 3, p. 1027–1036, 2003.

DAVIES, D. G. et al. The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm. **Science**, v. 280, n. 5361, p. 295–298, 10 abr. 1998.

DE BEER, D.; SRINIVASAN, R.; STEWART, P. S. Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 12, p. 4339–4344, dez. 1994.

DE KIEVIT, T. R.; IGLEWSKI, B. H. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships **Infection and Immunity American Society for Microbiology**, 1 set. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10948095>>. Acesso em: 22 jun. 2017

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 61, n. 1, p. 47–64, 1997.

DÉZIEL, E. et al. rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. **Microbiology**, v. 149, n. 8, p. 2005–2013, 2003.

DOBLER, L. Expressão e caracterização funcional da EstA de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 visando à otimização da produção de biossurfactantes do tipo raminolípido. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2014.

DOBLER, L. et al. Rhamnolipids in perspective: Gene regulatory pathways, metabolic engineering, production and technological forecasting. **New Biotechnology**, v. 33, n. 1, p. 123–135, 2016.

DONLAN, R. M. Biofilms and device-associated infections. **Emerging Infectious Diseases. Anais.** 2001 Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11294723>>. Acesso em: 21 jun. 2017

DONLAN, R. M. Biofilms: Microbial life on surfaces **Emerging Infectious Diseases**, set. 2002. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/8/9/02-0063_article.htm>. Acesso em: 21 jun. 2017

DUBEAU, D. et al. *Burkholderia thailandensis* harbors two identical rhl gene clusters responsible for the biosynthesis of rhamnolipids. **BMC**

microbiology, v. 9, n. 1, p. 263, 2009.

EBERL, L. et al. Involvement of N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behaviour of *Serratia liquefaciens*. **Molecular Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 127–136, 1996.

ELASRI, M. et al. Acyl-Homoserine Lactone Production Is More Common among Plant-Associated *Pseudomonas* spp. than among Soilborne *Pseudomonas* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 3, p. 1198–1209, 1 mar. 2001.

ESPINOSA-URGEL, M. Resident Parking Only: Rhamnolipids Maintain Fluid Channels in Biofilms. **Journal of bacteriology**, v. 185, n. 3, p. 699–700, 2003.

FECHTNER, J. et al. Limitation of biosurfactant strength produced by bacteria. In: C. R. UPTON (Ed.). . **Biosurfactants: Occurrences, Applications and Research**. New York: Nova Science Publishers, 2017.

FERREIRA, A. et al. Novel cosmetic formulations containing a biosurfactant from *Lactobacillus paracasei*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 155, p. 522–529, 2017.

FLEMMING, H.-C. et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 563–575, 2016.

FUJITA, K.; AKINO, T.; YOSHIOKA, H. Characteristics of heat-stable extracellular hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection and Immunity**, v. 56, n. 5, p. 1385–1387, 1988.

FUNSTON, S. J. et al. Characterising rhamnolipid production in *Burkholderia thailandensis* E264, a non-pathogenic producer. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 18, p. 7945–7956, 2016.

GBEJUADE, H. et al. Varying degrees of Biofilm inhibition by Gentamicin, Vancomycin and Daptomycin loaded acrylic loaded cement: an in vitro model of cement periprosthetic infection. **Orthopaedic Proceedings**, v.

98–B, n. SUPP 23, 2016.

GLASER, L. The Enzymatic Synthesis of a Rhamnose-containing Glycolipids by Extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. **The Journal of biological chemistry**, v. 238, n. 8, p. 2595–602, 1963.

GLOBALSECURITY.ORG. **Melioidosis- Biological Weapons**. Disponível em: <http://www.globalsecurity.org/wmd/intro/bio_melioidosis.htm>. Acesso em: 23 jul. 2017.

GROUNTA, A. et al. Biofilm formation on Conservolea natural black olives during single and combined inoculation with a functional *Lactobacillus pentosus* starter culture. **Food Microbiology**, v. 56, p. 35–44, jun. 2016.

HABA, E. et al. Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBI 40044. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 81, n. 3, p. 316–322, 2003.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 95–108, fev. 2004.

HARAGA, A. et al. *Burkholderia thailandensis* as a model system for the study of the virulence-associated type III secretion system of *Burkholderia pseudomallei*. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 11, p. 5402–5411, 2008a.

HENDERSON, I. R.; NATARO, J. P. Virulence functions of autotransporter proteins. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 3, p. 1231–1243, 2001.

HIRAMATSU, F. et al. Patterns of Expansion produced by a Structured Cell Population of *Serratia marcescens* in Response to Different Media. **Microbes Environment**, v. 20, n. 2, p. 120–125, 2005.

HOLDEN, M. T. G. et al. Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 39, p.

14240–5, 28 set. 2004.

ITOH, S.; SUZUKI, T. Agricultural and Biological Chemistry Effect of Rhamnolipids on Growth of *Pseudomonas aeruginosa* Mutant Deficient in n-Paraffin-utilizing Ability. **Agricultural and Biological ChemistryAgr. Biol. Chem**, v. 36, n. 12, p. 2233–2235, 1972.

JAEGER, K. E. et al. Bacterial lipases for biotechnological applications. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, v. 3, n. 1–4, p. 3–12, 1997.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396–403, 1998.

JASS, J.; WALKER, J. T. Biofilms and biofouling. In: J. T. WALKER, S. S. AND J. J. (Ed.). . **Industrial biofouling - detection, prevention and control**. New York, New York, USA: John Wiley & Sons, 2000. p. 1–12.

JOHNSON, M. K.; BOESE-MARRAZZO, D. Production and properties of heat-stable extracellular hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection and Immunity**, v. 29, n. 3, p. 1028–1033, 1980.

JONES, D. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. **Journal of Molecular Biology**, v. 292, p. 195–202, 1999.

JOY SAM, BUTALIA TANVI, SHARMA SHASHI, P. K. S. M. R. Biosurfactant Producing Bacteria from Hydrocarbon Contaminated Environment. In: HEIMANN, K.; KARTHIKEYAN, O.; MUTHU, S. (Eds.). . **Environmental Footprints and Eco-design of Products and Processes, Springer Singapore**. Singapore: Springer, 2017. p. 259–305.

JULKOWSKA, D. et al. Branched swarming patterns on a synthetic medium formed by wild-type *Bacillus subtilis* strain 3610: Detection of different cellular morphologies and constellations of cells as the complex architecture develops. **Microbiology**, v. 150, n. 6, p. 1839–1849, 2004.

KEARNS, D. B. A field guide to bacterial swarming motility. **Nature**

reviews. Microbiology, v. 8, n. 9, p. 634–44, 2010.

KEARNS, D. B.; LOSICK, R. Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 581–590, 2003.

KINSINGER, R. F.; KEARNS, D. B.; FALL, R. Genetic Requirements for Potassium Ion-Dependent Colony Spreading in. **Journal of bacteriology**, v. 187, n. 24, p. 8462–8469, 2005.

KLAUSER, T.; POHLNER, J.; MEYER, T. F. The secretion pathway of IgA protease-type proteins in gram-negative bacteria. **BioEssays**, v. 15, n. 12, p. 799–805, 1993.

KNOWLES, T. J. et al. Membrane proteins solubilized intact in lipid containing nanoparticles bounded by styrene maleic acid copolymer. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 22, p. 7484–7485, 2009.

KNOWLES, T. J. et al. Structure and function of BamE within the outer membrane and the β -barrel assembly machine. **EMBO reports**, v. 12, n. 2, p. 123–128, 2011.

KRISHNASWAMI, C. Morphia injectors' septicaemia. **Indian Med Gaz**, 1917.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, p. msw054, 2016.

LARKUM, A. W. D.; KOCH, E.-M. W.; KÜHL, M. Diffusive boundary layers and photosynthesis of the epilithic algal community of coral reefs. **Marine Biology**, v. 142, n. 6, p. 1073–1082, 2003.

LEELARASAMEE A, B. S. Melioidosis: review and update. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 11, p. 413–425, 1989.

LEVI, P. S. et al. Microbial community diversity and composition varies with habitat characteristics and biofilm function in macrophyte-rich streams. **Oikos**, v. 126, n. 3, p. 398–409, 1 mar. 2017.

LI, W. et al. The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. **Nucleic acids research**, v. 43, n. W1, p. W580-4, 1 jul. 2015.

LI, Y. et al. Natural Genetic Transformation of *Streptococcus mutans* Growing in Biofilms. **Society**, v. 183, n. 3, p. 897–908, 2001.

MAGNUSON, R.; SOLOMON, J. M.; GROSSMAN, A. D. Biochemical and genetic characterization of a competence pheromone from *B. subtilis*. **Cell**, v. 77, n. 2, p. 207–16, 1994.

MAJERCZYK, C. D. et al. Cross-species comparison of the *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia thailandensis*, and *Burkholderia mallei* quorum-sensing regulons. **Journal of Bacteriology**, v. 196, n. 22, p. 3862–3871, 2014.

MATSUYAMA, T.; BHASIN, A.; HARSHEY, R. M. Mutational analysis of flagellum-independent surface spreading of *Serratia marcescens* 274 on a low-agar medium. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 4, p. 987–991, 1995.

MATSUYAMA, T.; KANEDA, K.; NAKAGAWA, Y. A novel extracellular cyclic lipopeptide which promotes flagellum-dependent and -independent spreading growth of *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 6, p. 1769–1776, 1992.

MATSUYAMA, T.; NAKAGAWA, Y. Bacterial wetting agents working in colonization of bacteria on surface environments. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. Anais.** 1996 Disponível em: <<http://sci-hub.cc/http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0927776596013008>>. Acesso em: 22 jun. 2017

MCCLURE, C. D.; SCHILLER, N. L. Inhibition of macrophage phagocytosis by *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids in vitro and in vivo. **Current microbiology**, v. 33, n. 2, p. 109–117, 1996.

MOLLARET, H. H. L'affaire du jardin des plantesou comment la melioidose fit son apparition en France. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 18, n. SUPPL. 4, p. 643–654, 1988.

MURRAY, T. S.; KAZMIERCZAK, B. I. *Pseudomonas aeruginosa* exhibits sliding motility in the absence of type IV pili and flagella. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 8, p. 2700–2708, 2008.

NADELL, C. D.; XAVIER, J. B.; FOSTER, K. R. The sociobiology of biofilms **FEMS Microbiology Reviews** BioLine, , 1 jan. 2009. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2008.00150.x>>. Acesso em: 21 jun. 2017

NG, W. L. et al. Broad spectrum pro-quorum-sensing molecules as inhibitors of virulence in vibrios. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 6, 2012.

NICOLAY, T.; VANDERLEYDEN, J.; SPAEPEN, S. Autotransporter-based cell surface display in Gram-negative bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 109–123, 2015.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O.; CONTIERO, J. Rhamnolipid Surfactants: An Update on the General Aspects of These Remarkable Biomolecules. **Biotechnology Progress**, v. 21, n. 6, p. 1593–1600, 2 dez. 2005.

NOORDMAN, W. H.; JANSSEN, D. B. Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 9, p. 4502–4508, 2002.

OCHSNER, U. A.; REISER, J. Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 14, p. 6424–6428, 1995.

OKITA, W. B.; KIRWAN, D. J. Simulation of Secondary Metabolite Production By Immobilized Living Cells: Penicillin Production. **Biotechnology Progress**, v. 2, n. 2, p. 83–90, 1986.

OLVERA, C. et al. The *Pseudomonas aeruginosa* algC gene product participates in rhamnolipid biosynthesis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, n. 1, p. 85–90, out. 1999.

PACZKOWSKI, J. E. et al. Flavonoids Suppress *Pseudomonas aeruginosa* Virulence through Allosteric Inhibition of Quorum-sensing Receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 10, p. 4064–4076, 10 mar. 2017.

PEELE, K. A.; CH, V. R. T.; KODALI, V. P. Emulsifying activity of a biosurfactant produced by a marine bacterium. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 1–6, 2016.

PENG, R. H. et al. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, n. 6, p. 927–955, 2008.

PETERSEN, T. N. et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v. 8, n. 10, p. 785–786, 2011.

PIERSON, E. A. et al. Interpopulation Signaling via N -Acyl-Homoserine Lactones among Bacteria in the Wheat Rhizosphere. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 11, n. 11, p. 1078–1084, 19 nov. 1998.

POTVIN, E. et al. In vivo functional genomics of *Pseudomonas aeruginosa* for high-throughput screening of new virulence factors and antibacterial targets. **Environ Microbiol**, v. 5, n. 12, p. 1294–1308, 2003.

RAHIM, R. et al. Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlC gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. **Molecular Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 708–718, 2001.

RASHID, M. H.; KORNBERG, A. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 9, p. 4885–4890, 2000.

RAWLINGS, D. E. Heavy Metal Mining Using Microbes. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 65–91, 2002.

RAZA, Z. A. et al. Surface properties and sub-surface aggregate

assimilation of rhamnolipid surfactants in different aqueous systems. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 6, p. 811–816, 2010.

READ, R. C. et al. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on mucociliary transport and ciliary beating. **Journal of Applied Physiology**, v. 72, n. 6, p. 2271–2277, 1992.

REETZ, M. T. et al. Creation of Enantioselective Biocatalysts for Organic Chemistry by In Vitro Evolution. **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, v. 36, n. 24, p. 2830–2832, 1997.

REIS, R. S. et al. Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa* - A review. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 11, p. 6377–6384, 2011.

RODRIGUES, N. M. Avaliação do efeito da lavagem com surfactante na Biodegradação de um solo contaminado com óleo diesel. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 2011.

SAIER, M. H. et al. The Transporter Classification Database (TCDB): recent advances. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D372–D379, 4 jan. 2016.

SAIER, M. H.; TRAN, C. V; BARABOTE, R. D. TCDB: the Transporter Classification Database for membrane transport protein analyses and information. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 90001, p. D181–D186, 1 jan. 2006.

SAKURAI, A. et al. Simulation of citric acid production by rotating disk contactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 56, n. 6, p. 689–696, 1997.

SANTOS, A. S. et al. Evaluation of Different Carbon and Nitrogen Sources in Production of Rhamnolipids by a Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. In: **Biotechnology for Fuels and Chemicals**. Totowa, NJ: Humana Press, 2002. p. 1025–1035.

SCHRAMM, A. et al. On the occurrence of anoxic microniches,

denitrification, and sulfate reduction in aerated activated sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 9, p. 4189–4196, 1999.

SCHULTZ, M. P.; SWAIN, G. W. The influence of biofilms on skin friction drag. **Biofouling**, v. 15, n. 1–3, p. 129–139, 10 maio 2000.

SENESI, S. et al. Swarming motility in *Bacillus cereus* and characterization of a fliY mutant impaired in swarm cell differentiation. **Microbiology**, v. 148, n. 6, p. 1785–1794, 2002.

SHIMADA, H. et al. Dependence of local cell density on concentric ring colony formation by bacterial species *Bacillus subtilis*. **Journal of the Physical Society of Japan**, v. 73, n. 4, p. 1082–1089, 2004.

SIEVERS, F. et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular systems biology**, v. 7, n. 1, p. 539, 11 out. 2011.

SIMÕES, M.; PEREIRA, M. O.; VIEIRA, M. J. Monitoring the effects of biocide treatment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms formed under different flow regimes. **Water Science and Technology. Anais...2003** Disponível em: <<http://wst.iwaponline.com/content/47/5/217>>. Acesso em: 21 jun. 2017

SMITH, M. D. et al. Arabinose assimilation defines a nonvirulent biotype of *Burkholderia pseudomallei*. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 10, p. 4319–4321, 1997.

STEIDLE, A. et al. Visualization of N -Acylhomoserine Lactone-Mediated Cell-Cell Communication between Bacteria Colonizing the Tomato Rhizosphere
Visualization of N -Acylhomoserine Lactone-Mediated Cell-Cell Communication between Bacteria Colonizing the Tomato Rhizosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 12, p. 5761–5770, 2001.

STEPANOVIC, S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of microbiological methods**, v. 40, n. 2, p. 175–9, abr. 2000.

STEWART, P. S. Diffusion in biofilms **Journal of Bacteriology**American Society for Microbiology, , 1 mar. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12591863>>. Acesso em: 21 jun. 2017

STICKLER, D. J. et al. Biofilms on Indwelling Urethral Catheters Produce Quorum-Sensing Signal Molecules In Situ and In Vitro. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 9, p. 3486–3490, 1998.

STOODLEY, P. et al. Structural deformation of bacterial biofilms caused by short-term fluctuations in fluid shear: An in situ investigation of biofilm rheology. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 65, n. 1, p. 83–92, 1999.

STOODLEY, P.; LEWANDOWSKI, Z.; DEBEER, D. Liquid Flow in Biofilm Systems Liquid Flow in Biofilm Systems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 8, p. 2711–2716, 1994.

TATUSOVA, T. A.; MADDEN, T. L. BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. **FEMS Microbiology Letters**, v. 174, n. 2, p. 247–250, 1 maio 1999.

TAVARES, L. F. D. et al. Characterization of rhamnolipids produced by wild-type and engineered *Burkholderia kururiensis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 5, p. 1909–1921, 2013.

TIJHUIS, L.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; HEIJNEN, J. J. Formation and growth of heterotrophic aerobic biofilms on small suspended Airlift reactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, n. 5, p. 595–608, 1994.

TORIBIO, J.; ESCALANTE, A. E.; SOBERÓN-CHÁVEZ, G. Rhamnolipids: Production in bacteria other than *Pseudomonas aeruginosa*. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, n. 10, p. 1082–1087, 2010.

VAN DEN BERG, B. Crystal Structure of a Full-Length Autotransporter. **Journal of Molecular Biology**, v. 396, n. 3, p. 627–633, 2010.

VAN KESSEL, J. C. et al. Quorum Sensing Regulates the Osmotic

Stress Response in *Vibrio harveyi*. **Journal of Bacteriology**, v. 197, n. 1, p. 73–80, 2015.

VAN ULSEN, P. et al. Type V secretion: From biogenesis to biotechnology. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 8, p. 1592–1611, 2014.

WALKER, J. T. et al. Control of *Legionella pneumophila* in a hospital water system by chlorine dioxide. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 384–390, 1995.

WANG, X. et al. Algicidal activity of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Harmful Algae**, v. 4, n. 2, p. 433–443, 2005.

WATNICK, P. I.; KOLTER, R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. **Molecular Microbiology**, v. 34, n. 3, p. 586–595, nov. 1999.

WATNICK, P.; KOLTER, R. Biofilm , *City of Microbes*. v. 182, n. 10, p. 2675–2679, 2000.

WEST, S. E. et al. Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. **Gene**, v. 148, n. 1, p. 81–6, 11 out. 1994.

WILHELM, S. et al. A Novel Lipolytic Enzyme Located in the Outer Membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 22, p. 6977–6986, 1999.

WILHELM, S. et al. The autotransporter esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* is required for rhamnolipid production, cell motility, and biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 18, p. 6695–6703, 2007.

XAVIER, J. B. et al. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. **Boletim de Biotecnologia**, v. 76, n. November, p. 2–13, 2003.

XIE, H. et al. Intergeneric communication in dental plaque biofilms.

Journal of Bacteriology, v. 182, n. 24, p. 7067–7069, 2000.

YABUUCHI, E. et al. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. **Microbiology and immunology**, v. 36, n. 12, p. 1251–75, 1992.

YONG, Y. C. et al. Engineering quorum sensing signaling of *Pseudomonas* for enhanced wastewater treatment and electricity harvest: A review. **Chemosphere**, v. 140, p. 18–25, 2015.

YU, Y. et al. Genomic patterns of pathogen evolution revealed by comparison of *Burkholderia pseudomallei*, the causative agent of melioidosis, to avirulent *Burkholderia thailandensis*. **BMC microbiology**, v. 6, p. 46, 2006.

ZHANG, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. 40, 2008.

ZHANG, Y.; MILLER, R. M. Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 6, p. 2101–2106, 1994.

ZHANG, Y.; SKOLNICK, J. Scoring function for automated assessment of protein structure template quality. **Proteins**, v. 57, p. 702–710, 2004.

ZHU, K.; ROCK, C. O. RhIA converts beta-hydroxyacyl-acyl carrier protein intermediates in fatty acid synthesis to the beta-hydroxydecanoyl-beta-hydroxydecanoate component of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 9, p. 3147–3154, 2008.