

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

ANA LAURA BOECHAT BORGES

**Caracterização da superexpressão do fator sigma ECF σ^x
em *Pseudomonas aeruginosa* PA14**

**Versão corrigida da tese conforme resolução CoPGr5890
A original encontra-se disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
02/05/2013

ANA LAURA BOECHAT BORGES

**Caracterização da superexpressão do fator sigma ECF σ^x em
Pseudomonas aeruginosa PA14**

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)*

Orientadora: Prof^a Dr^a Regina Lúcia Baldini

São Paulo
2013

Ana Laura Boechat Borges

Caracterização da superexpressão do fator sigma ECF σ^x em *Pseudomonas aeruginosa* PA14

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)*

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

*À minha mãe, que me ensinou a acreditar em mim e nas
pessoas ao meu redor. Ao meu marido e à minha filha,
minha nova família formada no curso deste doutorado,
pelo exercício constante de paciência e amor.*

AGRADECIMENTOS

À CAPES e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.

Ao Laboratório de Espectrometria de Massa, no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), CNPEN, Campinas, SP, pela identificação das proteínas por HPLC-MS/MS.

À Prof^a. Dr^a. Regina Baldini, pela orientação, sempre com paciência e total dedicação. Também agradeço por servir como exemplo de amor ao que faz.

À Dr^a. Suely Lopes Gomes pelo apoio e disponibilidade do espaço físico e de materiais necessários para este trabalho.

Ao professor Dr. Mário José Politi, pelo auxílio com os ensaios de anisotropia.

Aos Doutores Éric Déziel e François Lépine, do Institut Armand-Frappier, Laval, Canadá, pelas ricas discussões e sugestões.

Aos docentes que participaram da minha banca de qualificação, Dr^a. Ana Maria Carmona Ribeiro, Dr^a. Deborah Schechtman e Dr. Eduardo Moraes Rego Reis, pelas sugestões.

A todos os professores que, com aulas, discussões informais e acesso a equipamentos e reagentes, contribuíram para a realização deste trabalho e para a minha formação acadêmica, em especial, Dr^a. Marilis do Valle Marques.

Aos amigos que passaram pelo laboratório de Regulação da Expressão Gênica em Microrganismos, Eliezer, Patrícia, André, Anne, César, Christian, Karina, Raphaela e Rogério, pela ajuda, sugestões e ótimos momentos de descontração. Em especial ao Diogo, pela verdadeira amizade e companheirismo sempre!

Aos amigos do grupo da professora Regina e da professora Suely, Ana Paula, Duilio, Gabriela, Gianluca, Gilberto, Juliana e Thays, pela ajuda sempre com boa vontade,

discussões e certeza de um bom ambiente de trabalho. Ainda a Gilberto Hideo Kaihama, por realizar os ensaios de anisotropia.

À amiga Sandra Mara pelas deliciosas conversas, paciência e dedicação ao trabalho de base.

A Doris e Ivanilde pela competência no trabalho de base.

A Luci Deise Navarro pela eficiência no serviço de seqüenciamento e prontidão em ajudar sempre.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação pela atenção e ajuda sempre que necessário.

Aos demais amigos e conhecidos do departamento de Bioquímica. Em especial a Nathália pelo companheirismo e apoio nas horas mais diversas.

Às velhas amigadas que resistiram ao tempo e à distância, pela certeza da presença constante; aos amigos mais queridos da época da faculdade e ao “Clube da Lulu”, pela tradução mais fiel da amizade. Aos novos amigos, que vão surgindo a cada novo ciclo da minha vida.

À minha mãe, Ana Carolina, sempre ao meu lado, com sua força, alegria, incentivo e amor.

Ao meu padrasto, Affonso, e à sua família: D. Aldina, Cristina, Cristiano e Aparecida por acreditarem em mim e pelo interesse constante em meus estudos.

Aos meus padrinhos Isaac, Carolina e Maria Amélia, tios – Atalíbia, Marciano, Edith, Gagaça, Cyrillo e Dionéia – e primos que souberam me dar apoio e bons momentos de descontração mesmo com toda a distância física.

Aos meus sogros Vanda Maria e Edvaldo e à minha cunhada Everlyn por todo apoio sempre que necessário nos cuidados com a minha filha, para que eu pudesse me dedicar a essa tese.

Ao querido Everton, pela companhia, compreensão e amor.

Por fim, a Deus, que está sempre comigo.

RESUMO

Boechat Borges, A.L. **Caracterização da superexpressão do fator sigma ECF σ^x em *Pseudomonas aeruginosa* PA14.** 2013. 100 p. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Pseudomonas aeruginosa é uma proteobactéria do grupo gama muito versátil, capaz de colonizar ambientes variados e infectar hospedeiros filogeneticamente distintos, incluindo humanos imunocomprometidos. Os fatores sigma de função extracitoplasmática (ECF) são membros de sistemas de sinalização de superfície celular (CSS), abundantes em *P. aeruginosa*. Vinte genes codificando fatores sigma ECF estão presentes nos genomas sequenciados de *P. aeruginosa*, a maioria fazendo parte de sistemas TonB relacionados à captação de ferro. Neste trabalho, seis fatores sigma pobremente caracterizados foram superexpressos na linhagem PA14 a partir de um promotor induzível por arabinose para investigar seu papel na expressão dos sistemas de dois componentes PvrSR e RcsCB, que atuam na regulação da fímbria CupD, além de sua influência no crescimento de culturas de *P. aeruginosa*. Não foi observado efeito positivo de nenhum dos fatores sigma testados na expressão dos sistemas de dois componentes e a superexpressão de cinco deles tampouco levou a qualquer alteração no crescimento, porém a produção de piocianina foi alterada na superexpressão de PA14_55550 e a superexpressão de PA14_26600 e PA14_46810 levou a um discreto aumento no início da formação de biofilme em PA14. Por outro lado, culturas superexpressando σ^x (ALB04) apresentaram um perfil alterado de lipopolissacarídeo e uma curva de crescimento bifásica, alcançando precocemente uma fase estacionária seguida de uma recuperação do crescimento até uma segunda fase estacionária. Durante a primeira fase estacionária, a maior parte das células aumenta de tamanho e morre, mas as células remanescentes retornam à morfologia selvagem e seguem para a segunda fase de crescimento

exponencial. Isso não acontece devido a mutações compensatórias, uma vez que células coletadas de pontos tardios da curva e diluídas em meio novo repetem este comportamento. Apesar de trabalhos com a linhagem PAO1 associarem σ^x à transcrição de *oprF*, que codifica a principal porina não específica de *Pseudomonas*, nas condições dos nossos ensaios em PA14 a expressão dessa porina não foi induzida pela superexpressão de σ^x . Assim, os efeitos observados nessa superexpressão também não podem ser atribuídos a OprF. A transcrição de *oprF* em PA14 mostrou-se majoritariamente dependente da região promotora a que se atribui a ligação de σ^{70} , ao contrário dos relatos na literatura da dependência da região de ligação a σ^x . Análises proteômicas foram realizadas para investigar os elementos envolvidos nesses efeitos de superexpressão de σ^x , o que revelou a indução de diversas enzimas envolvidas na via de biossíntese de ácidos graxos. As células superexpressando σ^x apresentam uma maior proporção de ácidos hexadecanoico (C16) e hexadecenoico (C16:1) e dados de anisotropia mostram uma maior fluidez da(s) membrana(s). Este trabalho é o primeiro relato de um fator sigma ECF envolvido em biossíntese de lipídeos em *P. aeruginosa*.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*, fatores sigma ECF, biossíntese de lipídeos, fluidez de membrana

ABSTRACT

Boechat Borges, A.L. **Characterization of the ECF sigma factor σ^x overexpression in *Pseudomonas aeruginosa* PA14.** 2013. 100 p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Pseudomonas aeruginosa is a very versatile gammaproteobacteria, able to colonize different environments and to infect phylogenetically distinct hosts, including immunocompromised humans. The extracytoplasmic function sigma factors (ECFs) are members of cell signaling systems (CSS), abundant in *P. aeruginosa*. Twenty genes coding for ECF sigma factors are present in the sequenced genomes of *P. aeruginosa*, most of them being part of TonB systems related to iron uptake. In this work, six poorly characterized sigma factors were overexpressed in strain PA14 from an arabinose inducible promoter to investigate their role in the expression of the two-component systems PvrSR and RcsCB, which regulates CupD fimbria, and their influence in *P. aeruginosa* cultures growth. None of the tested sigma factors led to two-component systems upregulation and overexpression of five of them caused no change in the growth profile, but pyocyanin production was altered in PA14_55550 overexpression and PA14_26600 and PA14_46810 overexpression led to a slight increase in biofilm initiation in PA14. By the other side, cultures overexpressing σ^x (ALB04) presented an altered lipopolysaccharide profile and a biphasic growth curve, reaching an early stationary phase followed by a growth resuming until a second stationary phase. During the early stationary phase, most cells swells and dies, but the remaining cells return to wild type morphology and proceed to the second exponential phase of growth. This is not due to compensatory mutations, since cells collected from late points of the curve and diluted in fresh medium repeat this behavior. Although studies with strain PAO1 associate σ^x with transcription of *oprF*, encoding the major nonspecific porin of *Pseudomonas*, under our experiments

conditions with PA14, this porin expression is not induced by σ^x overexpression. Thus, the effects observed in this overexpression cannot be attributed to OprF. Transcription of *oprF* in PA14 proved to be mainly controlled by the σ^{70} -dependent promoter region, instead of the σ^x -dependent promoter region reported in the literature. Proteomic analyses were performed to investigate the elements involved in these effects of σ^x overexpression, which revealed the induction of several enzymes involved in fatty acids biosynthesis. Cells overexpressing σ^x exhibit a greater proportion of hexadecanoic (C16) and hexadecenoic (C16: 1) acids and anisotropy data show higher fluidity of the membrane (s). This work is the first report of an ECF sigma factor involved in lipid biosynthesis in *P. aeruginosa*.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, ECF sigma factors, lipid biosynthesis, membrane fluidity

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

