

COSME MARCOS MIRANDA MACIEL

**INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DO REPRESSOR FUR NA
REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES QUE CODIFICAM
FÍMBRIAS EM *Klebsiella pneumoniae***

**Bragança Paulista
2012**

COSME MARCOS MIRANDA MACIEL

**INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DO REPRESSOR FUR NA
REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES QUE CODIFICAM
FÍMBRIAS EM *Klebsiella pneumoniae***

Orientador

Prof. Dr. Lúcio Fábio Caldas Ferraz

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

**Bragança Paulista
2012**

QW 138.5.K5
M138i

Maciel, Cosme Marcos Miranda.

Investigação do papel do repressor Fur na regulação da expressão de genes que codificam fímbrias em *Klebsiella pneumoniae* / Cosme Marcos Miranda Maciel. -- Bragança Paulista, 2012.
54 p.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.

Orientação de: Lúcio Fábio Caldas Ferraz.

1. *Klebsiella pneumoniae*. 2. Regulador Fur.
3. Fímbrias adesivas. I. Ferraz, Lúcio Fábio Caldas.
II. Título.

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Orientador: Prof. Dr. Lúcio Fábio Caldas Ferraz.

Membros Titulares:

1. Prof. Dr. Lúcio Fábio Caldas Ferraz (orientador).
2. Profa. Dra. Daniela Alves Ribeiro.
3. Profa. Dra. Denise Gonçalves Priolli.

Membros Suplentes:

1. Profa. Dra. Nátalia Reiko Miyasaka.
2. Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro.

**Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da
Universidade São Francisco, campus Bragança Paulista.**

Data: 27/07/2012.



MACIEL, Cosme Marcos Miranda Maciel, “Identificação do papel do repressor Fur na regulação da expressão de genes que codificam fímbrias em *Klebsiella pneumoniae*”. Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em vinte e sete de Julho de 2012 pela Banca examinadora constituída pelos professores:

Professor Doutor Lúcio Fábio Caldas Ferraz
Universidade São Francisco

Professora Doutora Daniela Alves Ribeiro
Universidade Estadual de Campinas

Professora Doutora Denise Gonçalves Priolli
Universidade São Francisco

Campus Bragança Paulista
Campus Campinas - Unidade Cambuí
Campus Campinas - Unidade Swift
Campus Itatiba
Campus São Paulo

Av. São Francisco de Assis, 218 - Jd. São José - CEP 12916-900 / Tel.: 11 2454.8000 / Fax: 4034.1825
R. Cel. Silva Teles, 700 prédio C - Cambuí - CEP 13024-001 / Tel.: 19 3779.3370
R. Waldemar César da Silveira, 105 - Swift - CEP 13045-510 / Tel.: 19 3779.3300 / Fax: 3779.3321
R. Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - Centro - CEP 13251-900 / Tel.: 11 4534.8000 / Fax: 4534.8015
R. Antonieta Leitão, 129 - Freguesia do Ó - CEP 02925-160 / Tel.: 11 3411.2950 / Fax: 3411.2978

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho, a minha esposa e grande companheira, Dr^a Maria Cleuza Maciel, que me incentivou e me apoiou em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

- Ao estimado orientador Prof. Dr. Lúcio Fabio Caldas Ferraz, pelo incentivo e por estar disponível para dirimir dúvidas e apontar o caminho.
- Aos Professores Doutores: Flávio Paraguassú Braga, Luís Fernando Bouzas, Zílton Meira Vasconcelos e João Roberto Fernandes, pelo incentivo.
- Aos amigos e mestrandos: Leo, Walter, Ana Érica, Caio, Laércio, Rodrigo, Lúcio, Fabiano, Tércia e André (BSCUP).
- À Universidade São Francisco e aos professores do mestrado, obrigado pelo carinho e dedicação.
- À Vilma Tescke e à Rita da secretaria de pós-graduação.
- Agradecimento especial aos professores que compuseram as bancas.
- A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa no qual este trabalho esteve vinculado.
- As filhas e genros: Mayanny e Fernando, Dannyella e Marcelo, Luciana e Rafael e Fernanda, por tudo que representam.
- À minha mãe Maria da Conceição Miranda Maciel, que após nove filhos, continua guerreira e capaz.
- Ao meu pai (*in memoriam*), natural de Cruzília – MG, que trabalhou em duas jornadas durante toda a vida para que nada faltasse para a família.
- Aos meus irmãos e sobrinhos, que Deus abençoe a todos.
- Aos meus tios e primos, que Deus abençoe a todos.
- Aos meus avós Antonio e Benedita, eternas saudades.
- Ao meu sogro Antonio Gomes (Caraípe), pela alegria e amizade.
- Aos amigos: Bené, Raquel, Nalva, Jorginho, Dada, Julia e Dr. Neves, pela amizade.
- Ao Tuninho e Filhinha (*in memoriam*), pela alegria de nos receber a beira do fogão a lenha com um frango caipira e pelas belas prosas.
- Às Estâncias Curva da Onça e Ouro Branco, pelos encantos e momentos aprazíveis.

EPIGRAFE

“Uma geração vai, e outra geração vem;
mas a terra para sempre permanece.”

Eclesiastes 1:4.

RESUMO

Klebsiella pneumoniae é um patógeno oportunista Gram-negativo que causa uma variedade de infecções, tais como pneumonia, meningite, septicemia, entre outras. Um importante passo no processo infeccioso por *K. pneumoniae* é a aderência na superfície mucosa do hospedeiro por meio da expressão de fímbrias adesivas. *K. pneumoniae* codifica dois tipos diferentes de fímbrias, tipo 1 e tipo 3, cada qual desempenhando um papel crucial nos processos de infecção e colonização. Em bactérias patogênicas o ferro desempenha um importante papel na regulação da expressão de inúmeros genes de virulência. Esta regulação é intermediada pelo regulador transcricional Fur, que forma um complexo com o íon ferroso e este complexo se liga a sequências específicas, chamadas boxes Fur, localizadas na região promotora dos genes alvos, levando à repressão ou indução da transcrição destes genes. Poucos trabalhos com *K. pneumoniae* têm demonstrado o papel do ferro, sobretudo do repressor Fur, na regulação da expressão de genes fimbriais. Neste trabalho foram identificados, por análises de bioinformática, prováveis boxes Fur na região promotora do operon *mrk*, que codifica fímbrias do tipo 3, e do gene *fimE*, que codifica uma recombinase que controla a expressão de fímbrias do tipo 1 pelo mecanismo de variação de fases. Os prováveis boxes Fur foram validados pelo ensaio FURTA, sugerindo que a expressão do gene *fimE* e do operon *mrk* é modulada pelo regulador Fur. Os genes *fimE* e *mrkA* tiveram o padrão de expressão investigado nas condições repleta e de privação de ferro. A indução da expressão dos genes *fimE* e *mrkA* na presença de ferro parece indicar que o regulador Fur atua como um ativador da expressão desses genes. Além disso, a expressão de fímbrias tipo 1 pelo mecanismo de variação de fases é modulada pelo ferro por intermédio do regulador Fur. Os resultados indicam que em *Klebsiella pneumoniae* a escassez de ferro é uma condição estressante que induz a síntese de fímbrias do tipo 1.

Palavras-chave: *Klebsiella pneumoniae*; Fímbrias adesivas; Regulador Fur.

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae is a Gram-negative opportunistic pathogen that causes a variety of infections such as pneumonia, meningitis, septicemia, among others. An essential step during infection by *K. pneumoniae* is the adhesion of the bacteria to mucosal surfaces of the host, which is mediated by the expression of adhesive fimbriae on the surface of the bacterial cell. *K. pneumoniae* expresses two different types of fimbrial adhesins, type 1 and type 3, each one playing a crucial role during the infection and colonization processes. In pathogenic bacteria iron plays an important role on the expression regulation of many virulence genes, and this regulation is mediated by the transcriptional regulator Fur. Fur forms a complex with the ferrous ion and this complex binds to specific sequences, called Fur boxes, located on the promoter region of target genes leading to the transcriptional induction or repression of these genes. Few studies with *K. pneumoniae* have demonstrated the role of the iron and Fur on the expression regulation of fimbrial genes. In this work bioinformatic analysis revealed putative Fur boxes on the promoter region of the *mrk* operon, which encodes fimbriae type 3, and the *fimE* gene, which encodes a recombinase that controls the expression of type 1 fimbriae by the mechanism of phase variation. These Fur boxes were validated by FURTA, suggesting that the expression of *fimE* and the *mrk* operon are modulated by the Fur regulator. The expression pattern of *fimE* and *mrkA* genes was investigated under iron-replete and iron-restricted conditions. The up-regulation of *fimE* and *mrkA* genes in the presence of iron seems to indicate that the Fur regulator functions as an activator of the expression of these genes. Furthermore, the expression of type 1 fimbriae by phase variation is modulated by iron through the Fur regulator. These results indicate that in *Klebsiella pneumoniae* iron starvation is a stressful condition which induces the synthesis of type 1 fimbriae.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*; Fimbrial adhesins; Fur regulator.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Curva de crescimento de *Klebsiella pneumoniae* em meio de cultura LB e em meio LB contendo ferro e 2,2'-dipiridil..... Página 28.
- Figura 2.** Clusters gênicos da via de síntese de fímbrias tipo 1 e 3 em *Klebsiella pneumoniae* Página 33.
- Figura 3.** Validação dos boxes Fur nos genes *fimE* e *mrkA* pelo ensaio FURTA..... Página 34.
- Figura 4.** Representação esquemática do elemento *fimS* na região intergênica entre *fimE* e *fimA*..... Página 35.
- Figura 5.** Gel de agarose 1,5% mostrando o elemento *fimS* amplificado por PCR a partir de células de *K. pneumoniae* cultivada por 24 e 96 horas em meio LB líquido e sólido..... Página 36.
- Figura 6.** Gel de agarose 1,5% mostrando os fragmentos gerados após digestão do elemento *fimS* amplificado de *K. pneumoniae* cultivada por 24 e 96 horas em meio LB líquido..... Página 36.
- Figura 7.** Gel agarose 1,5% mostrando os fragmentos gerados após digestão do elemento *fimS* amplificado de *K. pneumoniae* cultivada por 24 e 96 horas em meio LB sólido..... Página 37.
- Figura 8.** Padrão de expressão dos genes *fimE*, *fimA* e *mrkA* nas condições repleta e em privação de ferro..... Página 39.
- Figura 9.** Representação esquemática e transcrição policistrônica dos genes que compõe o operon *mrk*..... Página 43.
- Figura 10.** Representação esquemática e transcrição policistrônica dos genes que compõe o operon *fim*..... Página 44.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Par de *primers* utilizado para amplificação por PCR do elemento *fimS* por PCR..... Página 26.
- Tabela 2.** Sequência nucleotídica dos *primers* utilizados nas reações de PCR em tempo real..... Página 30.
- Tabela 3.** Sequência nucleotídica dos *primers* utilizados nas análises da transcrição policistrônica dos genes dos operons *fim* e *mrk*..... Página 32.
- Tabela 4.** Prováveis boxes Fur encontrados na região promotora dos genes *fimE* e *mrkA*..... Página 33.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

C_T	do inglês <i>threshold cycle</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
DNase	do inglês <i>deoxyribonuclease</i>
dNTPs	do inglês <i>deoxyribonucleotide triphosphates</i>
DTT	Ditiotreitol
EDTA	do inglês <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>
FUR	do inglês <i>ferric uptake regulator</i>
FURTA	do inglês <i>Fur Titration Assay</i>
LB	Luria-Bertani, meio de cultura bacteriano
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino] propanossulfônico
PCR	do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	do inglês <i>ribonucleic acid</i>
RNase	do inglês <i>ribonuclease</i>
R.P.M	Rotações por minuto
TBE	Tris-Borato-EDTA
UDG	do inglês <i>uracil-DNA glycosylase</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15.
1.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	15.
1.2 Captação de ferro e fatores de virulência influenciados por ferro	16.
1.3 Fímbrias tipo 1 e tipo 3 em <i>Klebsiella pneumoniae</i>	18.
1.4 Variação de fases de antígenos flagelares.....	20.
2. OBJETIVOS.....	24.
2.1 Objetivo geral.....	24.
2.2 Objetivos específicos.....	24.
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25.
3.1 Condições de cultivo de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	25.
3.2 Identificação de boxes Fur e validação pelo ensaio FURTA.....	25.
3.3 Variação de fase em células de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	26.
3.3.1 Extração de DNA genômico e amplificação do elemento <i>fimS</i>	26.
3.3.2 Digestão do elemento <i>fimS</i> com a enzima <i>HinfI</i>	27.
3.4 Caracterização da expressão gênica por PCR em tempo real.....	27.
3.4.1 Extração de RNA total e síntese de cDNA.....	27.
3.4.2 PCR em tempo real.....	29.

3.5	Análise da transcrição policistrônica dos genes dos operons <i>fim</i> e <i>mrk</i>	31.
3.6	Técnicas básicas de biologia molecular.....	32.
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33.
4.1	Identificação de prováveis boxes Fur.....	33.
4.2	Validação dos boxes Fur pelo ensaio FURTA.....	34.
4.3	Avaliação da variação de fase do elemento <i>fimS</i> no operon <i>fim</i>	35.
4.4	Caracterização do padrão de expressão dos genes fímbriais.....	39.
4.5	Unidade transcricional dos genes que compõe os operons <i>fim</i> e <i>mrk</i>	42.
5.	CONCLUSÕES	45.
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46.

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae é um patógeno oportunista responsável por infecções dos tratores gastrointestinal, respiratório e genitourinário (PODSCHUN e ULLMANN, 1998) em idosos ou pacientes imunodeprimidos em ambientes hospitalares (WILLIAM e TOMAS, 1990). *K. pneumoniae* é uma bactéria Gram-negativa pertencente à família *Enterobacteriaceae* (FARMER e BALOWS, 1991). Pesquisa realizada por Escobar e colegas (1996) mostrou que a maioria das crianças portadoras de patologias associadas a *K. pneumoniae* eram maiores de 2 anos de idade. Dentre os casos analisados, 94% estavam contaminadas pela via respiratória e/ou intestinal, e das crianças em fase de recuperação, 67,9% apresentava quadro clínico de desnutrição, sendo 57% já internadas nos últimos 30 dias.

Colonizações no trato gastrointestinal são casos comuns de infecções epidemiológicas (STRUVE et al., 2009). Em Taiwan, *K. pneumoniae* se sobrepõe aos casos diagnosticados em pacientes com insuficiência hepática (PODSCHUN e ULLMANN, 1998). No entanto, casos de infecções com *K. pneumoniae* em indivíduos saudáveis tem sido freqüentes no sudeste da Ásia (KEYNAN e RUBINSTEIN, 2007), e aproximadamente 5% são infecções no trato intestinal (JOHNSON et al., 1993). Relatos no Brasil, entre 1997 e 1998, revelaram que *K. pneumoniae* foi o quarto patógeno mais frequente em neonatos (PESSOA-SILVA et al., 2004). Em Israel, infecção por *K. pneumoniae* é mais freqüente em isolados de ambiente hospitalar (LEVI et al., 1996).

Além de ser encontrada em diversos locais do organismo humano, *K. pneumoniae* também é encontrada no meio ambiente. A capacidade de resistência e adaptação ao meio envolve importantes fatores de virulência (MATATOV et al., 1999). Dentre os fatores observados em *K. pneumoniae* destacam-se a formação do envoltório polissacarídico, que encapsula a superfície da bactéria protegendo-a da fagocitose, a captação de ferro durante o desenvolvimento da infecção e a capacidade de adesão às

superfícies dos tecidos do hospedeiro (PODSCHUN e ULLMANN, 1998; STRUVE et al., 2003; LAWLOR et al., 2005 e 2007).

Uma adesão bem sucedida pode acarretar em colonização dos tecidos e até invasão celular, com multiplicação e disseminação para outros tecidos (PIZARRO-CERDÁ e COSSART, 2006). A adesão é feita por estruturas filamentosas denominadas fímbrias que estão presentes na superfície bacteriana, sendo expressas pela maioria das Gram-negativas (HORNICK et al., 1992). As fímbrias tipo 1 e tipo 3 tem se revelados como sendo de grande importância na patogenicidade bacteriana (STRUVE et al., 2008). As fímbrias tipo 1 são encontradas em quase todas as espécies de *Enterobacteriaceae* (KLEMM e SCHEMBRI, 2000). A maioria das linhagens de *K. pneumoniae* apresenta genes responsáveis pela expressão desses dois tipos de fímbrias (PODSCHUN e ULLMANN, 1998), o que proporciona à bactéria uma virulência bastante significativa (DI MARTINO et al., 2003; JAGNOW e CLEGG, 2003).

1.2 Captação de ferro e fatores de virulência influenciados por ferro

Sendo um importante micronutriente para a homeostase bacteriana, a regulação do nível de ferro no metabolismo celular é de suma importância, pois altos níveis desse metal no meio intracelular podem causar estresse oxidativo para as células e danos celulares (ESCOLAR et al., 1999). Para não comprometer as necessidades básicas, a bactéria tem desenvolvido mecanismos homeostáticos para manter níveis suficientes de ferro (BENITE et al., 2002). Em privação de ferro, as bactérias produzem e excretam moléculas de baixo peso molecular, os sideróforos, que são responsáveis pela captação de íons férricos (Fe^{3+}) (ESCOLAR et al., 1999). Ao se ligarem ao Fe^{3+} , os sideróforos se direcionam a receptores específicos na membrana da bactéria, penetram no citoplasma e se dissociam do Fe^{3+} , que sofre redução de íon (CLARKE et al., 2001).

A homeostase do ferro intracelular envolve a regulação da transcrição de genes de acordo com os níveis de ferro presentes no hospedeiro, e esta regulação é mediada pelo repressor Fur (do inglês, *Ferric uptake regulator*). Fur é um regulador universal envolvido em diversos processos celulares, com a função de reprimir genes específicos

quando se liga a sequências regulatórias, os boxes Fur, localizadas em regiões promotoras de genes alvos (ESCOLAR et al., 1999). Em ambientes ricos em ferro a proteína se liga ao ferro, e esse complexo se direciona ao box Fur e modula o acesso da RNA polimerase à região promotora dos genes alvos, levando à repressão ou inibição induzida da transcrição desses genes (STOJILJKOVIC et al., 1994; ESCOLAR et al., 1999; DELANY et al., 2004). Assim, esse metal torna-se um importante elemento de regulação de diversos fatores de virulência, favorecendo a infecção e colonização das células do hospedeiro. Entre esses fatores estão a expressão de genes de virulência, proteases, sistema de assimilação de ferro e formação de biofilme mediado por *quorum sensing* (LITWIN et al., 1993).

Conforme O'Toole e colaboradores (2000), biofilme é uma cápsula de polissacarídeos que envolve populações de células organizadas em comunidades, compostas por uma ou diversas espécies bacterianas que habita diversos ambientes. Essa capa protetora é uma forma de resistência a diversos agentes antimicrobianos, e, além disso, favorece a troca, por conjugação, de plasmídios de virulência entre os patógenos (MAH et al., 2001). A formação de biofilme, sob níveis suficientes de ferro, segue um roteiro básico que envolve a adesão das bactérias nas células e a formação de microcolônias (BANIN et al., 2005). O'Toole e Kolter (1998) demonstraram que a presença de ferro restabelece a capacidade de aderência em bactérias que são deficientes nesta capacidade, e Singh e coautores (2004) mostraram que níveis baixos de ferro estimulam a motilidade das bactérias e bloqueiam a formação de microcolônias.

O processo de sinalização para a formação de biofilme envolve um mecanismo conhecido por *quorum sensing*. Esse mecanismo de comunicação entre as bactérias ocorre pela secreção de moléculas que sinalizam as bactérias a se direcionarem e formarem o biofilme. Essa sinalização tem sido observada tanto em interações simbióticas como patogênicas para a regulação da expressão de genes de interesse (COLE et al., 2004).

Além da formação de biofilme, o mecanismo de *quorum sensing* regula outros processos celulares relacionados à patogenicidade, incluindo os sistemas de

assimilação de ferro (FERDELE e BASLLER, 2002). Assim, o mecanismo de *quorum sensing* exerce um papel na formação de biofilme sob a influência do ferro. De fato, a produção de sideróforos mediada pelo sistema de *quorum sensing* tem sido descrita em *Pseudomonas aeruginosa* (STINTZI et al., 1998), *Burkholderia cepacia* (LEWENZA et al., 1999) e bactérias marinhas (GUAM et al., 2000). *P. aeruginosa* mutantes para *TonB*, o transdutor de energia envolvido com a captação de ferro, são incapazes de formar biofilme maduro (ABBAS et al., 2007). Além disso, Patriquin e colaboradores (2008) ressaltaram que ambos, ferro e mecanismo de *quorum sensing*, desempenham importante papel na formação de biofilme e na motilidade. A formação de biofilme mediada por *quorum sensing* tem sido descrita em algumas bactérias, como a *Vibrio cholerae* (HAMMER et al., 2003), *Pseudomonas aeruginosa* (DAVIES et al., 1998) e a *Klebsiella pneumoniae* (BALESTRINO et al., 2008).

1.3 Fímbrias tipo 1 e tipo 3 em *Klebsiella pneumoniae*

As fímbrias são consideradas um elemento essencial para a colonização de bactérias gram-negativas, principalmente por serem organelas capazes de facilitar a adesão da bactéria às células e substratos e assim possibilitando que a infecção se desenvolva no hospedeiro (HORNICK et al., 1992). *Klebsiella pneumoniae* codifica dois tipos diferentes de fímbrias adesinas que atuam como importantes fatores de virulência: as fímbrias do tipo 1 e as fímbrias do tipo 3.

A capacidade de adesão mediada pelas fímbrias tipo 1 apresenta diferenças funcionais e sorológicas em varias espécies (DUNCAN et al., 2005). Em *K. pneumoniae* as fímbrias tipo de 1 são codificadas pelo *cluster* gênico *fim*, que é composto pelos genes *fimA* codifica subunidade principal da fímbria, genes *fimF*, *fimG* e *fimH*, codificam as menores subunidades estruturais, *fimC* e *fimD*, codificam uma chaperone fimbrial e uma proteína tipo *usher* e o gene *fimI*, ainda não muito estudado (ABRAHAM et al., 1985; VALENSKI et al., 2003).

Apesar da similaridade apresentada pelo *cluster fim* de *Escherichia coli* e *K. pneumoniae*, há diferenças na especificidade da sequência nucleotídica e na

capacidade de aderência a tecidos epiteliais nas duas espécies (DUNCAN et al., 2005). Vários trabalhos revelaram que fímbrias tipo 1 têm desempenhado uma participação efetiva em infecções no trato urinário (CONNELL et al., 1966; LANGERMANN et al., 1997; STRUVE et al., 2008). Têm-se estabelecido que em *K. pneumoniae* as fímbrias tipo 1 também está relacionada a esse tipo de infecção (STRUVE et al., 2008). As fímbrias tipo 1 não influenciam a capacidade de colonização intestinal e infecção pulmonar (STRUVE et al., 2008). Isso pode ser devido a pouca expressão de fímbrias em infecções em que há presença de fagócitos (LAWLOR et al., 2005; SHANKAR-SINHA et al., 2004), uma vez que células fagocíticas fazem o reconhecimento de fímbrias (BERNHARD et al., 1992). Porém, a bactéria garante a expressão de cápsulas polissacarídicas em alguns locais, como um sistema de proteção favorecendo sua virulência (LAWLOR et al., 2005; SHANKAR-SINHA et al., 2004).

As fímbrias tipo 3 desempenham um papel expressivo no desenvolvimento de infecções associadas à formação de biofilme (DI MARTINO et al., 2003; LANGSTRAAT et al., 2001; STRUVE et al., 2009). Essa massa bacteriana é um problema de grande relevância na saúde, pois têm prevalecido em dispositivos de longa permanência, como cateteres e tubos endotraqueais (WU et al., 2010). Tem-se observado a colonização das bactérias tanto em superfícies epiteliais de pacientes imunodeprimidos (CLEGG et al., 1994), quanto em superfícies abióticas, como cateteres. A formação de biofilme envolvendo a *K. pneumoniae* tem dificultado o tratamento de infecções, devido à resistência a antibióticos (DONLAN e COSTERTON, 2002), e normalmente desenvolvendo infecções nosocomiais (PODSCHUN e ULLMANN, 1998). Alguns estudos observaram que fímbrias tipo 3 promovem a fixação de bactérias em células endoteliais, células epiteliais da bexiga, tecido pulmonar (TARKKANEN et al., 1990; TARKKANEN et al., 1997), células epiteliais da traqueia (HORNICK et al., 1992) e células do túbulo renal (TARKKANEN et al., 1997). Também foi documentada adesão às raízes de plantas, hifas de fungos e superfície de vidros (KORHONEN et al., 1983).

Em *K. pneumoniae* as fímbrias tipo 3 são expressas pelo *cluster* gênico *mrk*, composto pelos genes: *mrkA*, que codifica a principal subunidade da fímbria, *mrkB*, que codifica uma chaperona, *mrkC*, que codifica proteína tipo *usher* de membrana externa,

mrkD, codifica adesina, e *mrkF*, que codifica a subunidade menor da fímbria. Além dos genes *mrkABCDF*, foi identificado o gene *mrkE*, que codifica um provável regulador de transcrição de fímbrias e que está localizado *upstream* ao gene *mrkA* (ALLEN et al., 1991; STRUVE et al., 2009). As fímbrias tipo 3 proporcionam estratégias de adesão e colonização ao patógeno. Alguns estudos revelaram que a subunidade principal da fímbria tipo 3, MrkA, pode facilitar o crescimento da bactéria em superfícies abióticas, enquanto que a adesina MrkD favorece o crescimento em células humanas e pode mediar a adesão a estruturas de colágeno (TARKKANEN et al., 1990; JAGNOW e CLEGG, 2003). Huang e colegas (2009) revelaram que as proteínas MrkA, a principal subunidade das fímbrias, e MrkF, a menor subunidade, interagem entre si. Segundo os autores, a subunidade MrkF modula a atividade das fímbrias tipo 3, uma vez que sua incorporação durante a montagem das fímbrias resulta em fímbrias mais curtas porém com maior capacidade de autoagregação e de formação de biofilme.

1.4 Variação de fase de antígenos flagelares

A variação de fase antigênica é uma estratégia verificada em muitas espécies bacterianas, e tem como objetivo favorecer a adaptação da bactéria a um determinado ambiente. A variação de fase de antígenos flagelares (antígenos H) foi primeiramente descrita em linhagens do gênero *Salmonella*. O flagelo é apontado como um dos principais antígenos na maioria dos sorotipos de *Salmonella*, sendo que a variedade sorológica do flagelo é muito importante na diferenciação da bactéria (EWING, 1986).

A maioria das linhagens do gênero *Salmonella* possui um sistema de locomoção composto de uma proteína flagelar denominada flagelina. Determinadas linhagens podem expressar de maneira alternada dois tipos diferentes de flagelina: a flagelina de fase 1, denominada H1 e codificada pelo gene *fljC*, e a flagelina de fase 2, denominada H2 e codificada pelo gene *fljB*. Estes dois genes flagelares estão localizados em regiões distantes do cromossomo e são expressos de forma alternada, gerando duas fases diferentes de expressão flagelar, a fase 1 ou a fase 2 (ZIEG et al., 1977; ZIEG e SIMON, 1980; MACNAB, 2003).

A expressão alternada dos genes flagelares é controlada por um segmento de DNA de aproximadamente 997 pares de bases denominado segmento H. Este segmento contém a região promotora dos genes *fljB* e *fljA*, que estão organizados em operon e codificam, respectivamente, a flagelina FljB e o repressor FljA. Estando o promotor em orientação positiva “ON”, tem-se a expressão conjunta dos genes *fljB* e *fljA*: são expressos a flagelina FljB e o repressor FljA, que reprime a expressão do gene *fliC*. A alternância da fase flagelar ocorre quando há uma inversão da orientação do segmento H. Quando ocorre a inversão do segmento H tem-se a expressão de flagelos de fase 1: a orientação da região promotora do operon *fljB-fljBA* é negativa (“OFF”) e os genes *fljB* e *fljA* não são expressos. Na ausência do repressor FljA o gene *fliC* é expresso, sendo formada a flagelina FljC (ZIEG e SIMON, 1980).

A inversão da orientação do segmento H é catalizada pela recombinase Hin, codificada pelo gene *hin* que está localizado adjacente ao operon *fljA-fljB*. A recombinase Hin catalisa recombinações sítio-específicas devido à presença de sequências de 26 pares de bases de repetição invertida, denominada *hix*, que flanqueiam o segmento H (ZIEG e SIMON, 1980).

A bactéria é capaz de burlar o sistema imunológico do hospedeiro com o mecanismo de variação de fase antigênica uma vez que há a expressão alternada, e nunca concomitante, das flagelinas FljB ou FljC. De fato, esta capacidade de alternar a expressão de antígenos flagelares traz vantagens para as bactérias, uma vez que aqueles indivíduos da população que mudaram de fase poderão sobreviver à resposta imune do hospedeiro. Se o hospedeiro produz anticorpos contra determinado antígeno flagelar, as bactérias passam a expressar um antígeno flagelar alternativo, e assim serão capazes de sobreviverem e multiplicarem-se (ZIEG et al., 1977).

Existem divergências entre *Escherichia coli* e sorotipos de *Salmonella* quanto aos antígenos flagelares (H) e ao sistema de secreção flagelar. Enquanto a maioria dos sorotipos de *Salmonella* apresenta variação de fase de antígenos flagelares, com a expressão alternada dos genes *fljB* e *fljC*, em *E. coli* acreditava-se que apenas um único gene, o gene *fliC48*, codificava para antígeno flagelar, sendo portanto considerados flagelos monofásicos. Ou seja, acreditava-se que *E. coli* manifestava

apenas um tipo de flagelo com atividade antigênica específica (ZIEG et al.,1977). Tal hipótese foi aceita até meados dos anos 80. A partir de então, estudos revelaram que amostras de *E. coli* que expressavam antígeno flagelar H3 e H17 podiam, de forma espontânea, mudar seus antígenos flagelares para H16 e H4, respectivamente (RATINER, 1982 e 1983). Atualmente um total de 57 tipos diferentes de antígenos *H* em *E. coli* são oficialmente reconhecidos.

Estudos posteriores dos genes flagelares em *E. coli* isoladas do ambiente demonstraram que algumas *E. coli* apresentam outros genes para expressão de flagelina além do gene *fliC48*. Quatro novos genes que expressam flagelinas foram identificados: gene *fliA*, que codifica os antígenos H44 e H55 (TOMINAGA e KUTSUKAKE, 2007), gene *flkA*, que expressa os antígenos H3, H36, H47 e H53 (TOMINAGA, 2004), gene *flmA*, responsável pela expressão do antígeno H54 (TOMINAGA, 2004) e gene *fliA*, que codifica o antígeno H17. Linhagens com o sorotipo H35 contém um gene *fliC* interrompido e o gene responsável pela expressão do antígeno foi determinado mais tarde como sendo o gene *flkA* (FENG et al., 2008). As linhagens com os sorotipos H3, H53 e H54, além de expressar flagelinas por meio dos genes *flkA* e *flmA*, apresentam ainda um gene, denominado *fljA*, que codifica uma proteína com atividade repressora semelhante à proteína FljA de *Salmonella*, reprimindo a expressão do gene *fliC* (RATINER, 1998; TOMINAGA, 2004). Além disso, estudos têm revelado que os genes *flkA* e *flmA* são flanqueados por elementos de inserção e estão localizados próximos a genes envolvidos em recombinação do DNA, o que sugere que estes genes podem ter sido transferidos como parte de unidades transponíveis (TOMINAGA, 2004; TOMINAGA e KUTSUKAKE, 2007).

A frequência da variação de fase flagelar pode ser influenciada por fatores externos, como condições de cultivo e mudanças de temperatura de incubação. A frequência pode ser tão elevada quanto uma mudança em uma célula a cada 10 células por geração. Entretanto, dependendo da espécie bactéria a variação pode ter uma frequência menos elevada, da ordem de 1 para 1000 células por geração (TOMINAGA, e KUTSUKAKE, 2007).

A expressão de fímbrias tipo 1 em *K. pneumoniae* também exhibe o mecanismo de variação de fases, e neste caso envolve o elemento *fimS* que contém a região promotora do *cluster fim* (TOMINAGA e KUTSUKAKE, 2007). O elemento *fimS* pode sofrer inversão de sua orientação por meio da ação de DNAs recombinases. De acordo com a orientação do elemento *fimS* a região promotora do *cluster fim* pode estar posicionada imediatamente *upstream* ao *cluster* ou distante dele. Assim, dependendo das condições em que as bactérias se encontram, tem-se a variação do elemento *fimS* nas fases “ON”, em que a região promotora está posicionada imediatamente *upstream* ao *cluster fim* e as bactérias apresentam um estado fimbriado, ou “OFF”, em que a região promotora está distante do *cluster fim* e as células estão em um estado afimbriado (KLEMM, 1986).

A inversão da orientação do elemento *fimS* é mediada pelas DNAs recombinases codificadas pelos genes *fimE* e *fimB*. A DNA recombinase FimE altera a fase de “ON” para “OFF”, enquanto FimB pode regular para qualquer orientação, tanto para “OFF” quanto para “ON” (MCCLAIN et al., 1991). Porém, são muitos os fatores que regulam a expressão desses dois genes (EL LABANY et al., 2003).

Os fatores envolvidos na variação de fase parecem estar relacionados aos sinais ambientais e condições de colonização das bactérias, podendo haver uma relação inversa entre expressão de cápsulas e de fímbrias (FAVRE-BONTE et al., 1999; MATATOV et al., 1999; SAHLY et al., 2000; STRUVE et al., 2008). Dependendo das condições, haveria o favorecimento da expressão de fímbrias e repressão de cápsulas protetoras em que sítios de infecção onde a adesão da bactéria seria necessária, como no trato urinário; ou a repressão da expressão de fímbrias e indução da expressão de cápsulas em sítios em que há a presença de fagócitos, como na corrente sanguínea e nos pulmões. Apesar do reconhecimento da variação de fase em algumas bactérias, estudos sobre a influência de fímbrias tipo 1 em outras infecções, além do trato urinário, têm sido pouco descritos (STRUVE et al., 2008).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo a investigação do papel do ferro e do repressor Fur na regulação da expressão de genes que codificam fímbrias em *Klebsiella pneumoniae*.

2.2 Objetivos específicos

1. Identificar, por análises de bioinformática, e validar, pelo ensaio FURTA, prováveis boxes Fur na região promotora de genes que codificam fímbrias em *Klebsiella pneumoniae*.
2. Investigar o padrão de expressão dos genes fimbriais que apresentam box Fur na região promotora, a partir de células de *K. pneumoniae* cultivadas em meio LB (condição controle), e a partir de células isoladas após 30 minutos de incubação após a adição de ferro (FeSO_4) ou de quelante de ferro (2,2'-dipiridil).
3. Investigar o mecanismo de variação de fase na expressão de fímbrias de tipo 1 em células de *K. pneumoniae* cultivadas nas três diferentes condições (LB simples, com FeSO_4 e com 2,2'-dipiridil) por 24 e 96 horas de incubação em cultura sólida e líquida.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Condições de cultivo de *Klebsiella pneumoniae*

Para este estudo foi utilizada a linhagem *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031. A bactéria foi cultivada a 37°C em meio LB sólido ou líquido. Nos meios foram adicionados 100 µM de sulfato ferroso (FeSO₄), no caso de condição repleta de ferro, ou 100 µM do quelante de ferro 2,2'-dipiridil, no caso de condição de escassez de ferro. Como condição controle foi considerado o cultivo das bactérias em meio LB somente.

3.2 Identificação de boxes Fur e validação pelo ensaio FURTA

A identificação de prováveis boxes Fur na região promotora dos operons *fim* e *mrK* em *K. pneumoniae* foi realizada por análises de bioinformática, utilizando-se a metodologia empregada por Schneider (1977) e Quatrini e colegas (2007), com algumas modificações. Esta etapa do trabalho contou com a colaboração do Prof. Dr. Renato Vicentini (Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, da Unicamp).

Para esta análise, boxes Fur de outras *Enterobacteriaceae* foram utilizados para a construção de uma sequência consenso e esta sequência foi utilizada como matriz para a identificação de prováveis boxes Fur na região promotora dos operons *fim* e *mrK* em *K. pneumoniae*. Foram consideradas as seqüências que cumpriram os seguintes parâmetros: 1) tamanho de 19 pares de bases; 2) escore de similaridade maior que 9 bits; 3) distância máxima de até 600 pares de bases do códon iniciador do gene alvo, e 4) seqüências com os nucleotídeos mais conservados entre boxes Fur de outras bactérias.

Os boxes Fur identificados foram validados pelo ensaio FURTA (do inglês *FUR Titration Assay*) conforme descrito por Stojiljkovic e coautores (1994). As células de *E. coli* linhagem H1717 utilizadas neste ensaio foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Klaus Hantke (Universidade de Tübingen, Alemanha).

No ensaio FURTA, células de *E. coli* linhagem H1717 foram transformadas com vetores *pGem[®]-T Easy* (Promega), contendo os prováveis boxes Fur identificados nos operons *fim* e *mrK*. As bactérias transformadas foram plaqueadas em meio de cultura MacConkey contendo 50 mg/mL de antibiótico ampicilina e 100 µM de FeSO₄ e incubadas por 12 horas a 37 °C. A linhagem de *E. coli* H1717 possui, inserido em seu cromossomo, uma construção composta do box Fur do gene *fhuF* mais o gene *lacZ* que codifica β-galactosidase. Quando as linhagens são transformadas com vetores contendo boxes Fur funcionais, a proteína Fur se dissocia da construção *fhuF-lacZ* para então se ligar aos prováveis boxes. Ao se desligar da construção, o gene da β-galactosidase é transcrito e resulta em colônias vermelhas no meio MacConkey, indicando que o vetor contém um box Fur funcional. A ausência de coloração avermelhada indica que o Fur permaneceu ligado à construção *fhuF-lacZ* e reprimiu a expressão da β-galactosidase, indicando que o vetor não possui um box Fur funcional.

3.3 Variação de fase em células de *Klebsiella pneumoniae*

3.3.1 Extração de DNA genômico e amplificação do elemento *fimS*

DNA genômico foi extraído de células de *K. pneumoniae* cultivadas por 24 e 96 horas em meio LB líquido ou sólido nas seguintes condições: LB somente, LB contendo ferro e LB contendo 2,2'-dipiridil. A extração foi realizada com o kit *Wizard[®] Genomic DNA purification Kit* (Promega).

Para amplificação do elemento *fimS* foram utilizados o DNA genômico extraído de *K. pneumoniae* e pares de *primers* (Tabela 1) descritos por Struve e colegas (2008).

Tabela 1. Par de *primers* utilizado para a amplificação por PCR do elemento *fimS*.

<i>Primers</i>	Sequencia (5' > 3')	Amplicon
CAS168	GGGACAGATACGCGTTTGAT	816 pares de bases
CAS169	GGCCTAACTGAACGGTTTGA	

A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 μ L e continha os seguintes reagentes: tampão de reação 1x, 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,5 μ M de cada *primer*, 0,5 μ g de DNA genômico de *K. pneumoniae*, 2,5 unidades de *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen) e quantidade suficiente de água autoclavada para o volume final de 25 μ L. As reações foram submetidas aos seguintes ciclos: etapa inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de 95°C por 1 minuto, 52°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto, e uma etapa final de extensão a 72°C por 10 minutos. O resultado obtido na reação de PCR foi checado após aplicação das amostras em gel de agarose 1% e corrida de eletroforese em tampão de corrida TBE 1x.

3.3.2 Digestão do elemento *fimS* com a enzima *HinI*

Para se investigar a variação de fase, o elemento *fimS* amplificado por PCR foi submetido a digestão com enzima de restrição *HinI*. A reação de digestão foi realizada em um volume final de 15 μ l e consistiu de tampão 1x, 2,5 unidades de *HinI* e 10 μ L do elemento *fimS* amplificado por PCR. Após incubação por 1 hora a 37°C os fragmentos digeridos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão de corrida TBE 1x. De acordo com os fragmentos obtidos na digestão foi possível determinar se houve ou não a variação de fase do elemento *fimS* que contém a região promotora do *cluster fim*, nas condições de cultivo descritas na seção anterior.

3.4 Caracterização da expressão gênica por PCR em tempo real

3.4.1 Extração de RNA total e síntese de cDNA

Para os experimentos de PCR em tempo real células de *K. pneumoniae* foram cultivadas até atingirem uma densidade ótica a 600 nanômetros de 0.4 (fase inicial do crescimento). Neste momento as células foram submetidas a três condições distintas: **1)** na condição controle as células foram incubadas por 30 minutos no meio LB, **2)** na condição repleta de ferro as células foram incubadas por 30 minutos após a adição de ferro (100 μ M de $FeSO_4$) ao meio, e **3)** na condição de escassez de ferro as células foram incubadas por 30 minutos após a adição de um quelante de ferro (100 μ M de

2,2'-dipiridil) ao meio. A Figura 1 mostra a curva de crescimento de *Klebsiella pneumoniae* nas três condições investigadas. Após o cultivo nestas condições as células de *K. pneumoniae* foram isoladas por centrifugações e armazenadas em *RNAprotect[®] Bacteria Reagent* (Qiagen) a -80°C , para minimizar a degradação do RNA até o momento da extração do RNA total.

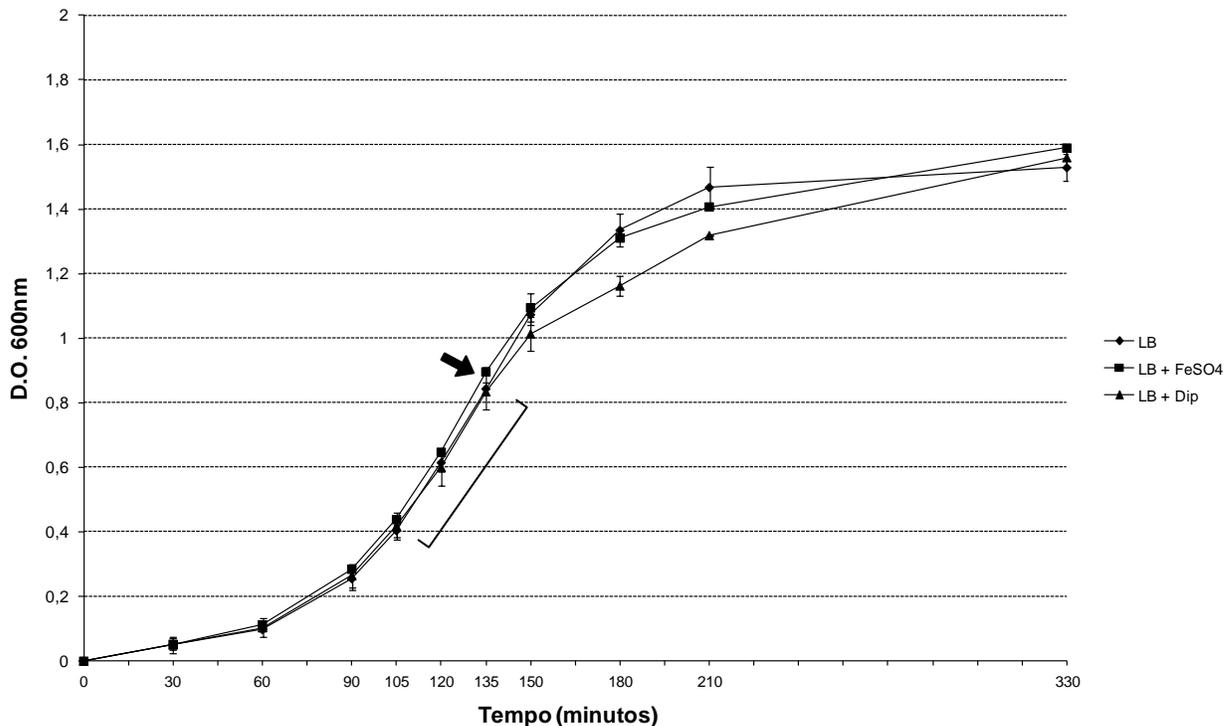


FIGURA 1. Curva de crescimento de *Klebsiella pneumoniae* em meio de cultura LB, LB contendo ferro (FeSO_4) e LB contendo o quelante de ferro 2,2'-dipiridil (Dip). O colchete indica o período (30 minutos) em que as células foram incubadas na presença dos suplementos. A seta indica o ponto em que as células de *K. pneumoniae* foram isoladas para extração do RNA total.

A extração do RNA total foi realizada com o kit *RNeasy Mini Kit* (Qiagen), seguindo instruções do fabricante. No final, as amostras foram submetidas a um tratamento com *DNase*, para a remoção de DNA. Em seguida, a integridade do RNA isolado foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 1% contendo 6% de formaldeído em tampão de corrida MOPS. Por fim, o RNA foi quantificado em espectrofotômetro e guardado a -80°C até o momento de sua utilização na síntese de DNA complementar (cDNA).

A partir do RNA total extraído foi realizada a síntese de cDNA com o kit *ThermoScript™ RT-PCR System* (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. A reação de síntese iniciou-se com a desnaturação, por 5 minutos a 65° C, de uma mistura contendo 3 µg de RNA total, 2 µL de um mix de *dNTPs* (concentração inicial de 10 mM), 1 µL de *primer* hexâmero randômico (50 ηg/µl) e quantidade suficiente de água tratada com DEPC (Dietilpirocarbonato), para um volume final de 12 µL. Após a desnaturação a mistura foi colocada em gelo e à ela foi acrescentado 4µl de tampão de reação (5x), 1 µL de DTT (Ditiotreitol) 100 mM, 1 µL de *RNase OUT™* 40 U/µL (Invitrogen), 1 µL de água tratada com DEPC e 1 µL da enzima *ThermoScript™ RT* 15 U/µL (Invitrogen). Em seguida a mistura foi incubada por 10 minutos a 25°C, seguida de incubação por 50 minutos a 50°C. A reação foi finalizada por desnaturação a 80°C por 5 minutos. Uma vez atingido a temperatura ambiente, à reação foi acrescentado 1 µL de *RNase H* 2U/µL (Invitrogen) e a reação foi novamente incubada a 37°C por 20 minutos para que houvesse a degradação de qualquer RNA remanescente. Após incubação, o cDNA sintetizado foi então quantificado em espectrofotômetro e utilizado nas reações de PCR em tempo real.

3.4.2 PCR em Tempo Real

O padrão de expressão dos genes *fimE* e *mrkA*, nos quais foram identificados box Fur em suas regiões promotoras, foi investigado por PCR em tempo real com os cDNAs sintetizados conforme descrito na seção anterior. Além deles, também foi incluído nestas análises o gene *fimA*. Como controles internos dos experimentos de PCR em tempo real foram utilizados os genes endógenos *rho*, que codifica um fator envolvido com a terminação da transcrição, e *recA*, que codifica uma enzima envolvida com o processo de recombinação do DNA. Os pares de *primers* específicos para cada gene foram desenhados utilizando-se o programa *Primer3 v. 0.4.0* (ROZEN e SKALETSKY, 2000) e foram desenhados de maneira que tivessem temperatura de anelamento de 60°C e que rendessem amplicons com tamanhos entre 95 a 105 pares de bases. Os *primers* estão descritos na Tabela 2 e foram previamente testados por

PCR convencional a partir de DNA genômico de *K. pneumoniae* para se averiguar a eficiência de amplificação dos genes.

Tabela 2. Sequência nucleotídica dos *primers* utilizados nas reações de PCR em tempo real. O tamanho dos amplicons está representado em pares de bases.

Gene	Primer Sense (5' > 3')	Primer Antissense (5' > 3')	Amplicon
<i>mrkA</i>	GGCTGCTGATGGCACTAAA	GCCAGGTAGCCCTGTTGTT	105
<i>fimE</i>	CGATTCATCCACTGCGTTT	AAACAGTGCCTCCGTTTTG	98
<i>fimA</i>	CGTCGGTTTTCAACATCCAG	GGTGGTATTGCTGCTGTCG	100
<i>recA</i>	TTAAACAGGCCGAATTCCAG	CCGCTTTCTCAATCAGCTTC	99
<i>rho</i>	AACTACGACAAGCCGAAAA	ACCGTTACCACGCTCCATAC	99

As reações foram realizadas em triplicatas com o kit *Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG* (Applied Biosystems) e no equipamento Real-Time PCR System 7300 *Applied Biosystems*, seguindo instruções do fabricante. As reações do PCR em tempo real consistiram em 100 ng de cDNA, 6,25 µL de *Platinum[®] SYBR[®] Green*, 0,25 µL de *Rox Reference Dye*, 0.4 µM de cada *primer* e água em quantidade suficiente para um volume final de 12,5 µL. Em uma etapa inicial as reações foram tratadas com *UDG* (do inglês, *Uracil-DNA Glycosylase*, presente no próprio kit de reação) por 2 minutos a 50°C, seguida de desnaturação por 2 minutos a 95°C. Após este pré-tratamento, as amostras foram submetidas a 40 ciclos nas seguintes condições de termociclagem: 95°C por 15 segundos, 60°C por 20 segundos e 72°C por 32 segundos.

Ao final da reação de PCR em tempo real, uma etapa adicional de dissociação foi realizada (40 ciclos com um decréscimo de 1°C a cada 15 segundos, iniciando-se em 95°C) para a geração de uma curva de *melting*. A análise desta curva permitiu verificar a especificidade da reação, ou seja, se não havia a presença de bandas inespecíficas e/ou dímeros de *primers*. A análise dos dados gerados foi feita com o auxílio do *software Real-Time System RQ Study software V1.3.1 9* (*Applied*

Biosystems). Por meio deste software determinou-se o *threshold*, ou limiar de detecção, de cada amostra testada. O *threshold* corresponde a um ponto de referência, uma vez que neste ponto todas as amostras possuem a mesma intensidade de fluorescência. Uma vez determinado o *threshold*, foi estabelecido o número de C_T (do inglês *threshold cycle*) de cada amostra. O número de C_T serve como base de comparação entre as amostras, pois se refere ao número de ciclo no qual a curva de amplificação de cada amostra atinge o *threshold* estabelecido. O método $\Delta\Delta CT$ ou limiar comparativo (*comparative threshold method*, tradução livre do inglês), foi utilizado para calcular a expressão constitutiva dos genes (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Os dados obtidos foram analisados estatisticamente com o teste *t-student*. O nível de expressão de cada gene foi realizado em triplicata nas determinadas situações de cultivo.

3.5 Análise da transcrição policistrônica dos genes dos operons *fim* e *mrk*

Reações de PCR foram realizadas para se investigar se os genes que compõem cada um dos operons *fim* e *mrk* são transcritos numa mesma unidade transcricional; ou seja, se são transcritos num único RNA policistrônico. Para tal, foram utilizados DNA genômico isolado de *K. pneumoniae* e cDNAs sintetizados para os experimentos de PCR em tempo real, conforme descrito nas seções 3.3.1 e 3.4.1. As reações foram realizadas com pares de *primers* (Tabela 3) que anelam em cada uma das extremidades dos genes.

A reação de PCR consistiu em volume final de 25 μ L e continha os seguintes reagentes: tampão de reação 1x, 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,5 μ M de cada *primer*, 0,5 μ g de DNA genômico ou 100 η g de cDNA de *K. pneumoniae*, 2,5 unidades de *SuperTaq DNA Polymerase* (Ambion) e água autoclavada em quantidade suficiente para o volume final de 25 μ L. As reações foram submetidas aos seguintes ciclos: etapa inicial de desnaturação a 93°C por 5 minutos; 40 ciclos de 93°C por 1 minuto, 60°C por 45 segundos e 68°C por 5 minutos; e etapa final de extensão a 68°C por 10 minutos. O resultado obtido na reação de PCR foi checado após aplicação das amostras em gel de agarose 0.8% e corrida de eletroforese em tampão de corrida TBE 1x.

Tabela 3. Sequência nucleotídica dos *primers* utilizados nas análises da transcrição policistrônica dos genes dos operons *fim* e *mrk*.

Operon	Entre os genes	Primers¹	Sequência (5' > 3')	Amplicon²
<i>mrk</i>	<i>mrkA</i> e <i>mrkC</i>	<i>mrkA</i> -S	GGCTGCTGATGGCACTAAA	3041
		<i>mrkC</i> -AS	GCAAAGCGCGAGTTATTGA	
	<i>mrkC</i> e <i>mrkF</i>	<i>mrkC</i> -S	CGCGACGATCGTATTTTAC	2004
		<i>mrkF</i> -AS	GTCCGCGATCGTAATTGG	
<i>fim</i>	<i>fimA</i> e <i>fimD</i>	<i>fimA</i> -S	CGTCGGTTTTCAACATCCAG	2600
		<i>fimD</i> -AS	TGTTTCAGGCCGCTCTGTAG	
	<i>fimD</i> e <i>fimG</i>	<i>fimD</i> -S	CGCCGGGCTGATTA ACTAT	2980
		<i>fimG</i> -AS	AGTACCCACGGGGCAGTT	
	<i>fimG</i> e <i>fimK</i>	<i>fimG</i> -S	CGAGCTGGGCGATCTCTAT	2485
		<i>fimK</i> -AS	GCTCCCCTGAGAAAAGCAG	

1. S, *primer sense*; AS, *primer antissense*.

2. Tamanho dos amplicons em pares de bases.

3.6 Técnicas básicas de biologia molecular

As técnicas básicas de biologia molecular como extração de DNA, eletroforese de ácidos nucleicos, digestão enzimática do DNA, clonagens, e etc, foram realizadas conforme Sambrook e coautores (1989).

4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1 Identificação de prováveis boxes Fur

As análises de bioinformática permitiram a identificação de dois prováveis boxes Fur na região promotora dos genes *fimE* e *mrkA* que estão envolvidos com a síntese de fímbrias do tipo 1 e 3, respectivamente. Na Tabela 4 estão representados as seqüências nucleotídicas dos prováveis boxes Fur identificados, as localizações e os respectivos escores. A Figura 2 esquematiza os *clusters* gênicos da via de síntese das fímbrias tipo 1 e 3, e a localização dos boxes Fur encontrados.

Tabela 4. Prováveis boxes Fur encontrados na região promotora dos genes *fimE* e *mrkA*, que codificam fímbrias do tipo 1 e 3, respectivamente.

Genes	Fímbrias	BOX FUR		
		Localização ¹	Seqüência	Escore
<i>fimE</i>	Tipo 1	460 pb	AATATTCATGATTATTAAC	12.12
<i>mrkA</i>	Tipo 3	214 pb	AAGAATGCTATTTATTTCGC	12.59

1. Localização: em pares de bases (pb) e anterior (*upstream*) ao códon iniciador da tradução.

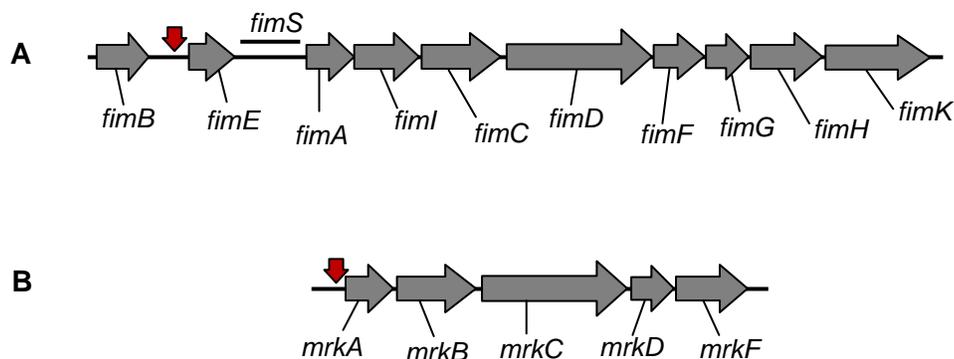


Figura 2. *Clusters* gênicos da via de síntese de fímbrias do tipo 1 (A, operon *fim*) e 3 (B, operon *mrk*). As setas vermelhas indicam os boxes Fur identificados na região promotora dos genes *fimE* e *mrkA*. O elemento *fimS*, no operon *fim* está representado entre os genes *fimE* e *fimA*.

4.2 Validação dos boxes Fur pelo ensaio FURTA

Os boxes Fur identificados nos genes *mrkA* e *fimE* foram validados por meio do ensaio FURTA, utilizando-se a linhagem de *E. coli* H1717 transformada com vetores contendo a sequência nucleotídica desses boxes Fur. A validação é confirmada de acordo com o padrão de coloração das colônias. Quando a linhagem H1717 é transformada com vetores contendo boxes Fur funcionais, a proteína Fur se dissocia da construção *fhuF-lacZ* para então se ligar aos prováveis boxes. Ao se desligar da construção, o gene da β -galactosidase é transcrito e resulta em colônias vermelhas no meio MacConkey, indicando que o vetor contém um box Fur funcional. A ausência de coloração avermelhada indica que o Fur permaneceu ligado à construção *fhuF-lacZ* e reprimiu a expressão da β -galactosidase, indicando que o vetor não possui um box Fur funcional. Na Figura 3 pode-se observar um controle positivo (colônias avermelhadas, presença de box Fur funcional), um controle negativo (colônias incolores, ausência de box Fur), e os resultados do ensaio FURTA para os boxes Fur identificados na região promotora dos genes *fimE* e *mrkA*.

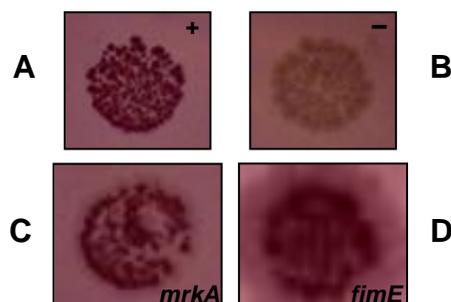


Figura 3. Validação dos boxes Fur nos genes *mrkA* e *fimE* pelo ensaio FURTA em comparação com os controles positivo (+) **A** e negativo **B** (-) Ex: **A** Positivo, **B** Negativo, **C** *mrkA* Positivo, **D** *fimE* Positivo

Os resultados mostram a validação dos boxes Fur tanto do gene *mrkA* quanto do gene *fimE*. O padrão de coloração intensamente vermelha das colônias evidencia a confirmação funcional dos boxes Fur identificados pelo ensaio FURTA.

4.3 Avaliação da variação de fase do elemento *fimS* no operon *fim*

A orientação do elemento *fimS* foi investigada em *K. pneumoniae* cultivada a 24 e 96 horas em meio estático e sob agitação, suplementadas com ferro ou 2,2'-dipiridil. O elemento *fimS* possui um sítio de restrição para a enzima *HinfI*. A localização assimétrica deste sítio permite determinar a orientação do elemento *fimS*, uma vez que, dependendo da orientação, são gerados fragmentos com tamanhos diferentes, conforme digestão com a *HinfI* (Figura 4).

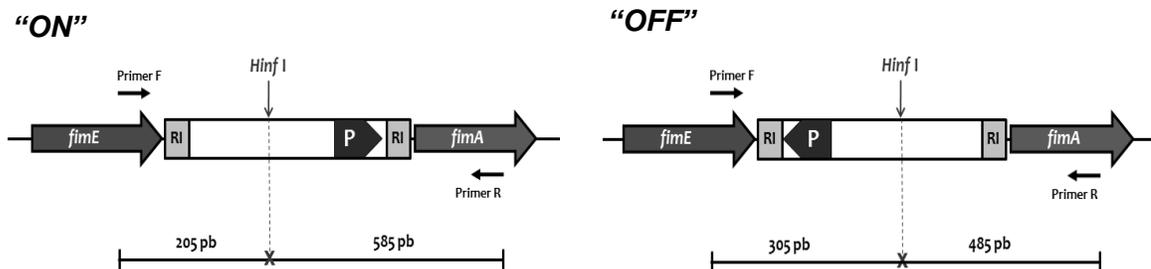


Figura 4. Representação esquemática do elemento *fimS* na região intergênica entre *fimE* e *fimA*. O trecho identificado por "P" representa a região promotora contida no elemento *fimS*; os trechos "RI" representam as repetições invertidas. Estão representados também o sítio de anelamento dos primers F e R para amplificação do elemento *fimS* e a posição do sítio de restrição da enzima *HinfI*. Se, após a digestão, o elemento *fimS* estiver na fase "ON" (ligada) são gerados fragmentos de 205 e 585 pares de bases (pb). Ao passo que na fase "OFF" (desligada), os fragmentos gerados apresentam tamanhos de 305 e 485 pb.

Para a investigação da variação de fase, o elemento *fimS* foi inicialmente amplificado por PCR (Figura 5). Em seguida, o produto amplificado foi submetido à digestão com a enzima de restrição *HinfI*, e os fragmentos digeridos foram então separados em gel de agarose 1,5%.

A Figura 6 ilustra os resultados obtidos após o cultivo em meio LB líquido (sob agitação). Conforme pode ser observado, após 24 horas de cultivo (Figura 6A) foi possível observar, tanto em meio LB quanto em meio LB contendo 2,2'-dipiridil, fragmentos que indicam o elemento *fimS* tanto na orientação "ON" (205 e 585 pb) quanto "OFF" (305 e 485 pb). Após 24 horas de cultivo em meio LB contendo ferro observa-se o elemento *fimS* na orientação "OFF" (305 e 485 pb).

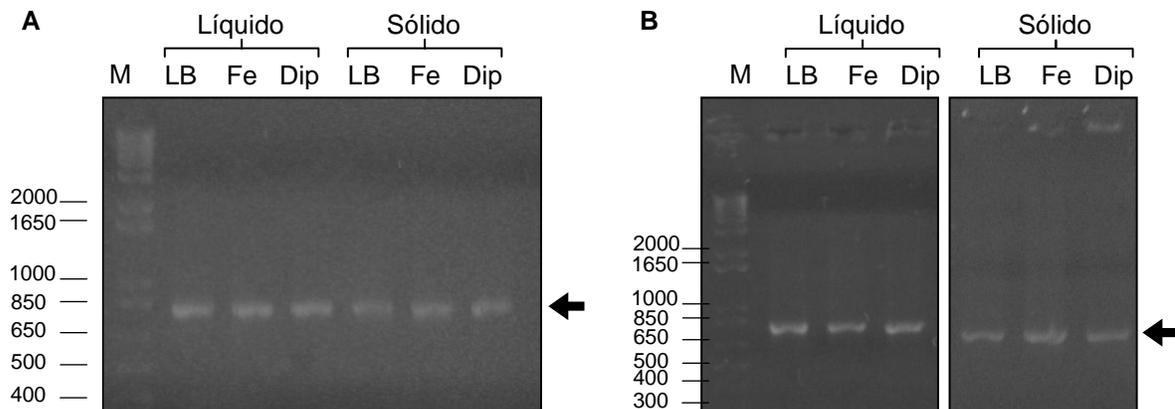


Figura 5. Gel de agarose 1,5% mostrando o elemento *fimS* amplificado por PCR a partir de células de *K. pneumoniae* cultivadas por 24 (A) e 96 horas (B) em meio LB líquido e sólido, nas seguintes condições: meio LB somente (LB), meio LB contendo ferro (Fe) e em meio LB contendo 2,2'-dipiridil (Dip). As setas indicam o fragmento de 816 pares de bases correspondente ao elemento *fimS* amplificado. M, marcadores de peso molecular com os respectivos tamanhos em pares de bases.

O cultivo por 96 horas em meio LB líquido indica o elemento *fimS* na orientação “OFF” nas condições meio LB e meio LB contendo ferro (Figura 6B). Por outro lado, assim como observado no cultivo por 24 horas em LB e LB contendo 2,2'-dipiridil, após 96 horas em LB contendo 2,2'-dipiridil observa-se o elemento *fimS* tanto na orientação “ON” quanto “OFF”. Estes resultados sugerem a existência, nestas condições, de duas populações distintas de bactéria: células fimbriadas e células afimbriadas.

Meio LB líquido



Figura 6. Gel de agarose 1,5% mostrando os fragmentos gerados após digestão, com a enzima *HinfI*, do elemento *fimS* amplificado a partir de células de *K. pneumoniae* cultivadas por 24 (A) e 96 (B) horas em meio LB líquido (LB), meio LB líquido contendo ferro (Fe) e em meio LB líquido contendo 2,2'-dipiridil (Dip). Setas brancas indicam fragmentos na fase “OFF”. Setas negras indicam fragmentos na fase “ON”. M, marcadores de peso molecular com os tamanhos em pares de bases.

A Figura 7 mostra os resultados obtidos após o cultivo em meio LB sólido (condição estática) por 24 e 96 horas. Conforme pode ser observado, após 24 horas de cultivo não houve alteração na variação do elemento *fimS*, que se manteve na orientação “OFF” (305 e 485 pb), independentemente da condição testada (se LB sólido somente, LB contendo ferro ou contendo 2,2'-dipiridil). Também não foi observado variação da fase do elemento *fimS* após 96 horas de cultivo em meio LB sólido e em meio LB sólido contendo ferro. No entanto, houve variação para a fase “ON” somente quando *K. pneumoniae* foi mantida por 96 horas em meio LB contendo 2,2'-dipiridil.

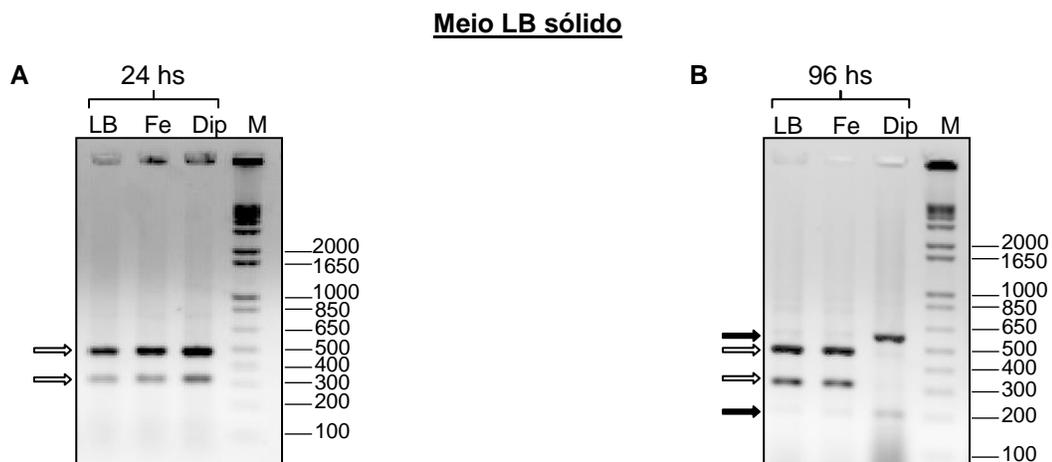


Figura 7. Gel de agarose 1,5% mostrando os fragmentos gerados após digestão, com a enzima *HinfI*, do elemento *fimS* amplificado a partir de células de *K. pneumoniae* cultivadas por 24 (A) e 96 horas (B) em meio LB sólido (LB), meio LB sólido contendo ferro (Fe) e em meio LB sólido contendo 2,2'-dipiridil (Dip). Setas brancas indicam os fragmentos na fase “OFF”. Setas negras indicam os fragmentos na fase “ON”. M, marcadores de peso molecular com os tamanhos em pares de bases.

Alguns estudos com *K. pneumoniae* têm investigado a orientação do elemento *fimS* na expressão de fímbrias tipo 1 e seu papel na patogenicidade daquela bactéria. Schroll e colegas (2010) investigaram a orientação do elemento *fimS* durante o processo de formação de biofilme por *K. pneumoniae*. Estes autores observaram que em células que estão em formação de biofilme o elemento *fimS* encontra-se somente na orientação “OFF”, indicando que a expressão de fímbrias tipo 1 é reprimida. Os autores concluíram que em *K. pneumoniae* as fímbrias tipo 1, apesar de ser um fator de

virulência essencial para infecções do trato urinário, não estão envolvidas com a formação de biofilme.

De acordo com Struve e colaboradores (2008), a orientação do elemento *fimS* em *K. pneumoniae* encontra-se na posição “OFF” no pulmão e intestino, e na posição “ON” no trato urinário. Segundo os autores, a expressão de fímbrias tipo 1 somente no trato urinário sugere que estas fímbrias possuem uma participação efetiva em infecções urinárias e nenhuma influência na capacidade de colonização intestinal e infecção pulmonar.

Struve e colegas (2008) também avaliaram a influência das condições de cultivo de *K. pneumoniae* na orientação do elemento *fimS*. Os autores verificaram que o cultivo em meio líquido sob agitação resultou na identificação de 4 bandas, correspondendo à uma mistura de células com o elemento *fimS* nas posições “ON” e “OFF”, e que o cultivo em meio estático induziu a inversão do *fimS* para a posição “OFF”. Resultados semelhantes foram observados neste trabalho. No caso do cultivo por 24 horas em meio LB sob agitação observou-se duas populações distintas de bactéria: células fimbriadas e células afimbriadas (Figura 6A, LB). Ao passo que no cultivo por 24 horas em meio estático observou-se apenas bactérias afimbriadas (Figura 7A, LB).

Os autores investigaram também a orientação do elemento *fimS* após o cultivo da bactéria por 96 horas de incubação. Após este período, em condições sob agitação foram identificados células com o elemento *fimS* nas posições “ON” e “OFF”, enquanto que em condições estáticas, somente células com *fimS* na posição “OFF” foram identificadas. Os resultados apresentados neste trabalho mostram o elemento *fimS* na posição “OFF” após 96 horas de incubação tanto na condição sob agitação (Figura 6B, LB) quanto na condição estática (Figura 7B, LB). Por outro lado, o cultivo na presença de 2,2'-dipiridil, independentemente de incubação estática ou sob agitação, resultou na inversão do elemento *fimS* para a posição “ON”. Estes resultados sugerem que a escassez de ferro é, provavelmente, uma condição estressante que induz a síntese de fímbrias tipo 1 em *K. pneumoniae*.

4.4 Caracterização do padrão de expressão dos genes fimbriais

Para os experimentos de PCR em tempo real foi utilizado cDNA sintetizado a partir de RNA total isolado de células de *K. pneumoniae* cultivadas em meio LB (condição controle), e de células isoladas após 30 minutos de incubação após adição de ferro (100 μ M de FeSO₄) ou 2,2'-dipiridil (100 μ M). A Figura 8 mostra o padrão de expressão dos genes *fimE*, *fimA* e *mrkA* nas condições repleta e em privação de ferro, quando comparadas ao padrão observado na condição controle.

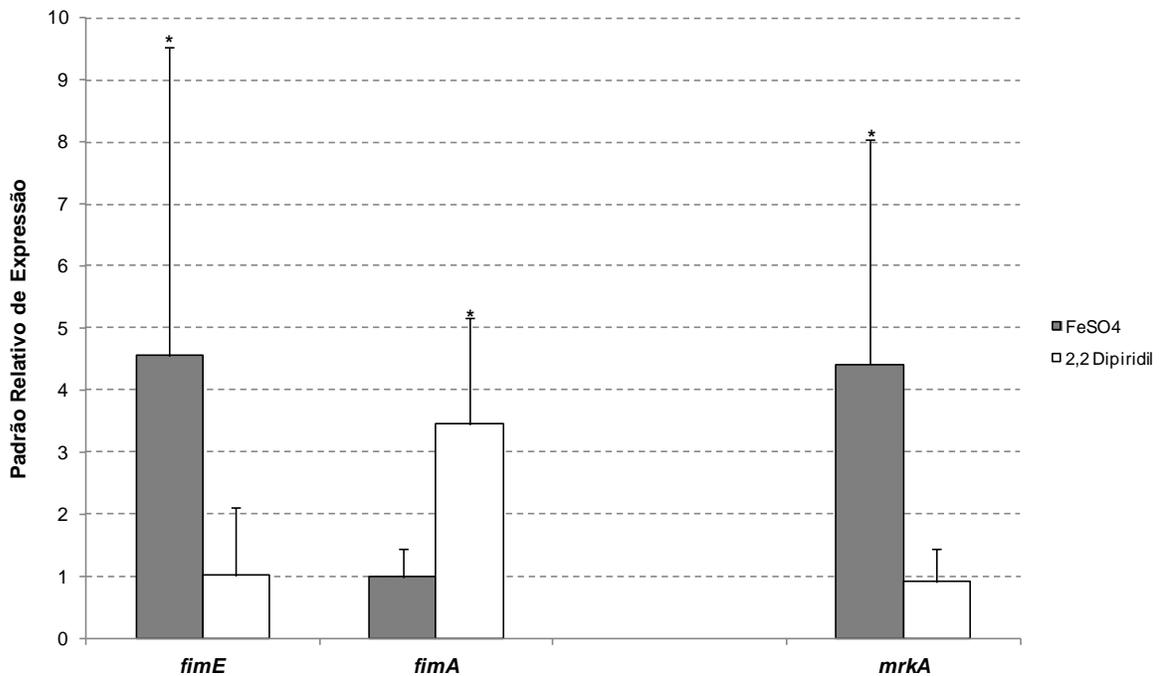


Figura 8. Padrão de expressão dos genes *fimE*, *fimA* e *mrkA* nas condições repleta (FeSO₄) e em privação de ferro (2,2'-dipiridil). Os dados são relativos ao padrão de expressão dos genes em células cultivadas na condição controle (meio LB). Os asteriscos indicam valores estatisticamente significativos (p -value < 0.05).

Com relação ao *cluster fim*, conforme mostra a Figura 8, os genes *fimA* e *fimE* apresentaram padrões de expressão opostos nas condições repleta e em escassez de ferro, quando comparado à condição controle: enquanto o gene *fimE* encontra-se induzido na condição repleta de ferro (4,5x, p -value de 0,03) e inalterado na condição

de escassez de ferro (1,01x, *p-value* de 0,477), o gene *fimA* encontra-se induzido na condição de escassez de ferro (3,45x, *p-value* de 0,002) e inalterado na condição repleta de ferro (0,98x, *p-value* de 0,344).

A DNA recombinase FimE, codificada pelo gene *fimE*, altera a orientação do elemento *fimS* da fase “ON” (região promotora posicionada imediatamente *upstream* ao *cluster fim*) para a fase “OFF” (região promotora distante do *cluster fim*). Após 30 minutos de incubação em condição de escassez de ferro a expressão do gene *fimE* permanece inalterado, resultando, assim, em indução da expressão do gene *fimA* nesta condição. Por outro lado, após 30 minutos de incubação na presença de ferro o gene *fimE* encontra-se induzido, porém o gene *fimA* permanece inalterado e não reprimido, como poderia ser esperado. Este resultado provavelmente ocorreu devido ao curto período de incubação na presença de ferro.

De fato, a frequência da variação de fase depende do gene e da espécie bacteriana envolvida, e pode ocorrer em uma célula, a cada 10^3 células, por geração (VAN DER WOUDE e BÄUMLER, 2004). Considerando um tempo de geração de 30 minutos para *Klebsiella pneumoniae*, a incubação por 30 minutos na presença de ferro foi suficiente para que se observasse a indução na expressão do gene *fimE*, mas não foi suficiente para que ocorresse a inversão da orientação do elemento *fimS*, catalisada pela recombinase FimE.

Com relação ao *cluster mrk*, como mostra a Figura 8, o gene *mrkA* encontra-se induzido na condição repleta de ferro (4,4x, *p-value* de 0,01) e inalterado na condição de escassez de ferro (0,90x, *p-value* de 0,330), quando comparado à condição controle.

Alguns relatos na literatura têm mostrado que o regulador Fur pode atuar não apenas como repressor, mas também como ativador da expressão de alguns genes alvos. Porém, enquanto que o mecanismo de repressão por Fur é um processo bem conhecido e caracterizado, os mecanismos de regulação positiva por este regulador ainda são pouco compreendidos.

A primeira evidência de interação entre Fur e a região promotora de genes ativados por ferro foi relatada por Delany e coautores (2001), que mostraram que em *Helicobacter pylori* o íon ferroso pode atuar como um indutor da expressão, e não como

correpressor como ocorre no mecanismo clássico de repressão do Fur. Segundo os autores, o íon ferroso pode diminuir a eficiência de ligação do Fur com a região promotora de determinados genes alvos. Desta forma os diferentes mecanismos de regulação, seja repressão ou indução, estariam associados a diferenças estruturais nas interações entre Fe^{2+} , Fur e as respectivas seqüências regulatórias. Também estudando *H. pylori*, Danielli e colegas (2006) mostraram que Fur age como um regulador positivo da transcrição de genes envolvidos com a motilidade e quimiotaxia, dois processos essenciais para a virulência desta bactéria, pois permite a colonização da mucosa gástrica.

Além dos resultados observados em *H. pylori*, a ação ativadora do regulador Fur também tem sido descrita em *Neisseria meningitidis* (GRIFANTINI et al., 2003; DELANY et al., 2004). Os resultados do trabalho de Delany e colaboradores (2004) demonstram que Fur atua como uma proteína ativadora que se liga diretamente à região promotora de alguns genes alvos, induzindo a transcrição desses genes.

As análises no PCR em tempo real apresentados neste trabalho revelaram indução da expressão dos genes *fimE* e *mrkA* quando *K. pneumoniae* é incubada na presença de ferro. Considerando que na região promotora desses genes foram identificados boxes Fur funcionais, os resultados parecem indicar que, na presença de ferro, o regulador Fur atua como ativador da expressão dos genes *fimE* e *mrkA*, e que neste caso o ferro atua como indutor da expressão, e não como correpressor como ocorre no mecanismo clássico de ação do Fur. No entanto, novos experimentos, como ensaios de transcrição *in vitro*, seriam necessários para comprovar tal hipótese.

4.5 Unidade transcricional dos genes que compõe os operons *fim* e *mrk*

Os genes que compõe o operon *fim* (genes *fimA_fimI_fimC_fimD_fimF_fimG_fimH_fimK*) são transcritos numa mesma unidade transcricional, assim como os genes que compõe operon *mrk* (genes *mrkA_mrkB_mrkC_mrkD_mrkF*), conforme pôde ser constatado pelas reações de amplificação por PCR das junções entre os genes (Figuras 9 e 10).

É importante ressaltar que este experimento não representa uma análise quantitativa dos níveis de transcritos nas condições testadas. No entanto, ao demonstrar que os genes dos operons *fim* e *mrk* são, em cada um dos operons, transcritos num único RNA policistrônico, é possível estender os resultados obtidos no PCR em tempo real para os genes *fimA* e *mrkA* a todos os genes que compõe os operons. Assim, em termos de níveis de transcritos é possível inferir que os genes que compõe o operon *fim*, encontram-se induzidos na condição de escassez de ferro e inalterados na condição repleta de ferro, quando comparados à condição controle. Da mesma maneira é possível inferir que os genes do operon *mrk* encontram-se induzidos na condição repleta de ferro e inalterados na condição de escassez de ferro, quando comparado à condição controle.

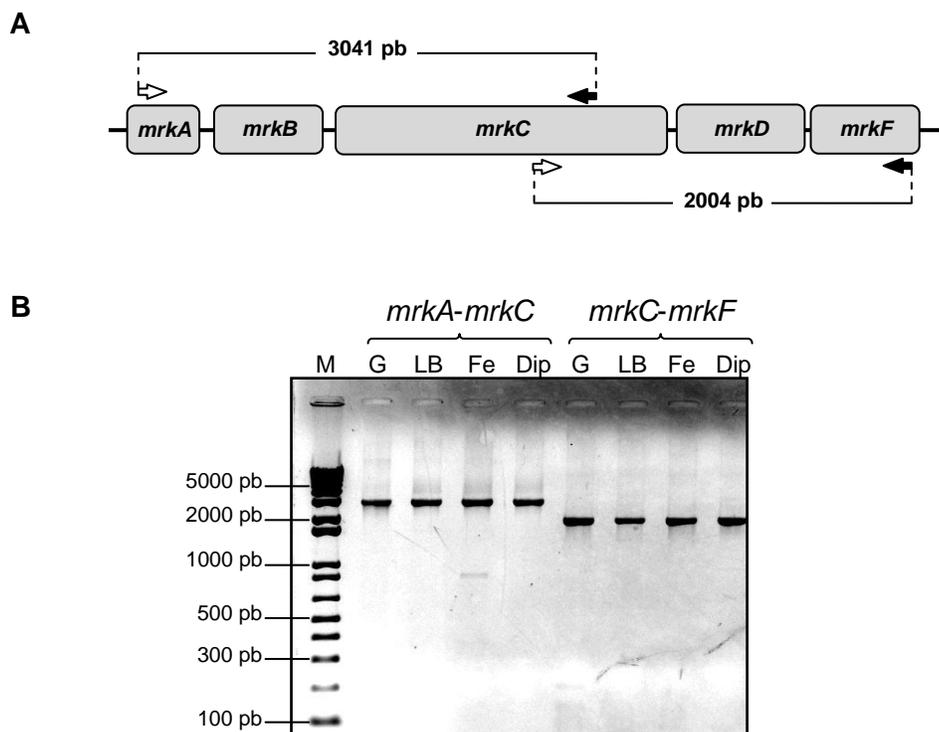


Figura 9. Representação esquemática e transcrição policistrônica dos genes que compõe o operon *mrk*. Em **A** estão representados os genes do operon *mrk*, a posição dos *primers sense* (setas brancas) e *antissense* (setas negras) utilizados nas reações de PCR, e o tamanho dos amplicons (em pares de bases) obtidos com os respectivos pares de *primers*. Em **B**, gel de agarose 0,8% mostrando os fragmentos gerados após as reações de PCR. As reações foram realizadas com DNA genômico isolado de *K. pneumoniae* (G), e com cDNAs obtidos de células cultivadas em meio LB (LB), e de células incubadas por 30 minutos em meio LB contendo ferro (Fe) e em meio LB contendo 2,2'-dipiridil (Dip). M, marcadores de peso molecular com os tamanhos em pares de bases (pb).

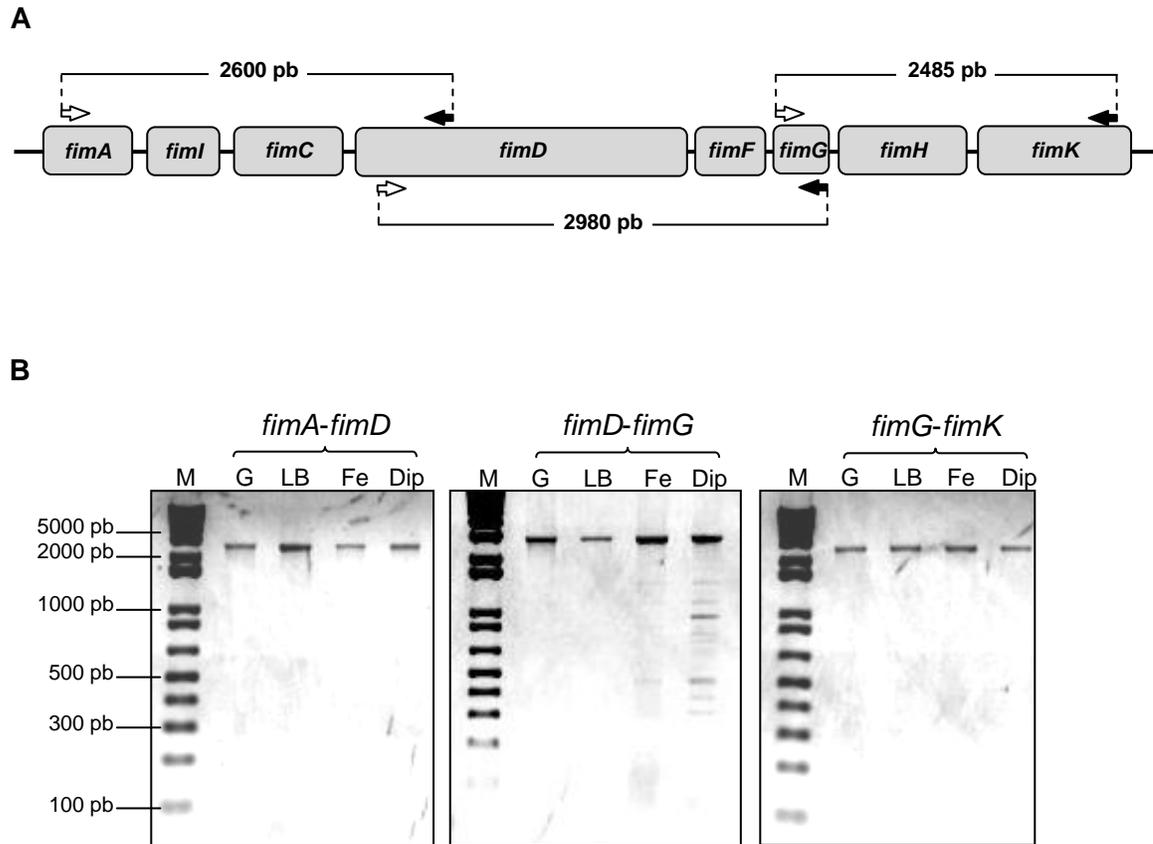


Figura 10. Representação esquemática e transcrição policistrônica dos genes que compõe o operon *fim*. Em **A** estão representados os genes do operon *fim*, a posição dos *primers sense* (setas brancas) e *antisense* (setas negras) utilizados nas reações de PCR, e o tamanho dos amplicons (em pares de bases) obtidos com os respectivos pares de *primers*. Em **B**, gel de agarose 0,8% mostrando os fragmentos gerados após as reações de PCR. As reações foram realizadas com DNA genômico isolado de *K. pneumoniae* (G), e com cDNAs obtidos de células cultivadas em meio LB (LB), e de células incubadas por 30 minutos em meio LB contendo ferro (Fe) e em meio LB contendo 2,2'-dipiridil (Dip). M, marcadores de peso molecular com os tamanhos em pares de bases (pb).

5. CONCLUSÕES

- Análises de bioinformática revelaram a presença de prováveis boxes Fur na região promotora do operon *mrk*, que codifica fímbrias do tipo 3, e do gene *fimE*, que codifica uma DNA recombinase que controla a expressão de fímbrias do tipo 1 pelo mecanismo de variação de fases.
- Os boxes Fur foram validados pelo ensaio FURTA, sugerindo que a expressão do gene *fimE* e do operon *mrk* é modulada pelo regulador Fur.
- Os genes *fimE* e *mrkA* apresentaram um padrão de expressão inalterado na presença de 2,2'-dipiridil e induzido na presença de ferro, ao passo que o gene *fimA* apresentou resultado inverso: inalterado na presença de ferro e induzido na presença de 2,2'-dipiridil. Estes resultados indicam que a disponibilidade de ferro modula a expressão dos genes fimbriais.
- A indução da expressão dos genes *fimE* e *mrkA* na presença de ferro parece indicar que o regulador Fur é um ativador da expressão desses genes e que neste caso o ferro atua como indutor da expressão e não como correpressor como ocorre no mecanismo clássico de ação do Fur.
- A orientação do elemento *fimS*, e portanto da região promotora do operon *fim*, varia dependendo do tempo de incubação, da disponibilidade de ferro no meio e se a cultura é estática ou sob agitação. A orientação é modulada para a posição “ON” somente quando *K. pneumoniae* é mantida em condições de privação de ferro (presença de 2,2'-dipiridil), sobretudo após 96 horas de incubação.
- Os resultados sugerem que a expressão das fímbrias tipo 1 pelo mecanismo de variação de fases é modulada pelo ferro por intermédio do regulador Fur, e que a escassez de ferro é uma condição estressante que induz a síntese de fímbrias tipo 1 em *Klebsiella pneumoniae*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.; ADAMS, C.; SCHULLY, N.; GLENNON, J., e O'GARA, F. A role for TonB1 in biofilm formation and quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 274, n. 2, p. 269-278, 2007.
- ABRAHAM, J.M.; FREITAG, C.S.; CLEMENTS, J.R., e EISENSESTEIN, B.I. An invertible element of DNA controls phase variation of type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 82, n. 17, p. 5724-5727, 1985.
- ALLEN, B.L.; GERLACH, G.F., e CLEGG, S. Nucleotide sequence and functions of *mrk* determinants necessary for expression of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*. **J. Bacteriol.**, v. 173, n. 2, p. 916-920, 1991.
- BALESTRINO, D.; GHIGO, M.; CHARBONNEL, N.; HAAGENSEN, J.A., e FORESTIER, C. The characterization of functions involved in the establishment and maturation of *Klebsiella pneumoniae* invitro biofilm reveals dual roles for surface exopolysaccharides. **Environ. Microbiol.**, v. 10, n. 3, p. 685-701, 2008.
- BANIN, E.; VASIL, M.L., e GREENBERG, E.P. Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. **Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.**, v.102, n. 31, p. 11076-11081, 2005.
- BENITE, A.M.C.; MACHADO, S.P., e MACHADO, B.C. Sideróforos: "Uma resposta dos microorganismos". **Quim. Nova**, v. 25, n. 6B, p. 1155-1164, 2002.
- BERNHARD, W.; GBARAH, A., e SHARON, N. Lectinophagocytosis of type 1 fimbriated (mannose-specific) *Escherichia coli* in the mouse peritoneum. **J. Leukoc. Biol.**, v. 52, n. 3, p. 343-348, 1992.
- CLARKE, T.E.; TARI, L.W., e VOGEL, H.J. Structural biology of bacterial iron uptake systems. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 1, n. 1, p. 7-30, 2001.
- CLEGG, S.; KORHONEN, T.K.; HORNICK, D.B., e TARKKANEN, A.M. Type 3 fimbriae of the Enterobacteriaceae. In: KLEMM, P. (Ed.). **Fimbriae: Adhesion, Genetics, Biogenesis, and Vaccines**, Boca Raton (FL): CRC Press, Chap. 6, p. 97-104, 1994.

- COLE, S.P.; HARWOOD, J.; LEE, R.; SHE, R., e GUINEY, D.G. Characterization of monospecies biofilm formation by *H. pylori*. **J. Bacteriol.**, v. 186, n.10, p. 3124-3132, 2004.
- CONNELL, I.; AGACE, W.; KLEMM, P.; SCHEMBRI, M.; MARILD, S., e SVANBORG, C. Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 93, n. 18, p. 9827-9832, 1996.
- DANIELLI, A.; RONCARATI, D.; DELANY, I.; CHIARINI, V.; RAPPUOLI, R., e SCARLATO, V. In vivo dissection of the *Helicobacter pylori* Fur regulatory circuit by genome-wide location analysis. **J. Bacteriol.**, v. 188, n. 13, p. 4654-4662, 2006.
- DAVIES, D.G.; PARSEK, M.R.; PEARSON, J.P.; IGLEWSKI, B.H.; COSTERTON, J.W., e GREENBERG, E.P. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science**, v. 280, n. 5361, p. 295-298, 1998.
- DELANY, I., SPOHN, G.; RAPPUOLI, R., E, SCARLATO, V. The Fur repressor controls transcription of iron-activated and -repressed genes in *Helicobacter pylori*. **Mol. Microbiol.**, v. 42, n. 5, p. 1297-1309, 2001.
- DELANY, I.; RAPPUOLI, R., e SCARLATO, V. Fur functions as an activator and as a repressor of putative virulence genes in *Neisseria meningitides*. **Mol. Microbiol.**, v. 52, n. 4, p. 1081-1090, 2004.
- DI MARTINO, P.; CAFFERINI, N.; JOLY, B., e DARFEUILLE-MICHAUD, A. *Klebsiella pneumoniae* type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. **Res. Microbiol.**, v. 154, n. 1, p. 9-16, 2003.
- DONLAN, R.M., e COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanism of clinically relevant microorganisms. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.
- DUNCAN, M.J.; MANN, E.L.; COHEN, M.S.; OFEK, I.; SHARON, N., e ABRAHAM, S. N. The distinct binding specificities exhibited by *enterobacterial* type 1 fimbriae are determined by their fimbrial shafts. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 45, p. 37707-37716, 2005.

- EL LABANY, S.; SOHANPAL, B.K.; LAHOOTI, M.; AKERMAN, R., e BLOMFIELD, I.C. Distant cis-active sequences and sialic acid control the expression of *fimB* in *Escherichia coli* K-12. **Mol. Microbiol.**, v. 49, n. 4, p. 1109-1118, 2003.
- ESCOBAR, A.M.U.; ROCHA, S.S.; SZTAJNBOK, S.; EISENCRAFT, A.P., e GRISI, S.J.F.E. Sepse por *Klebsiella pneumoniae* - Revisão de 28 casos. **J. Pediatr.**, v. 72, n. 4, p. 230-234: 1996.
- ESCOLAR, L.; PÉREZ-MARTÍN, J., e LORENZO, V. Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. **J. Bacteriol.**, v. 181, n. 20, p. 6223-6229, 1999.
- EWING, W.H. The genus *Escherichia*. in: **Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae**. 4th ed. New York: Elsevier Publishing Co., Inc., 1986. p. 67-107.
- FARMER, I.J., e KELLY, M.T. Enterobacteriaceae. In: Balows, A.; Hausler Jr, W. J.; Hermann K.L.; Isenberg, H.D.; Shadomy, H.H. (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology**, 5th ed., Washington: American Society for Microbiology, 1991, p. 360-366.
- FAVRE-BONTE, S.; JOLY, B., e FORESTIER, C. Consequences of reduction of *Klebsiella pneumoniae* capsule expression on interactions of this bacterium with epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 2, p. 554-561, 1999.
- FENG, L.; LIU, B.; LIU, Y.; RATINER, Y.A.; HU, B.; LI, D.; ZONG, X.; XIONG, W., e WANG, L.A. genomic islet mediates flagellar phase variation in *Escherichia coli* strains carrying the flagellin-specifying locus flk. **J. Bacteriol.**, v. 190, n. 13, p. 4470-4477, 2008.
- FERDELE, M.J., e BASSLER, B.L. Interspecies communication in bacteria. **J. Clin. Invest.**, v. 112, n. 9, p. 1291-1299, 2002.
- GRIFANTINI, R.; SEBASTIAN, S.; FRIGIMELICA, E.; DRAGHI, M.; BARTOLINI, E.; MUZZI, A.; RAPPUOLI, R.; GRANDI, G., e GENCO, C.A. Identification of iron-activated and -repressed Fur-dependent genes by transcriptome analysis of

- Neisseria meningitidis* group B. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 100, n. 16, p. 9542-9547, 2003.
- GUAM, L.L.; ONUKI, H., e KAMINO, K. Bacterial growth stimulation with exogenous siderophores and synthetic *N*-acyl homoserine lactone autoinducers under iron-limited and low-nutrient conditions. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n. 7, p. 2797-2803, 2000.
- HAMMER, B.K., e BASSLER, B.L. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. **Mol. Microbiol.**, v. 50, n. 1, p. 101-104, 2003.
- HORNICK, D.B.; ALLEN, B.L.; HORN, M.A., e CLEGG, S. Adherence to respiratory epithelia by recombinant *Escherichia coli* expressing *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbrial gene products. **Infect. Immun.**, v. 60, n. 4, p. 1577-1588, 1992.
- HUANG, Y.J.; LIAO, H.W.; WU, C.C., e PENG, H.L. *MrkF* is a component of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*. **Res. Microbiol.**, v. 160, n. 1, p. 71-79, 2009.
- JAGNOW, J., e CLEGG, S. *Klebsiella pneumoniae MrkD*-mediated biofilm formation on extracellular matrix- and collagen-coated surfaces. **Microbiology**, v. 149, n. 9, p. 2397-2405, 2003.
- JOHNSON A.W.; OSINUSI, K.; ADERELE, W.I., e ADEYEMI-DORO, F.A. Bacterial aetiology of acute lower respiratory infections in pre-school nigerian children and comparative predictive features of bacteraemic and non-bacteraemic illnesses. **J. Trop. Pediatr.**, v. 39, n. 2, p. 97-106, 1993.
- KEYNAN, Y., e RUBINSTEIN, E. The changing face of *Klebsiella pneumoniae* infections in the community. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 30, n. 5, p. 385-389, 2007.
- KLEMM, P. Two regulatory *fim* genes, *fimB* and *fimE*, control the phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. **EMBO J.**, v. 5, n. 6, p. 1389-1393, 1986.
- KLEMM, P., e SCHEMBRI, M.A. Bacterial adhesins: function and structure. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 290, n. 1, p. 27-35, 2000.

- KORHONEN, T.K.; TARKKA, E.; RANTA, H., e HAAHTELA, K. Type 3 fimbriae of *Klebsiella* sp.: molecular characterization and role in bacterial adhesion to plant roots. **J. Bacteriol.**, v. 155, n. 2, p.860-865, 1983.
- LANGERMANN, S.; PALASZYNSKI, S.; BARNHART, M.; AUGUSTE, G.; PINKNER, J.S.; BURLEIN, J.; BARREN, P.; KOENIG, S.; LEATH, S.; JONES, C.H., e HULTGREN, S.J. Prevention of mucosal *Escherichia coli* infection by *FimH*-adhesinbased systemic vaccination. **Science**, v. 276, n. 5312, p. 607-611, 1997.
- LANGSTRAAT, J.; BOHSE, M., e CLEGG, S. Type 3 fimbrial shaft (*MrkA*) of *Klebsiella pneumoniae*, but not the fimbrial adhesin (*MrkD*), facilitates biofilm formation. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 9, p. 5805-5812, 2001.
- LAWLOR, M.S.; HSU, J.; RICK, P.D., e MILLER, V.L. Identification of *Klebsiella pneumoniae* virulence determinants using an intranasal infection model. **Mol. Microbiol.**, v. 58, n. 4, p. 1054-1073, 2005.
- LAWLOR, M.S.; O'CONNOR, C., e MILLER, V. L. Yersiniabactin is a virulence factor for *Klebsiella pneumoniae* during pulmonary infection. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 3, p. 1463-1472, 2007.
- LEVY, I.; LEIBOVICI, L.; DRUCKER, M.; SAMRA, Z.; KONISBERGER, H., e ASHKENAZI, S. A. Prospective study of Gram-negative bacteremia in children. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 15, n. 2, p. 117-122, 1996.
- LEWENZA, S.; CONWAY, B.; GREENBERG, E.P., e SOKOL, P.A. Quorum sensing in *Burkholderia cepacia*: identification of the Lux RI homologs Cep RI. **J. Bacteriol.**, v. 181, n. 3, p. 748-756, 1999.
- LITWIN, C.M., e CALDERMOOD, S.B. Role of iron in regulation of virulence genes. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 6, n. 2, p. 137-149, 1993.
- LIVAK, K.J., e SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

- MACNAB, R.M. How bacteria assemble flagella. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 57, p. 77-100, 2003.
- MAH, T.F., e O'TOOLE, G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends Microbiol.**, v. 9, n. 1, p. 34-39, 2001.
- MATATOV, R.; GOLDHAR, J.; SKUTELSKY, E.; SECHTER, I.; PERRY, R.; PODSCHUN, R.; SAHLY, H.; THANKAVEL, K.; ABRAHAM, S.N., e OFEK, I. Inability of encapsulated *Klebsiella pneumoniae* to assemble functional type 1 fimbriae on their surface. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 179, n. 1, p. 123-130, 1999.
- MCCLAIN, M.S.; BLOMFIELD, I.C., e EISENSTEIN, B.I. Roles of *fimB* and *fimE* in site-specific DNA inversion associated with phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 173, n. 17, p. 5308-5314, 1991.
- HOLDEN, N.; TOTSIKA, M.; DIXON, L.; CATHERWOOD, K., e GALLY, D. Regulation of P-fimbrial phase variation frequencies in *Escherichia coli* CFT073. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 7, p. 3325-3334, 2007.
- O'TOOLE, G.A., e KOLTER, R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. **Mol. Microbiol.**, v. 28, n. 3, p. 449-461, 1998.
- O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B., e KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 54, p. 49-79, 2000.
- PATRIQUIN, G. M.; BANIN, E.; GILMOUR, C.; TUCHMAN, R.; GREENBERG, E. P., e POOLE, K. Influence of quorum sensing and iron on twitching motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.**, v. 190, n. 2, p. 662-671, 2008.
- PESSOA-SILVA, C.L.; RICHTMANN, R.; CALIL, R.; SANTOS, R.M.; COSTA, M.L.; FROTA, A.C., e WEY, S.B. Healthcare-associated infections among neonates in Brazil. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v. 25, n. 9, p. 772-777, 2004.
- PIZARRO-CERDÁ, J., e COSSART, P. Bacterial adhesion and entry into host cells. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 715-727, 2006.

- PODSCHUN, R., e ULLMANN U. *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, n. 4, p. 589-603, 1998.
- QUATRINI, R.; LEFIMIL, C.; VELOSO, F.A.; PEDROSO, I.; HOLMES, D.S., e JEDLICKI, E. Bioinformatic prediction and experimental verification of Fur-regulated genes in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Nucleic Acids Res.**, v. 35, n. 7, p. 2153-2166, 2007.
- RATINER, Y.A. Phase variation of the H antigen in *Escherichia coli* strain Bi7327-41, the standard strain for *Escherichia coli* flagellar antigen H3. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 15, n. 1, p. 33-36, 1982.
- RATINER, Y.A. Presence of two structural genes determining antigenically different phase-specific flagellins in some *Escherichia coli* strains. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 19, n. 1, p. 37-41, 1983.
- RATINER, Y.A. New flagellin-specifying genes in some *Escherichia coli* strains. **J. Bacteriol.**, v. 180, n. 4, p. 979-984, 1998.
- ROZEN, S., e SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods Mol. Biol.**, v. 132, p. 365–386, 2000.
- SAHLY, H.; PODSCHUN, R.; OELSCHLAEGER, T.A.; GREIWE, M.; PAROLIS, H.; HASTY, D.; KEKOW, J.; ULLMANN, U.; OFEK, I., e SELA, S. Capsule impedes adhesion to and invasion of epithelial cells by *Klebsiella pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 12, p. 6744-6749, 2000.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F., e MANIATIS, T. **Molecular cloning: A Laboratory Manual**. 2nd ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, v. 1-3, 1989.
- SCHNEIDER, T.D. Information content of individual genetic sequences. **J. Theor. Biol.**, v. 189, n. 4, p. 427-441, 1997.

- SCHROLL, C.; BARKEN, K.B.; KROGFELT, K.A., e STRUVE, C. Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. **BMC Microbiol.**, 10: 179, 2010.
- SHANKAR-SINHA, S.; VALENCIA, G.A.; JANES, B.K.; ROSENBERG, J.K.; WHITFIELD, C.; BENDER, R.A.; STANDIFORD, T.J., e YOUNGER, J.G. The *Klebsiella pneumoniae* O antigen contributes to bacteremia and lethality during murine pneumonia. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 3, p. 1423-1430, 2004.
- SINGH, P.K. Iron sequestration by human lactoferrin stimulates *P. aeruginosa* surface motility and blocks biofilm formation. **Biometals**, v. 17, n. 3, p. 267-270, 2004.
- STINTZI, A.; EVANS, K.; MEYER, J.M., e POOLE, K. Quorum sensing and siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: *lasR/lasI* mutants exhibit reduced pyoverdine biosynthesis. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 166, n. 2, p. 341-345, 1998.
- STOJILJKOVIC, I.; BAUMLER, A.J., e HANTKE, K. Fur regulon in gram-negative bacteria. Identification and characterization of new iron-regulated *Escherichia coli* genes by a fur titration assay. **J. Mol. Biol.**, v. 236, n. 2, p. 531-545, 1994.
- STRUVE, C.; FORESTIER, C., e KROGFELT, K.A. Application of a novel multi-screening signature-tagged mutagenesis assay for identification of *Klebsiella pneumoniae* genes essential in colonization and infection. **Microbiology**, v. 149, n. 1, p. 167-176, 2003.
- STRUVE, C.; BOJER, M., e KROGFELT, K.A. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. **Infect. Immun.**, v. 76, n. 9, p. 4055-4065, 2008.
- STRUVE, C.; BOJER, M., e KROGFELT, K.A. Identification of a conserved chromosomal region encoding *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae and assessment of the role of fimbriae in pathogenicity. **Infect. Immun.**, v. 77, n. 11, p. 5016-5024, 2009.
- TARKKANEN, A.M.; ALLEN, B.L.; WESTERLUND, B.; HOLTTHOFER, H.; KUUSELA, P.; RISTELI, L.; CLEGG, S., e KORHONEN, T.K. Type V collagen as the target for

- type-3 fimbriae, enterobacterial adherence organelles. **Mol. Microbiol.**, v. 4, n. 8, p. 1353-1361, 1990.
- TARKKANEN, A.M.; VIRKOLA, R.; CLEGG, S., e KORHONEN, T.K. Binding of the type 3 fimbriae of *Klebsiella pneumoniae* to human endothelial and urinary bladder cells. **Infect. Immun.**, v. 65, n. 4, p. 1546-1549, 1997.
- TOMINAGA, A. Characterization of six flagellin genes in the H3, H53 and H54 standard strains of *Escherichia coli*. **Genes Genet. Syst.**, v. 79, n. 1, p. 1-8, 2004.
- TOMINAGA, A., e KUTSUKAKE, K. Expressed and cryptic flagellin genes in the H44 and H55 type strains of *Escherichia coli*. **Genes Genet. Syst.**, v. 82, n. 1, p. 1-8, 2007.
- VALENSKI, M.L.; HARRIS, S.L.; SPEARS, P.A.; HORTON, J.R., e ORNDORFF, P.E. The product of the *fiml* gene is necessary for *Escherichia coli* type 1 pilus biosynthesis. **J. Bacteriol.**, v. 185, n. 16, p. 5007-5011, 2003.
- VAN DER WOUDE, M.W., e BÄUMLER, A.J. Phase and antigenic variation in bacteria. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 17, p. 581-611, 2004.
- WILLIAMS, P., e TOMAS, J. M. The pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae*. **Rev. Med. Microbiol.**, v. 1, p. 196-204, 1990.
- WU, C.C.; HUANG, Y.J.; FUNG, C.P., e PENG, H.L. Regulation of the *Klebsiella pneumoniae* *Kpc* fimbriae by the site-specific recombinase *Kpcl*. **Microbiology**, v. 156, n. 7, p. 1983-1992, 2010.
- ZIEG, J.; SILVERMAN, M.; HILMEM, M., e SIMON, M. Recombination switch for gene expression. **Science**, v. 196, p. 170-172, 1977.
- ZIEG, J., e SIMON, M. Analysis of the nucleotide sequence of an invertible controlling element. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 77, n. 7, p. 4196-4200. 1980.