

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SEQUÊNCIAS
REGULADORAS DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO FIMZ EM CLUSTER
GÊNICOS DE SÍNTESE DE FÍMBRIAS EM *KLEBSIELLA PNEUMONIAE***

**Identification and molecular characterization of regulatory sequences of the FimZ
transcriptional regulator in fimbrial gene cluster in *Klebsiella pneumoniae*.**

Priscila de Caritas Jamelli¹, Ana Érika Inacio Gomes²,
Prof. Dr. Lúcio Fábio Caldas Ferraz³.

RESUMO

Klebsiella pneumoniae é um patógeno oportunista Gram-negativo cujos principais sítios de infecção são os tratos gastrintestinal, respiratório e geniturinário, sendo uma das principais causas de infecções hospitalares. Componentes da parede celular são os principais fatores de virulência de *K. pneumoniae*, destacando-se a expressão de fímbrias adesivas. Estas fímbrias desempenham papel crucial na infecção do trato genitourinário, uma vez que promovem a adesão e invasão das bactérias nas células da bexiga. Dentre os genes que codificam reguladores da síntese de fímbrias em *K. pneumoniae* está o gene *fimZ*. No entanto, pouco se sabe sobre o papel do regulador FimZ na expressão de fímbrias em *K. pneumoniae*, e quais genes estão sob o controle deste regulador. Neste sentido, o presente estudo teve o objetivo de identificar, por análises de bioinformática, possíveis sequências de ligação do regulador FimZ nas regiões promotoras de *clusters* gênicos que codificam fímbrias em *Klebsiella pneumoniae*.

Palavras-chave: *Klebsiella pneumoniae*; Fatores de Transcrição; Fímbrias Bacterianas.

¹ Acadêmica de Biomedicina - USF, ² Co-orientadora, Mestra em Ciências da Saúde na área de Biologia Celular e Molecular - USF, ³ Orientador, Doutor em Genética e Biologia Molecular – UNICAMP, Prof. Auxiliar Doutor da Universidade São Francisco.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Klebsiella pneumoniae* e seus principais fatores de virulência

Klebsiella pneumoniae é uma bactéria Gram-negativa que pertence à família *Enterobacteriaceae*. Esta bactéria é considerada um patógeno oportunista, sendo que os principais sítios de infecção são as feridas cirúrgicas e os tratos gastrintestinal, respiratório e geniturinário (PODSCHUN & ULLMANN, 1998). *Klebsiella pneumoniae* é responsável por causar pneumonia e infecções do trato urinário (PODSCHUN & ULLMANN, 1998; KONEMAN, 2001), além de estar relacionada a infecções mais invasivas como meningite, endoftalmite, abscesso hepático e septicemia (WILLIAMS & TOMAS, 1990; FUNG et al., 2002; FUNG, LIN & LIN, 2012).

K. pneumoniae é uma das principais causadoras de infecções nosocomiais, ocorrendo sobretudo em indivíduos imunologicamente deprimidos (KOHAYAGAWA et al., 2009) e em indivíduos com alguns fatores de predisposição, tais como idade avançada, diabetes, doença respiratória, entre outras (LEVINSON & JAWETZ, 2005). Entre os casos mais comuns de infecção hospitalar por *K. pneumoniae* estão as infecções do trato respiratório, do trato urinário e septicemia (NOGUEIRA et al., 2009; BARROS et al., 2012).

Os principais fatores de virulência associados à patogenicidade de *K. pneumoniae* estão localizados na parede celular, destacando-se a produção de lipopolissacarídeos, cápsulas polissacarídicas, e a expressão de fímbrias adesivas (TARKKANEN et al., 1992; CORTES et al., 2002; LEE et al., 2006).

A cápsula polissacarídica e o lipopolissacarídeo conferem capacidade aos patógenos de se disseminar no hospedeiro, podendo causar sepse e atingir órgãos internos, inclusive no desenvolvimento de abscessos hepáticos piogênicos (CORTES et al., 2002; HSIEH et al., 2012). O lipopolissacarídeo (LPS), sobretudo com o antígeno do sorogrupo O1, confere resistência à ação bactericida do soro humano e está associado à colonização dos patógenos (HSIEH et al., 2012). A cápsula polissacarídica confere resistência ao sistema complemento (ÁLVAREZ et al., 2000), à fagocitose (DOMENICO et al., 1994), aos peptídeos antimicrobianos (CAMPOS et al., 2004) e aos fatores bactericidas presentes no soro (PODSCHUN et al., 1993). Linhagens de *K. pneumoniae* com sorotipos capsulares K1 e K2 apresentam maior resistência ao sistema

imune do hospedeiro, pois produzem uma elevada quantidade de mucopolissacarídeos que confere à bactéria um fenótipo de hipermucoviscosidade (HMV) (DOMENICO et al., 1994). Estas linhagens estão associadas a infecções severas e invasivas, como abscessos hepáticos piogênicos, septicemia e endoftalmite (FANG et al., 2004; LEE et al., 2006; WISKUR, HUNT & CALLEGAN, 2008).

Outro componente da parede celular essencial para a patogenicidade de *K. pneumoniae* é a fímbria adesiva. As fímbrias representam uma etapa crítica no processo infeccioso de *K. pneumoniae*, pois auxiliam no processo de adesão da bactéria às células hospedeiras (MATATOV et al., 1999; STRUVE, BOJER & KROGFELT, 2009). Além disso, as fímbrias, juntamente com a cápsula polissacarídica, promovem a aderência de *K. pneumoniae* também em superfícies abióticas, e estão envolvidas com a formação do biofilme (LANGSTRAAT, BOHSE & CLEGG, 2001; DI MARTINO et al., 2003; BODDICKER et al., 2006).

Dentre os *clusters* gênicos de expressão de fímbrias mais estudados em *Klebsiella pneumoniae* estão o *cluster mrK*, responsável pela síntese de fímbrias do tipo 3, e o *cluster* gênico *fim*, envolvido com a síntese de fímbrias do tipo 1. As fímbrias do tipo 3 promovem a aderência da bactéria em células epiteliais da traqueia, pulmão e rins (HORNICK et al., 1992; SEBGHATI et al., 1998), além de serem fundamentais no processo de formação de biofilme em superfícies bióticas e abióticas (SCHROLL et al., 2010). Estas fímbrias desempenham, portanto, um papel importante no desenvolvimento de infecções nosocomiais em pacientes cateterizados (STRUVE, BOJER & KROGFELT, 2009; MURPHY & CLEGG, 2012). Por outro lado, as fímbrias do tipo 1 são fundamentais para a infecção do trato genitourinário, pois promovem a adesão de *K. pneumoniae* em células uroteliais da bexiga (STRUVE, BOJER & KROGFELT, 2008). Além disso, as fímbrias tipo 1 também participam, juntamente com as fímbrias tipo 3, no processo de formação de biofilme.

1.2. Mecanismos de regulação da expressão de fímbrias tipo 1 em *Klebsiella pneumoniae*

Análise no genoma anotado de *Klebsiella pneumoniae* MGH 78578 (disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?LinkName=nuccore_gene&from_uid=152968582) revela a presença de pelo menos onze *clusters* gênicos

envolvidos com a síntese de fímbrias adesivas. Provavelmente em função dos múltiplos *clusters* gênicos de fímbrias, a regulação da expressão destas estruturas em *Klebsiella pneumoniae* é um mecanismo altamente intrincado que envolve a participação integrada de reguladores de transcrição, de proteínas que se ligam ao DNA, de um mecanismo de variação de fase, e até mesmo de níveis intracelulares de di-GMP e AMP cíclicos. Para uma revisão abrangente do assunto, vide Snyder e colaboradores (2005), Clegg, Wilson e Johnson (2011) e Schwan (2011).

Muito do que se conhece sobre regulação da expressão de fímbrias tipo 1 em *Enterobacteriaceae* advém de estudos com *Escherichia coli*. Os *clusters* gênicos de síntese de fímbrias de *K. pneumoniae* apresentam organização gênica similar à encontrada em *Escherichia coli* (CLEGG et al., 1985; STRUVE, BOJER & KROGFELT, 2008). Além disso, as fímbrias expressas por *K. pneumoniae* apresentam homologia com as fímbrias expressas por linhagens de *E. coli* uropatogênicas (GERLACH, CLEGG & ALLEN, 1989). Portanto, dada as semelhanças estrutural e organizacional, presume-se que muito dos mecanismos de regulação descritos em *E. coli* também sejam observados em *K. pneumoniae*.

Pelo menos três *clusters* gênicos de expressão de fímbrias tipo 1 podem ser identificados no genoma de *K. pneumoniae*, sendo o mais caracterizado deles o *cluster* gênico *fim*. O *cluster fim* é composto dos genes *fimA-I-C-D-F-G-H-K*, que codificam toda a estrutura proteica da fímbria tipo 1 de *K. pneumoniae*, formada das seguintes subunidades: a proteína FimA, que é a principal subunidade da fímbria, as proteínas FimF e FimG, que são as subunidades estruturais menores, a adesina FimH, que reconhece estruturas celulares que contém manose, e as proteínas FimC e FimD, respectivamente uma chaperona periplasmática e uma proteína de ancoragem na membrana externa (STRUVE, BOJER & KROGFELT, 2008). O papel do produto do gene *fimI* ainda é desconhecido e o gene *fimK* codifica um regulador transcricional.

Um dos mecanismos de regulação da expressão de fímbrias tipo 1 em *K. pneumoniae* é o mecanismo de variação de fase (VAN DER WOUDE & BÄUMLER, 2004). A região promotora do *cluster fim* está presente numa região denominada elemento *fimS*, que está localizado entre o gene *fimA*, primeiro gene do *cluster*, e os genes *fimB* e *fimE*, que codificam DNA recombinases. A orientação do elemento *fimS* pode sofrer inversões mediadas pelas recombinases FimE e FimB, num mecanismo conhecido por variação de fase (VAN DER WOUDE & BÄUMLER, 2004). De acordo

com a orientação, a região promotora pode ser posicionada imediatamente adjacente ao *cluster fim* (posição “on”), ativando a expressão das fímbrias; ou pode ser posicionada distante do *cluster fim* (posição “off”), levando à inativação da expressão.

Alguns fatores de transcrição também participam da regulação da expressão de fímbrias tipo 1 de forma indireta, ao modular a expressão dos genes *fimB* e *fimE*. Este é o caso, por exemplo, dos reguladores RpoS (DOVE, SMITH & DORMAN, 1997), HNS (O’GARA & DORMAN, 2000) e OmpR (RENTSCHLER et al., 2013). Estes reguladores se ligam à região promotora dos genes *fimB* ou *fimE* e, ao regular a expressão dessas recombinases, regulam de forma indiretamente a expressão do *cluster fim*.

Estudo conduzido em nosso laboratório mostrou que a expressão de fímbrias tipo 1 em *Klebsiella pneumoniae* também pode ser indiretamente modulada pelo regulador transcricional Fur (do inglês, *ferric uptake regulator*), por intermédio do ferro (MACIEL, 2012). Neste estudo foi identificada uma sequência consenso de ligação do regulador Fur na região promotora do gene *fimE*. O regulador Fur modula a expressão de genes-alvo quando complexado ao íon ferroso. Assim, os níveis de ferro encontrados no meio podem modular a expressão de fímbrias de modo indireto, ao regular a expressão da recombinase FimE (MACIEL, 2012).

A expressão de fímbrias tipo 1 em *Klebsiella pneumoniae* também pode ser regulada por fatores de transcrição que se ligam diretamente na região promotora do *cluster fim*. Um desses fatores é o regulador FimK, codificado pelo gene homônimo. O gene *fimK* está ausente em *E. coli* e é encontrado somente no *cluster fim* de *K. pneumoniae*. Segundo Rosen e colegas (2008), o regulador FimK atua como um fator inibidor da expressão de fímbrias e da formação de biofilme e apresenta um papel na expressão não apenas de fímbrias, mas de outros fatores de virulência de *K. pneumoniae* envolvidos com a infecção do trato urogenital.

Em *K. pneumoniae* o gene *fimZ* está localizado próximo a um *cluster* gênico de síntese de fímbrias ainda não caracterizado (WU et al., 2009). Este *cluster* gênico é composto de genes presentes nos loci KPN_02983 a KPN_02990 no genoma de *Klebsiella pneumoniae* MGH 78578. No entanto, diferentemente do regulador FimK, cujo papel na expressão de fímbrias tipo 1 está estabelecido em *K. pneumoniae*, FimZ é tão somente um potencial regulador da expressão de fímbrias tipo 1 em *K. pneumoniae*,

pois ainda são escassos os estudos de caracterização do papel deste regulador na síntese de fímbrias e na formação de biofilme.

Dentre os membros da família *Enterobacteriaceae*, é em *Salmonella enterica* serovar Typhimurium que o papel de FimZ na regulação da expressão de fímbrias tipo 1 está bem mais caracterizado.

O mecanismo de regulação de síntese de fímbrias em *S. enterica* serovar Typhimurium difere substancialmente do que ocorre em *E. coli*, apesar da homologia entre os genes *fim* nestas duas bactérias. A região promotora do cluster *fim* de *S. enterica* não é uma sequência de DNA com inversão reversível, como ocorre com o elemento *fimS* de *E. coli* (CLEGG, HANCOX & YEH, 1996). Além disso, *S. enterica* não possui homólogos das enzimas DNA recombinases FimE e FimB, responsáveis por catalisar a inversão de *fimS*. A expressão do cluster *fim* em *S. enterica* é modulada por reguladores codificados pelos genes *fimZ*, *fimY* e *fimW*. FimZ é um regulador que ativa a expressão do cluster *fim* ao se ligar na região promotora do gene *fimA* (YEH, TINKER & CLEGG, 2002), ao passo que FimY e FimW atuam respectivamente como coativador e repressor por meio de interações proteína-proteína com FimZ (TINKER & CLEGG, 2000; TINKER, HANCOX & CLEGG, 2001). Recentemente Wang e colegas (2014) demonstraram que o regulador FimY se liga na região promotora do gene *fimZ*, ativando-o. Os autores mostraram ainda que o complexo FimY-FimZ regula a expressão de outros genes fimbriais.

De acordo com Yeh, Tinker e Clegg (2002), o sítio de ligação do regulador FimZ na região promotora do gene *fimA* está localizado entre os nucleotídeos -50 a -100 a montante do sítio de início de transcrição do gene. Segundo aqueles autores, o sítio de ligação é composto de duas repetições em tandem composta por 7 nucleotídeos, sendo que FimZ se liga em pelo menos uma das repetições. Ainda de acordo com os autores, pelo menos 1 cópia da repetição de 7 nucleotídeos é encontrada na região promotora do gene *fimZ*, indicando que FimZ regula não apenas o cluster *fim*, mas também a expressão de seu próprio gene. No que concerne à *Klebsiella pneumoniae*, pouco se sabe sobre os genes que são regulados pelo FimZ e qual a sequência nucleotídica de ligação deste regulador, na região promotora dos genes alvos.

2. JUSTIFICATIVA

Klebsiella pneumoniae é um patógeno oportunista responsável por infecções nos tratos gastrointestinal, respiratório e geniturinário, sendo uma das principais causas de infecções hospitalares. Dentre os fatores de virulência de *K. pneumoniae* destacam-se as fímbrias adesivas, que desempenham um papel crucial na infecção do trato urinário, sobretudo ao promover a adesão e invasão das bactérias nas células uroteliais da bexiga. No entanto, os mecanismos que regulam a expressão deste fator de virulência em *K. pneumoniae* ainda são pouco compreendidos.

Um dos possíveis reguladores da expressão de fímbrias em *Klebsiella pneumoniae* é o regulador transcricional FimZ. No entanto, ao contrário dos estudos que mostram uma ação positiva de FimZ na expressão de fímbrias tipo 1 em outras bactérias, pouco se sabe sobre o papel do FimZ em *K. pneumoniae*.

A caracterização do regulador FimZ e dos genes que estão sob seu controle permitirá compreender se este regulador também está envolvido na regulação da expressão de fímbrias em *K. pneumoniae*, e se também está relacionado às infecções causadas por esta bactéria.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

O presente trabalho teve como objetivo identificar possíveis sítios de ligação do regulador transcricional FimZ na região promotora de genes que codificam fímbrias em *Klebsiella pneumoniae*.

3.2. Objetivos específicos:

1. Identificar, por meio de análises de bioinformática, possíveis sequências de ligação do regulador FimZ nas regiões promotoras do gene *fimZ* e de *clusters* gênicos que codificam fímbrias;
 - 1.1. Utilizar a sequência consenso do regulador FimZ de *S. enterica* para identificar sítios de ligação de FimZ no genoma de *K. pneumoniae*;
 - 1.2. Empregar o programa STRING para identificar genes possivelmente regulados por FimZ;

2. Confirmar a ligação da proteína FimZ nas sequências identificadas, por meio da técnica do EMSA (do inglês *Electrophoretic Mobility Shift Assay*).

4. METODOLOGIA

4.1. Cultivo de *Klebsiella pneumoniae* e extração de DNA genômico

Para este estudo foi utilizada a linhagem *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031. As bactérias foram crescidas a 37 °C em meio LB líquido. DNA genômico da bactéria foi extraído por meio do kit *Wizard® Genomic DNA purification Kit* (Promega). Ao final do processo de extração, o DNA isolado foi checado em eletroforese em gel de agarose, quantificado em espectrofotômetro e utilizado em experimentos de amplificação por PCR.

4.2. Identificação de possíveis sequências regulatórias de FimZ

Para a identificação de possíveis sítios de ligação do regulador FimZ de *K. pneumoniae* foi utilizada a sequência consenso do regulador FimZ de *Salmonella enterica* descrita por Yeh, Tinker e Clegg (2002). Esta sequência consenso foi utilizada na busca por prováveis sítios de ligação do regulador FimZ na região promotora do gene *fimZ* e de *clusters* gênicos que codificam fímbrias em *K. pneumoniae*.

Além disso, foi utilizado o programa *STRING – Functional Protein Association Networks* (<http://string-db.org/>) para a identificação de possíveis genes que interagem e são regulados por FimZ em *K. pneumoniae*. A sequência consenso do regulador FimZ de *Salmonella enterica* foi utilizada para uma busca por prováveis sítios de ligação na região promotora destes genes.

Todas as possíveis sequências identificadas foram utilizadas na construção da sequência consenso do regulador FimZ de *K. pneumoniae*, por meio do programa *WEBLOGO* (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>).

Estas análises de bioinformática foram conduzidas a partir do genoma de *Klebsiella pneumoniae* anotado no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), e a identificação de sequências homólogas foi realizada usando o programa *BLAST* do NCBI. Uma vez identificado algum provável sítio de ligação, oligonucleotídeos sense e antissense contendo a sequência nucleotídica deste sítio foram

desenhados e anelados entre si, para a obtenção de sondas dupla fita. Estas sondas serão marcadas com biotina, para serem utilizadas nos experimentos de EMSA.

4.3. Análise por EMSA

A técnica de EMSA (do inglês *Electrophoresis Mobility Shift Assay*) será empregada com o objetivo de validar os prováveis sítios de ligação do regulador FimZ, identificadas na região promotora dos *clusters* gênicos que codificam fímbrias. Para esta análise serão utilizados o regulador FimZ purificado de *K. pneumoniae* e sondas dupla fita contendo a sequência nucleotídica dos prováveis sítios de ligação.

O regulador FimZ de *K. pneumoniae* foi obtido por meio da clonagem do gene *fimZ* no vetor de expressão *pET-28a* (Novagen). O gene *fimZ* de *K. pneumoniae* foi amplificado por PCR a partir de DNA genômico isolado conforme descrito no item 4.1. Tanto o gene *fimZ* amplificado quanto o vetor foram digeridos com as enzimas de restrição *XhoI* e *NdeI* (Fermentas) e, em seguida, purificados por meio da excisão de bandas em gel de agarose, utilizando-se o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). Por fim, o gene *fimZ* foi clonado no vetor *pET-28a* por meio de reação de ligação com a enzima *T4 DNA ligase* (New England Biolabs). Células de *E. coli* DH5 α foram transformadas com o vetor recombinante *pET-28a+fimZ*, e clones recombinantes foram obtidos por meio de *minipreps* com o kit *Wizard Plus SV Minipreps* (Promega).

Para a expressão e purificação do regulador FimZ de *K. pneumoniae* será utilizada a linhagem de *E. coli* BL21(DE3) transformada com o vetor recombinante *pET-28a+fimZ*. Células BL21(DE3) recombinantes serão cultivadas em meio LB líquido a 37°C e 250 r.p.m., e a expressão do gene *fimZ* será induzida após a adição de 1 mM de IPTG (concentração final) e incubação da cultura por 4 horas. Após este período, as células serão coletadas e lisadas com o kit *Cellytic™ Express Tablets* (Sigma-Aldrich) para a obtenção das proteínas totais. A purificação da proteína FimZ será realizada com o auxílio do kit *His-Select Nickel Affinity Gel* (Sigma-Aldrich), seguindo recomendações do fabricante. Por fim, a qualidade da proteína FimZ será analisada em gel SDS-PAGE e a concentração da proteína será determinada pelo método de Bradford.

As sondas dupla fita serão geradas a partir do anelamento de oligonucleotídeos (fitas sense e antisense) contendo a sequência nucleotídica dos prováveis sítios de ligação do FimZ. As sondas dupla fita serão marcadas com biotina com o auxílio do kit *Biotin 3' End DNA Labeling Kit* (Pierce/Thermo Scientific).

Para a realização do EMSA será utilizado o kit *LightShift Chemiluminescent EMSA Kit* (Pierce/Thermo Scientific), e os resultados serão visualizados após detecção com o kit *Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module* (Pierce/Thermo Scientific) seguido de exposição das membranas em filme raio-X e revelação dos filmes, segundo as recomendações do fabricante.

4.4. Técnicas básicas de biologia molecular

As técnicas básicas de biologia molecular como, por exemplo, eletroforese de ácidos nucleicos, digestão enzimática do DNA, clonagens, e etc, serão realizadas conforme Sambrook e Russel (2001).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Identificação de sequências regulatórias de FimZ em *K. pneumoniae*

A identificação de possíveis sítios de ligação do regulador FimZ de *K. pneumoniae* foi realizada por meio de análises de bioinformática. Para tal, foi utilizada a sequência consenso do regulador FimZ de *Salmonella entérica*, conforme descrito por Yeh, Tinker e Clegg (2002). De acordo com estes autores, o sítio de ligação do regulador FimZ na região promotora do gene *fimA* de *S. enterica* está localizado entre os nucleotídeos -50 a -100 a montante do sítio de início de transcrição do gene e é composto de duas sequências idênticas de 7 nucleotídeos e repetidas em tandem. Esta sequência consenso foi, então, utilizada para a busca de sequências similares na região promotora do gene *fimA*, do *cluster* gênico *fim* de *K. pneumoniae*. A Figura 1 ilustra o provável sítio de ligação de FimZ identificado nesta região.

tgtgcagagccggcagccggaccactcggCTGAAATCTGAAATgacctggaaggca
 caacggctgccaatccggttcggttatttcgacatcggttcaaaggaaaacagtATG

Figura 1. Região promotora do gene *fimA* (*cluster fim*), mostrando o códon de início ATG (em verde) e as sequências de 7 nucleotídeos (em azul e amarelo), dispostas como uma repetição em tandem (setas acima das sequências).

O provável sítio de ligação de FimZ identificado no gene *fimA* de *K. pneumoniae* é composto de uma sequência repetitiva direta, de 7 nucleotídeos e localizada a 64 nucleotídeos a montante do códon iniciador do gene *fimA* do *cluster fim* de *K. pneumoniae*. As características desta sequência (repetição em tandem, números de nucleotídeos que a compõe e localização) vai de encontro ao descrito por Yeh, Tinker e Clegg (2002). Apesar de este ser um resultado inédito na literatura, até o presente momento não se sabe se esta sequência repetitiva é realmente um sítio de ligação de FimZ.

Para a identificação de outros genes possivelmente regulados por FimZ, foi realizada uma análise no programa *STRING – Functional Protein Association Networks*. Este programa revela as interações conhecidas e preditas do regulador FimZ com outras proteínas de *K. pneumoniae*.

Conforme mostra a Figura 2, o programa *STRING* indicou que FimZ interage com genes do próprio *cluster* gênico de *fimZ* (loci KPN_02984, KPN_02985 e KPN_02986), além de outros loci gênicos (loci KPN_01341 e KPN_02252, e genes *ynfA* e *yrfB*).

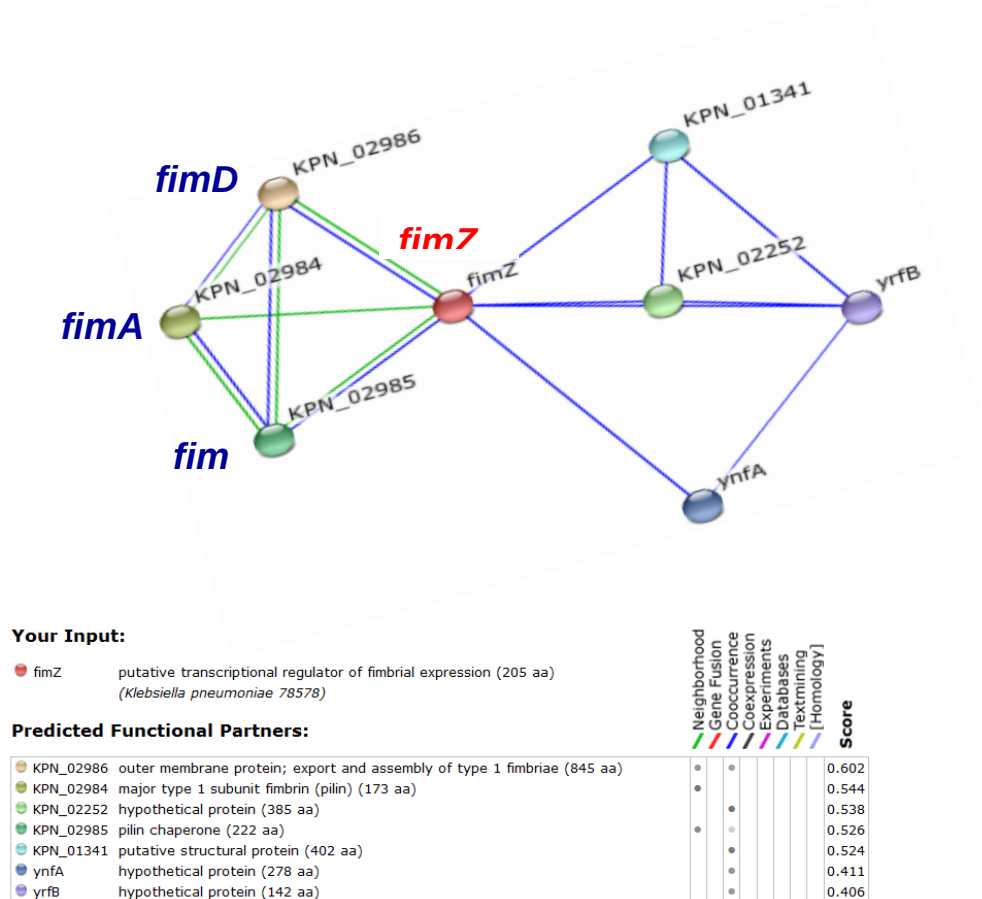


Figura 2. Análise no programa STRING, indicando as interações do regulador FimZ com loci gênicos de *Klebsiella pneumoniae*.

A sequência identificada na região promotora do gene *fimA* (Figura 1) foi, então, utilizada para a busca de prováveis sítios de ligação do FimZ nos genes identificados no programa STRING; ou seja, na região promotora dos genes que compõe o *cluster* gênico de *fimZ* (loci KPN_02983 a KPN_02986) e na região promotora dos outros loci gênicos identificados.

A Figura 3 mostra que a região promotora do gene *fimZ* apresenta uma sequência de 7 nucleotídeos bastante similar àquelas identificadas na região promotora de *fimA*. Esta sequência está localizada a 146 nucleotídeos a montante do sítio de início de transcrição do gene *fimZ*. No entanto, a sequência identificada no gene *fimZ* difere da sequência encontrada no gene *fimA* em apenas 1 base nucleotídica: no gene *fimA* está presente a sequência CTGAAAT, enquanto que no gene *fimZ* está presente a sequência CTTAAAT (o grifo identifica a base nucleotídica discordante). Além disso, no gene *fimZ* foi encontrada apenas uma cópia da sequência de 7 nucleotídeos; ou seja, a sequência não está disposta como uma repetição em tandem (Figura 3).

tagttgaat **CTTAAAT**tataaccctctgattaataagtaaaaacacttcatgcaa
 caactttcgtaggatttttctaataatgatcgtgcttatcatcttatttactcccct
 cctctccagcagtaataacttgggttacagaagcagtggtataaggaaatacatt **ATG**

Figura 3. Região promotora do gene *fimZ*, mostrando o códon ATG (em verde) e a provável sequência nucleotídica única de ligação do regulador FimZ (em azul).

Yeh, Tinker e Clegg (2002) também identificaram apenas uma cópia da repetição de 7 nucleotídeos na região promotora do gene *fimZ* de *S. enterica*, mais precisamente a 352 nucleotídeos a montante do sítio de início de transcrição do gene *fimZ*. Em razão desta longa distância, os autores sugerem que esta sequência talvez seja um elemento acentuador da transcrição do gene *fimZ*. Os autores concluem que em *S. enterica* o regulador FimZ regula não apenas o cluster *fim*, mas também a expressão de seu próprio gene. É possível que isto também ocorra em *K. pneumoniae*, dadas as semelhanças das sequências encontradas na região promotora do gene *fimZ* de *S. enterica* e de *K. pneumoniae*.

As análises no programa STRING indicaram outros genes *cluster* gênico de *fimZ* possivelmente regulados por FimZ, tais como os genes do loci KPN_02984, KPN_02985 e KPN_02986 (Figura 2). De fato, sequência nucleotídica similar à observada no gene *fimZ* foi encontrada na região promotora do gene *fimA* (loci gênico KPN_02984), que codifica uma pilina (a subunidade *major* das fímbrias do tipo 1) e do gene *fimD* (loci gênico KPN_02986), que codifica uma proteína de membrana externa responsável pela exportação e montagem da fímbria do tipo 1). Como ilustra a Figura 4A, o provável sítio de ligação do regulador FimZ está localizado a 14 nucleotídeos a montante do sítio ATG do gene *fimA*. A Figura 4B mostra que o sítio de ligação de FimZ está localizado a 76 nucleotídeos a montante do sítio ATG do gene *fimD*.

No entanto, as sequências identificadas nos genes *fimA* e *fimD* diferem da sequência encontrada no gene *fimA* do cluster *fim* em apenas 1 base nucleotídica: no gene *fimA* está presente a sequência **CT**GAAAT (Figura 1), enquanto que nos genes *fimA* e *fimD* está presente a sequência **A**TGAAAT (o grifo identifica a base nucleotídica

discordante). Assim como o observado no gene *fimZ*, apenas uma cópia da sequência de 7 nucleotídeos foi encontrada na região promotora dos genes *fimA* e *fimD*; ou seja, a sequência não está disposta como uma repetição em tandem (Figura 3).



Figura 4. Região promotora do gene *fimA* (A) e do gene *fimD* (B), mostrando a provável sequência nucleotídica única de ligação do regulador FimZ (em azul). O códon ATG está indicado em verde.

A partir de todas as sequências identificadas foi possível deduzir uma provável sequência consenso do regulador FimZ de *K. pneumoniae*, por meio do programa WEBLOGO. A Tabela 1 mostra as sequências identificadas e a provável sequência consenso.

Tabela 1. Possíveis sequências de ligação do regulador FimZ, identificadas em genes que codificam fímbrias em *K. pneumoniae*. Abaixo da Tabela está representado o logo da provável sequência consenso (conforme WEBLOGO).

Gene	Sequência identificada
<i>fimA</i> (cluster <i>fim</i>)	CTGAAAT
<i>fimZ</i> (cluster <i>fimZ</i>)	CTTAAAT
<i>fimA</i> (cluster <i>fimZ</i>)	ATGAAAT
<i>fimD</i> (cluster <i>fimZ</i>)	ATGAAAT
Sequência consenso (<i>K. pneumoniae</i>)	aTgAAAT



Os demais genes (*ynfA* e *yrfB*) loci gênicos (loci KPN_01341 e KPN_02252) identificados no programa STRING não apresentaram, em sua região promotora, possíveis sítios de ligação do regulador FimZ. Estas regiões estão sendo reavaliadas, utilizando variações em apenas 1 nucleotídeo da sequência consenso definida na Tabela 1.

5.2. Análise por EMSA

Inicialmente foi realizada a extração do DNA genômico de *K. pneumoniae* ATCC 10031, e a confirmação do DNA genômico como sendo desta bactéria. A Figura 5 mostra o DNA extraído (Fig. 5A) e amplificação do gene 16S de *K. pneumoniae* (Fig. 5B).

Este DNA genômico extraído foi então utilizado para a amplificação do gene *fimZ* de *K. pneumoniae* (Figura 6). Como esta amplificação apresentou bandas inespecíficas (Fig. 6A), foi necessário a excisão e purificação da banda de 721 pares de bases correspondente ao gene *fimZ* com o kit Wizard SV gel PCR-Clean Up System (Fig. 6B).

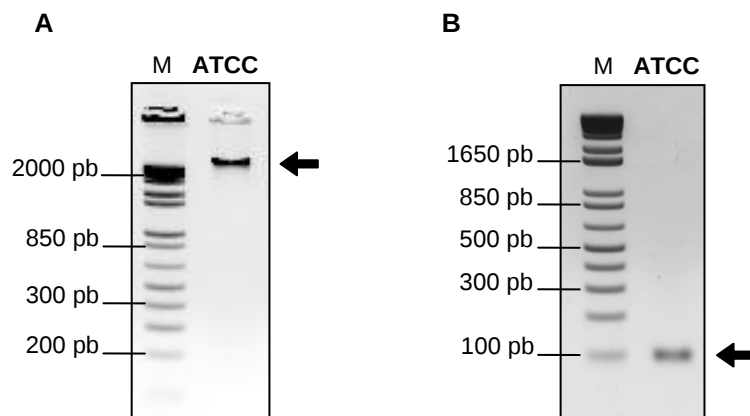


Figura 5. Em **A**, o DNA genômico extraído de *K. pneumoniae* ATCC 10031 (seta). Em **B**, a amplificação do gene *16S* *K. pneumoniae* (seta, 96 pares de bases), confirmando se tratar de DNA genômico desta bactéria. M, marcador de peso molecular.

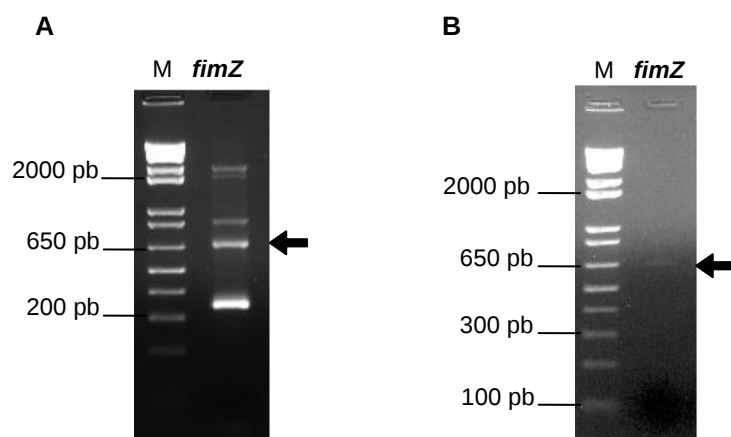


Figura 6. Em **A**, amplificação do gene *fimZ* (seta) e a presença de bandas inespecíficas. Em **B**, apenas o amplicon do gene *fimZ*, após a purificação do gel. M, marcador de peso molecular.

A etapa seguinte envolveu a digestão do gene *fimZ* amplificado e do vetor de expressão *pET-28a* com as enzimas de restrição *Nde* I e *Xho* I. Desta forma, tanto o gene quanto o vetor apresentaram extremidades coesivas, o que facilitou a reação de ligação e clonagem do gene no vetor. A Figura 7 mostra o vetor *pET-28a* antes (Fig. 7A) e após (Fig. 7B) a digestão e purificação por excisão da banda do gel de agarose.

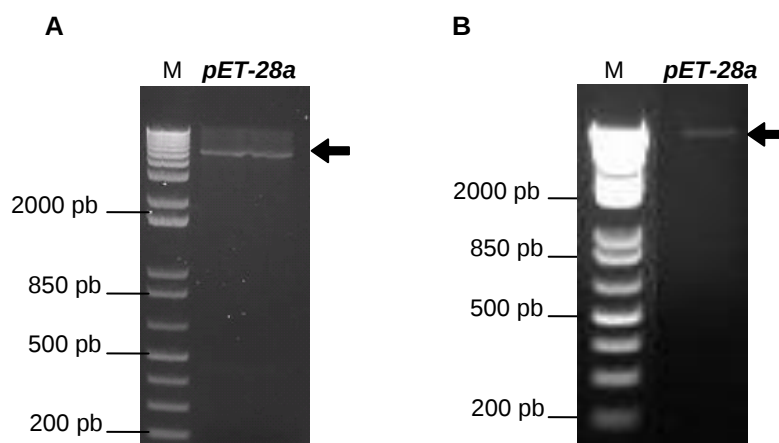


Figura 7. Vetor *pET-28a* antes (A) e após (B) a digestão e purificação por excisão da banda do gel de agarose. M, marcador de peso molecular.

Após a clonagem do gene *fimZ* no vetor *pET-28a*, o vetor recombinante (recombinante *pET-28a+fimZ*) foi utilizado na transformação de células de *E. coli* DH5 α . As células DH5 α transformadas foram então utilizadas para a obtenção de clones dos vetores recombinantes, por meio de *minipreps* com o kit *Wizard Plus SV Minipreps*. A Figura 8 mostra a obtenção dos vetores recombinantes de duas células DH5 α transformadas.

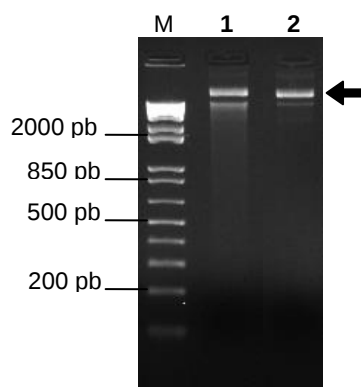


Figura 8. Minipreps do vetor recombinante *pET-28a+fimZ*, a partir das colônias 1 e 2 de DH5 α transformadas. M, marcador de peso molecular.

Os clones recombinantes foram utilizados para a transformação da linhagem de *E. coli* BL21(DE3). O regulador FimZ será expresso e purificado a partir das células

BL21(DE3) transformadas. As células transformadas foram cultivadas em meio LB líquido 37°C e 200 r.p.m. até obtenção de uma D.O. (densidade observada) de 0,6nm, ao atingir foi adicionado IPTG ao inóculo e este incubado por mais 4 horas. Após este período as células foram coletadas e lisadas pelo kit *CellyticTM Express Tablets* (Sigma-Aldrich).

Com a proteína total já obtida, partimos para a purificação deste material utilizando o kit *His-Select Nickel Affinity Gel* (Sigma-Aldrich), o protocolo aplicado foi o fornecido pelo fabricante. As lavagens propostas no protocolo foram coletadas em momentos diferentes gerando três alíquotas da proteína fimZ. Com a proteína purificada, as três alíquotas passaram pelo processo de diálise com o kit *Snake Skin Dialyses Tubing* (Thermo Scientific).

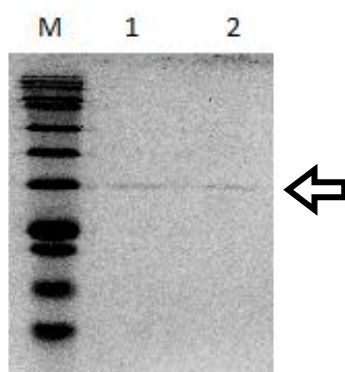


Figura 9. Proteína FimZ purificada antes (1) e após (2) a diálise. A seta indica a proteína purificada. M representa o marcador de peso molecular.

As sondas dupla fita foram geradas a partir do anelamento de oligonucleotídeos (fita sense e antisense) contendo a sequência nucleotídica dos prováveis sítios de ligação do FimZ.

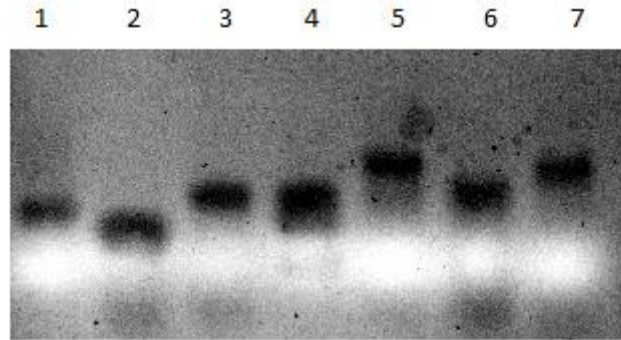


Figura 10. Em 2 e 7 vemos as fitas simples dos oligonucleotídeos respectivamente, bFZ-ecpA contendo 31 pb, e bFimZ-Salmod contendo 44 pb. Os demais são oligonucleotídeos anelados seguindo: boxFimZ (1), bFZ-ecpA (3), ecpR-FUR (4), bFimZ-Sal (5), bFimZ-Salmod (7).

As anáises dos oligonucleotídeos anelados frente as fitas simples nos mostraram que o anelamento entre as fitas sense e antisense ocorreram de fato. O passo seguinte foi a efetuação do EMSA. A **figura 11** nos mostra a confirmação da interação do regulador FimZ na região promotora dos genes *fimA* de *S. enterica* e *fimA* e *ecpA* de *K.pneumoniae*.

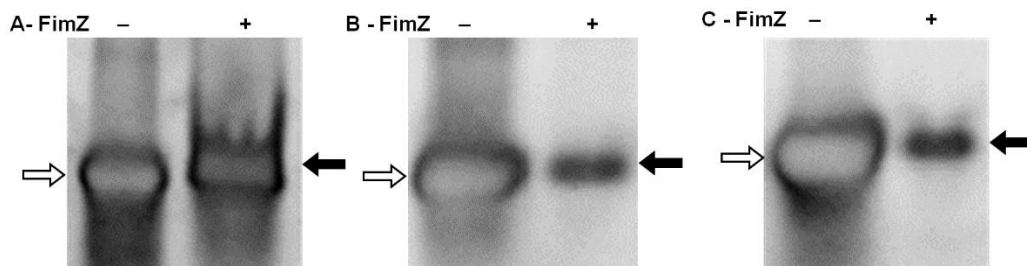


Figura 11. Ensaio EMSA realizado na ausência (–) e na presença (+) da proteína FimZ purificada e com as sondas do gene *fimA* de *S. enterica* (**Fig. 11A**) e dos genes *fimA* (**Fig. 11B**) e *ecpA* (**Fig. 11C**) de *K. pneumoniae*. As setas brancas indicam a sonda somente, enquanto que as setas pretas indicam formação do complexo sonda + FimZ e o *shift* da banda.

6. CONCLUSÃO

Este estudo pretendeu aplicar análises de bioinformática na identificação de possíveis sítios de ligação do regulador transcricional FimZ na região promotora de genes que codificam fímbrias em *Klebsiella pneumoniae*. O estudo pretendeu, ainda, validar os sítios identificados por meio da técnica de EMSA. As análises de bioinformática aplicadas neste projeto permitiu a identificação de possíveis sítios de ligação do regulador FimZ em vários genes de *Klebsiella pneumoniae* que estão envolvidos com a síntese de fímbrias. Também foi possível construir uma provável sequência consenso do regulador FimZ em *K. pneumoniae*, o que contribuirá para estudos futuros de identificação desta sequência em outros genes fimbriais nesta bactéria. e por meio dos resultados do ensaio EMSA, podemos supor que as sequências são de fato reguladas por FimZ.

Em suma, os resultados obtidos neste estudo são inéditos na literatura, o que ressalta a importância e o impacto que tais dados podem trazer na compreensão da patogenicidade de *K. pneumoniae*.

7. REFERÊNCIAS

- ÁLVAREZ, D.; MERINO, S.; TOMÁS, J.M.; BENEDÍ, V.J.; ALBERTÍ, S. Capsular polysaccharide is a major complement resistance factor in lipopolysaccharide O side chain-deficient *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 2, p. 953-955, 2000.
- BARROS, L. M., et al. Prevalência de micro-organismo e sensibilidade antimicrobiana de infecções hospitalares em unidade de terapia intensiva de hospital público no Brasil. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 33, n. 3, p. 429-435, 2012.
- BODDICKER, J.D.; ANDERSON, R.A.; JAGNOW, J., CLEGG, S. Signature-tagged mutagenesis of *Klebsiella pneumoniae* to identify genes that influence biofilm formation on extracellular matrix material. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 4590-4597, 2006.
- CAMPOS, M.A.; VARGAS, M.A.; REGUEIRO, V.; LLOMPART, C.M.; ALBERTÍ, S., BENGOCHEA, J.A. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 12, p. 7107-7114, 2004.
- CLEGG, S.; HULL, S.; HULL, R., PRUCKLER, J. Construction and comparison of recombinant plasmids encoding type 1 fimbriae of members of the family Enterobacteriaceae. **Infect. Immun.**, v. 48, p. 275-279, 1985.
- CLEGG, S.; HANCOX, L.S., YEH, K.S. *Salmonella typhimurium* fimbrial phase variation and FimA expression. **J. Bacteriol.**, v. 178, p. 542-545, 1996.
- CLEGG, S.; WILSON, J., JOHNSON, J. More than one way to control hair growth: regulatory mechanisms in Enterobacteria that affect fimbriae assembled by the Chaperone/Usher pathway. **J. Bacteriol.**, v. 193, n. 9, p. 2081-2088, 2011.
- CORTES, G.; BORREL, N.; ASTORZA, B.; GOMEZ, C.; SAULEDA, J., ALBERTÍ, S. Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a murine model of pneumonia. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 2583-2590, 2002.
- DI MARTINO, P.; CAFFERINI, N.; JOLY, B., DARFEUILLE-MICHAUD, A. *Klebsiella pneumoniae* type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. **Res. Microbiol.**, v. 154, p. 9-16, 2003.
- DOMENICO, P.; SALO, R.J.; CROSS, A.S., CUNHA, B.A. Polysaccharide capsule-mediated resistance to opsonophagocytosis in *Klebsiella pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 4495-4499, 1994.
- DOVE, S.L.; SMITH, S.G.J., DORMAN, C.J. Control of *Escherichia coli* type 1 fimbrial gene expression in stationary phase: a negative role for RpoS. **Mol. Gen. Genet.**, v. 254, p. 13-20, 1997.
- FANG, C.-T.; CHUANG, Y.-P.; SHUN, C.-T.; CHANG, S.-C., WANG, J.-T. A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* causing primary liver abscess and septic metastatic complications. **J. Exp. Med.**, v. 199, p. 697-705, 2004.
- FUNG, C.-P.; CHANG, F.-Y.; LEE, S.-C.; HU, B.-S.; KUO, B.I.-T.; LIU, C.-Y.; HO, M., SIU, L.K. A global emerging disease of *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: is

- serotype K1 an important factor for complicated endophthalmitis? **Gut**, v. 50, p. 420-424, 2002.
- FUNG, C. P.; LIN, Y. T.; LIN, J. C. *Klebsiella pneumoniae* in gastrointestinal tract and pyogenic liver abscess. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 18, n. 8, p. 1322-1325, 2012.
- GERLACH, G.-F.; CLEGG, S., ALLEN, B.L. Identification and characterization of the genes encoding the type 3 and type 1 fimbrial adhesins of *Klebsiella pneumoniae*. **J. Bacteriol.**, v. 171, n. 3, p. 1262-1270, 1989.
- HORNICK, D.B.; ALLEN, B.L.; HORN, M.A., CLEGG, S. Adherence to respiratory epithelia by recombinant *Escherichia coli* expressing *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbrial gene products. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 1577-1588, 1992.
- HSIEH, P.-F.; LIN, T.-L.; YANG, F.-L.; WU, M.-C.; PAN, Y.-J.; WU, S.-H., WANG, J.-T. Lipopolysaccharide O1 antigen contributes to the virulence in *Klebsiella pneumoniae* causing pyogenic liver abscess. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, e33155, 2012.
- KOHAYAGAWA, Y., et al. Pyogenic liver abscess caused by *Klebsiella pneumoniae* genetic serotype K1 in Japan. **J. Infect. Chemother.**, v. 4, n. 15, p. 248-251, 2009.
- KONEMAN, E. W. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.
- LANGSTRAAT, J.; BOHSE, M., 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.
- LEE, H.-C.; CHUANG, Y.-C.; YU, W.-L.; LEE, N.-Y.; CHANG, C.-M.; KO, N.-Y.; WANG, L.-R., KO, W.-C. Clinical implications of hypermucoviscosity phenotype in *Klebsiella pneumoniae* isolates in patients with community-acquired bacteraemia. **J. Int. Med.**, v. 259, p. 606-614, 2006.
- LEVINSON, W.; JAWETZ, E. **Microbiologia médica e imunologia**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 632, 2005.
- MACIEL, C.M.M. **Investigação do papel do repressor Fur na regulação da expressão de genes que codificam fímbrias em *Klebsiella pneumoniae***. 2012. 54 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade São Francisco, Bragança Paulista, 2012.
- MATATOV, R., et al. 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.
- MURPHY, C.N., CLEGG, S. *Klebsiella pneumoniae* and type 3 fimbriae: nosocomial infection, regulation and biofilm formation. **Future Microbiol.**, v. 7, n. 8, p. 991-1002, 2012.
- NOGUEIRA, P. S.; MOURA, E. R.; COSTA, M. M.; MOURA, E. R. F.; COSTA, M. M. F.; MONTEIRO W. M. S.; BRONDI, L. Perfil da infecção hospitalar em um hospital universitário. **Rev. Enferm. UERJ.**, v. 17, n. 1, p. 96-101, 2009.
- O'GARA, J.P., DORMAN, C.J. Effects of local transcription and H-NS on inversion of the fim switch of *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 36, p. 457-466, 2000.
- PODSCHUN, R.; SIEVERS, D.; FISCHER, A., ULLMANN, U. Serotypes, hemagglutinins, siderophore synthesis, and serum resistance of *Klebsiella* isolates causing human urinary tract infections. **J. Infect. Dis.**, v. 168, p. 1415-1421, 1993.

- PODSCHUN, R.; 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.
- RENTSCHLER, A.E.; LOVRICH, S.D.; FITTON, R.; ENOS-BERLAGE, J., SCHWAN, W.R. OmpR regulation of the uropathogenic *Escherichia coli* fimB gene in an acidic/high osmolality environment. **Microbiology**, v.159, p. 316-327, 2013.
- ROSEN, D.A.; PINKNER, J.S.; JONES, J.M.; WALKER, J.N.; CLEGG, S., Hultgren, S.J. Utilization of an IBC pathway in *Klebsiella pneumoniae* urinary tract infection and the effects of FimK on type 1 pilus expression. **Infect. Immun.**, v. 76, n. 7, p. 3337-3345, 2008.
- SAMBROOK, J. F.; RUSSELL, D. W. (Eds.). **Molecular cloning: A Laboratory Manual**. 3. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, 3 v.
- SCHROLL, C.; BARKEN, K.B.; KROGFELT, K.A., STRUVE, C. Role of type 1 and 3 fimbriae *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. **BMC Microbiol.**, v. 10, p. 179, 2010.
- SCHWAN, W.R. Regulation of fim genes in uropathogenic *Escherichia coli*. **World J. Clin. Infect. Dis.**, v. 1, n. 1, p-17-25, 2011.
- SEBGHATI, T.A.; KORHONEN, T.K.; HORNICK, D.B.; CLEGG, S. Characterization of type 3 fimbrial adhesins *Klebsiella* strains. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 2887-2894, 1998.
- SNYDER, J.A.; HAUGEN, B.J.; LOCKATELL, C.V.; MARONCLE, N.; HAGAN, E.C.; JOHNSON, D.E.; WELCH, R.A., MOBLEY, H.L.T. Coordinate expression of fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 7588-7596, 2005.
- STRUVE, C.; BOJER, M., 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., 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. 6592-6601, 2009.
- TARKKANEN, A.M.; et al. Fimbriation, capsulation, and iron-scavenging systems of *Klebsiella* strains associated with human urinary tract infection. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 1187-1192, 1992.
- TINKER, J.K., CLEGG, S. Characterization of FimY as a coactivator of type 1 fimbrial expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 3305-3313, 2000.
- TINKER, J.K.; HANCOX, L.S., CLEGG, S. FimW is a negative regulator affecting type 1 fimbrial expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 435-442, 2001.
- VAN DER WOUDE, M.W., BÄUMLER, A.J. Phase and antigenic variation in bacteria. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 17, p. 581-611, 2004.

- WANG, K.C.; HSU, Y.H.; HUANG, Y.N.; LIN, J.H.; YEH, K.S. FimY of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium functions as a DNA-binding protein and binds the fimZ promoter. **Microbiol. Res.**, v. 169, n. 7-8, p. 496-503, 2014.
- WILLIAMS, P., TOMAS, J.M. The pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae*. **Rev. Med. Microbiol.**, v. 1, p. 196-204, 1990.
- WISKUR, B.J.; HUNT, J.J., CALLEGAN, M.C. Hypermucoviscosity as a virulence factor in experimental *Klebsiella pneumoniae* endophthalmitis. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 49, n. 11, p. 4931-4938, 2008.
- WU, K.-M.; et al. Genome sequencing and comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044, a strain causing liver abscess and meningitis. **J. Bacteriol.**, v. 191, n. 14, p. 4492-4501, 2009.
- YEH, K.S.; TINKER, J.K., CLEGG, S. FimZ binds the *Salmonella typhimurium* *fimA* promoter region and may regulate its own expression with FimY. **Microbiol. Immunol.**, v. 46, n. 1, p. 1-10, 2002.