

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro Tecnológico
Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

**Análise Estrutural e Caracterização
Funcional de Genes de Patogenicidade
em *Chromobacterium violaceum***

SIDNEI BECKER

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Química da
Universidade Federal de Santa Catarina como
requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Luismar Marques Porto
Co-Orientadora: Dr^a. Cíntia Soares

**Florianópolis - SC
Junho 2008**

Sidnei Becker

**Análise Estrutural e Caracterização Funcional de Genes de
Patogenicidade em *Chromobacterium violaceum***

Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção de grau de Mestre em Engenharia Química no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina
Área de Concentração:
Processos Químicos e Biotecnológicos.

Prof. Dr. Luismar Marques Porto
Orientador

Dr^a Cíntia Soares
Co-Orientadora

Prof. Dr. Agenor Furigo Junior
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Banca Examinadora:

Dr^a Cíntia Soares - Presidente

Dr. Carlos Renato Rambo

Prof^a Dr^a Selene Maria de A.
Guelli Ulson de Souza

**Florianópolis - SC
Junho de 2008**

Becker, Sidnei

Análise Estrutural e Caracterização Funcional de Patogenicidade em *Chromobacterium violaceum*. 79 p.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

1. Biofilme – 2. Polissacarídeos – 3. Operon *hms* – 4. *Chromobacterium violaceum*

Este trabalho é parte integrante das pesquisas realizadas pelo Grupo de Engenharia Genômica e foi desenvolvido no Laboratório de Tecnologias Integradas (Intelab) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina.

Dedico este trabalho aos meus pais, Sidio e Terezinha, à
minha esposa Máira, por todo amor, compreensão e
carinho dedicados neste momento tão importante de
minha vida.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Luismar Marques Porto, pela oportunidade de ingressar numa área tão fascinante, pela orientação, conhecimentos transmitidos, atenção e sugestões.

Agradeço a colega de laboratório Derce, pelo enorme conhecimento repassado.

Agradeço a co-orientadora Cíntia Soares pelas valiosas contribuições neste trabalho.

À Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, em especial ao Edevilson, pela sua atenção.

A todos que de forma indireta ou direta contribuíram para a concretização deste trabalho. Muito obrigado.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABELAS.....	xi
ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUÇÃO, JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	1
CAPÍTULO II.....	4
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Biofilmes.....	4
2.2 Genes e Estruturas Necessárias para a Formação de Biofilmes.....	5
2.3 Relação entre Formação de Biofilmes, Exopolissacarídeos e Patogenicidade.....	6
2.4 Biofilmes e Polissacarídeos em Nível Molecular.....	8
2.4.1 Operon.....	8
2.4.2 Aminoácidos e proteínas.....	8
2.4.3 Biofilmes e polissacarídeos.....	9
2.5 Polissacarídeo Poli-(β -1,6-N-Acetil-D-Glicosamina).....	14
2.6 Patogenicidade em <i>Chromobacterium violaceum</i>	16
2.7 Resistência a Antibióticos pelos Microrganismos.....	17
2.8 Genômica Comparativa e Ferramentas de Bioinformática.....	20
CAPÍTULO III.....	26
MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 Ferramentas de Bioinformática para Genômica Comparativa.....	26
3.2 Bactérias Formadoras de Biofilmes Utilizadas para Estudo de Genômica Comparativa.....	26
3.3 Modelagem Estrutural.....	29
CAPÍTULO IV.....	32
RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	32
4.1 O operon <i>hms</i> em <i>Chromobacterium violaceum</i>	32
4.2 Conservação dos Resíduos Críticos e Localização das Enzimas.....	33
CAPÍTULO V.....	53
CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	53
5.1 Conclusões.....	53
5.2 Sugestões para Trabalhos Futuros.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Modelo proposto de síntese do polissacarídeo PIA em *S. epidermidis*. Adaptado de (VUONG *et al.*, 2004a). Fonte: Cuong Vuong, Stanislava Kocianova, Jovanka M. Voyich, Yufeng Yao, Elizabeth R. Fischert, Frank R. DeLeo e Michale Otto, do Instituto Nacional da Saúde, Hamilton, Montana.... 11
- Figura 2. Representação de um segmento da quitina, um homopolímero constituído de unidade de moléculas *N*-acetil-D-glicosamina interligadas por ligações β -1,4. Obtido de (LEHNINGER *et al.*, 2000)..... 15
- Figura 3. Esquema de uma célula bacteriana com o ataque de antibióticos e seus mecanismos de defesa. Em azul: antibióticos; em vermelho: enzimas de degradação de antibióticos; em verde: enzimas de alteração de antibióticos; em cinza: bombas de expulsão de antibióticos; ao centro: plasmídeo com os genes de resistência a antibióticos (BATES *et al.*, 2001). Fonte: www.scq.ubc.ca. 19
- Figura 4. Esquema geral da modelagem de proteínas por homologia. Fonte: (PIEMOLINI, 2004) 24
- Figura 5. Esquema do operon *hms* em *C. violaceum*, codificado na fita reversa do DNA genômico. As setas indicam os genes/ORFs do operon. Os números acima das setas correspondem ao número de aminoácidos e ao peso molecular do polipeptídeo resultante de cada gene/ORF. Sob as setas está indicada a posição de início com o códon de início e, ainda, a posição de parada do respectivo gene/ORF. Os números que aparecem no interior dos círculos indicam a distância intergênica. As informações apresentadas foram obtidas do NCBI..... 33
- Figura 6. Predição das regiões transmembrana pelo servidor HMM-TM da proteína HmsR de *C. violaceum*. As flechas indicam a localização dos resíduos considerados essenciais para formação de biofilmes em *Y. pestis*. Em verde: região interna; em azul: região externa e em vermelho: região transmembrana. 34

Figura 7. Predição das regiões transmembrana pelo servidor HMM-TM da HmsR de <i>Y. pestis</i> . As flechas indicam a localização dos resíduos considerados essenciais para formação de biofilmes em <i>Y. pestis</i> . Em verde: região interna; em azul: região externa e em vermelho: região transmembrana.....	35
Figura 8. Parte do alinhamento múltiplo de HmsR de <i>C. violaceum</i> comparado com HmsR de <i>Y. pestis</i> ; PgaC de <i>E. coli</i> ; IcaA de <i>S. epidermidis</i> e HmsR de <i>B. pertussis</i> . Estão demarcados os resíduos críticos conservados: aspartato (D), glutamina (Q) e arginina (R).....	37
Figura 9. Modelo estrutural tridimensional da proteína HmsR de <i>C. violaceum</i> (a) e do molde utilizado 1qg8 (b).....	38
Figura 10. Modelo construído da proteína HmsR de <i>C. violaceum</i> com localização espacial dos resíduos críticos: aspartatos D135 e D228, glutamina Q264 e arginina R267.....	39
Figura 11. Gráfico de Ramachandran para o modelo tridimensional gerado HmsR de <i>C. violaceum</i> (acima) e (abaixo) gráfico apresentando resultados do programa Verify3D com resíduos demarcados aspartato D135,D228, glutamina Q264 e arginina R267.....	40
Figura 12. Predição da distribuição dos aminoácidos na membrana externa pelo servidor PRED-TMMB da proteína HmsF de <i>C. violaceum</i> (a) e de HmsF de <i>Y. pestis</i> (b).....	41
Figura 13. Parte do alinhamento múltiplo da HmsF de <i>C. violaceum</i> comparados com PgaB de <i>E. coli</i> ; IcaB de <i>S. epidermidis</i> ; HmsF de <i>Y. pestis</i> e HmsF de <i>B. pertussis</i> . Estão demarcados os resíduos críticos para formação de matriz extracelular em <i>Y. pestis</i> : D (aspartato), W (triptofano) e H (histidina).....	42
Figura 14. Estrutura tridimensional de HmsF de <i>C. violaceum</i> com resíduos críticos localizados.....	44
Figura 15. Gráfico de Ramachandran pelo modelo estrutural 3D gerado de HmsF de <i>C. violaceum</i> (acima) e gráfico dos resultados gerados pelo programa Verify3D (abaixo).....	45

Figura 16. Parte do alinhamento múltiplo comparando: HmsH de <i>C. violaceum</i> ; HmsH de <i>Y. pestis</i> ; HmsH de <i>B. pertussis</i> ; PgaA de <i>E. coli</i> e IcaC de <i>S. epidermidis</i> . Encontra-se demarcado o resíduo arginina (R) de efeito moderado na formação de biofilmes em <i>Y. pestis</i>	47
Figura 17. Modelo tridimensional da proteína HmsH de <i>C. violaceum</i> construída (a) comparada com a proteína molde 1w3b cadeia A (b).	48
Figura 18. Modelo tridimensional de HmsH de <i>C. violaceum</i> gerado com a identificação e localização espacial do aminoácido arginina R104.	49
Figura 19. Gráfico de Ramachandran analisando o modelo 3D da proteína HmsH de <i>C. violaceum</i> (acima) e gráfico apresentando resultados do programa Verify3D (abaixo).	50
Figura 20. Predição do servidor HMM-TM com as regiões transmembrana da proteína CV2940 de <i>C. violaceum</i> (a) e HmsS de <i>Y. pestis</i> (b). As setas localizam o aminoácido crítico na formação de biofilmes triptofano (W).	51
Figura 21. Parte do alinhamento múltiplo comparando: CV2940 de <i>C. violaceum</i> ; BP1941 de <i>B. pertussis</i> ; HmsS de <i>Y. pestis</i> ; IcaD de <i>S. epidermidis</i> e PgaD de <i>E. coli</i> . Estão demarcados com um retângulo os resíduos críticos identificados em <i>Y. pestis</i> W (triptofano) e Y (tirosina). A seta indica o resíduo tirosina (Y) com possível função similar à tirosina considerada crítica (demarcada com retângulo) em <i>Y. pestis</i>	52

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Código genético, relacionando às bases codificadas pelo DNA com os respectivos aminoácidos. O esquema mostra também o aminoácido típico de início de uma proteína (metionina,códon AUG) e os códons de término de uma proteína (UAA,UAG,UGA) Obtido de Documentos Embrapa (CORDEIRO, 2003).	9
Tabela 2. Programas e servidores disponíveis publicamente na Internet para análise de dados biológicos.....	21
Tabela 3. Bactérias com respectivas regiões genômicas utilizadas no estudo comparativo.....	27
Tabela 4. Grupos de proteínas utilizados para alinhamento múltiplo.	28

ABREVIATURAS

PIA	Adesina intercelular polissacarídica (<i>Polysaccharide intercellular adhesin</i>)
PNAG	Poli-(<i>N</i> -acetil-glicosamina)
EPS	Exopolissacarídeos
PGA	Poliglicosamina
GlcNAc	<i>N</i> -Acetil-Glicosamina
PDB	Banco de Dados de Proteínas (<i>Protein Data Bank</i>)
ORF	Quadro aberto de leitura (<i>Open Reading Frame</i>)

RESUMO

Biofilmes são comunidades de microrganismos ligados a uma superfície inerte ou viva. Na complexa constituição do material extracelular de biofilmes, os polissacarídeos possuem um importante papel. Dentro da família de exopolissacarídeos sintetizados pelas bactérias com intuito de se proteger do sistema de defesa hospedeiro, encontra-se um com o monômero *N*-Acetil-D-Glicosamina ligado por conformação β -1,6. Grupos de genes que produzem tal polímero encontram-se no genoma de diversas bactérias. A associação deste polissacarídeo com fatores de virulência, aliado à síntese em bactérias causadoras de infecção, torna-o um potencial alvo no desenvolvimento de novos antibióticos. A *Chromobacterium violaceum*, um patógeno oportunístico, e na maioria das vezes fatal, possui o operon *hms*HFR-CV2940 cujas proteínas podem sintetizar tal polissacarídeo. Neste trabalho foram utilizados alinhamentos múltiplos entre proteínas de bactérias que sintetizam polissacarídeos com o intuito de verificar a existência de aminoácidos críticos para a atividade patogênica conferida por biofilmes. Foram gerados modelos tridimensionais para visualização da distribuição espacial destes aminoácidos. A análise efetuada mostra que a proteína HmsR conserva os aminoácidos D135, D228, Q264 e R267, considerados críticos para a formação de biofilmes, e estes se encontram próximos. A proteína HmsF de *C. violaceum* conserva os resíduos D86, D87, H156 e W115. No modelo estrutural gerado observa-se que estes resíduos também encontram-se favoravelmente localizados. Para a proteína HmsH houve comprovação de conservação para o resíduo R104, e na proteína CV2940 conservou-se o resíduo W94. A conservação de aminoácidos considerados importantes para a formação de biofilmes entre as proteínas deste operon em *C. violaceum* indica que eles desempenham a mesma função enzimática na síntese de biofilmes. Também como no caso de operons de outros organismos patogênicos, pode-se sugerir que o operon *hms*HFR-CV2940 esteja ligado à sua patogenicidade.

ABSTRACT

Biofilms are assemblages of microbes attached to a live or abiotic surface. Polysaccharides have an important role in the complex constitution of the extracellular material in biofilms. In the exopolysaccharide family synthesized by bacteria to protect from host defense system, there is one with the monomer *N*-acetyl-D-glucosamine bound in the β -1,6 conformation. Groups of genes that produce such polymer are in the genome of several bacteria. The association of this polysaccharide with virulence factors, associated with bacteria synthesis, makes it a potential target in the development of new antibiotics. *Chromobacterium violaceum*, an opportunistic pathogen, has the operon *hmsHFR-CV2940*, whose proteins can synthesize such polysaccharide. In this work, multiple alignments among proteins from bacteria that synthesize such polysaccharide were used to verify the existence of amino acids that might be critical for the pathogen activity. Three-dimensional models were generated for spatial visualization of these amino acids residues. The analysis carried out showed that the protein HmsR preserves the amino acids D135, D228, Q264 and R267, considerate critical for the formation of biofilms. It is shown that these amino acids are close to each other. The protein HmsF of *C. violaceum* preserves the residues D86, D87, H156 and W115. In the structural model generated, it was shown that these residues are also close to each other in their spatial arrangement. For the protein HmsH there is evidence of conservation for the residue R104, and for the residue W94, for protein CV2940. Conservation and favorable spatial location of those critical amino acids constituting the proteins of the operon indicates that they preserve the same enzymatic function in the biofilm synthesis. As in the case of operons of other pathogenic organisms, it is possible to suggest that the operon *hmsHFR-CV2940* is bound to *C. violaceum* pathogenicity.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO, JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A infecção por microrganismos, principalmente bactérias, constitui-se num problema crônico de saúde pública. Bactérias muitas vezes consideradas controladas, uma vez por outra, aparecem em noticiários associadas a mortes, demonstrando que não se conhece o bastante a respeito do seu sistema de patogenicidade. Drogas inicialmente eficazes já não possuem o mesmo poder antibiótico. Portanto, a necessidade de uma melhor compreensão das características patogênicas associadas aos microrganismos torna-se preponderante para enfrentar os problemas de saúde pública.

O recente sequenciamento de genomas de inúmeros organismos possui papel importante no sentido de esclarecer e combater a patogenicidade, uma vez que neles devem estar codificadas as informações utilizadas para invasão hospedeira. Dentro do arsenal que as bactérias dispõem, a formação de biofilmes representa um papel importante (CERCA *et al.*, 2007a). Para tanto, o entendimento da formação da matriz extracelular nos biofilmes pode auxiliar no combate à infecção por bactérias.

É importante salientar que uma das principais razões para o sequenciamento da *C. violaceum* foi o seu grande potencial biotecnológico. No entanto, a exploração deste potencial como, por exemplo, a produção de biopolímeros e agentes anti-tumorais e anti-chagasíticos, especialmente os produtos e processos que visam aplicações biomédicas, está fortemente vinculada à nossa capacidade de entender e combater os mecanismos que fazem desta bactéria um organismo letal em infecções oportunistas.

O estudo da patogenicidade da *C. violaceum* pode beneficiar-se do seqüenciamento de seu genoma, através, por exemplo, de estudos de genômica comparativa e a conseqüente caracterização de genes, suas enzimas e seus respectivos sítios biologicamente ativos. Este trabalho, que consiste essencialmente em uma abordagem multidisciplinar, pode ser agora conduzido graças às poderosas ferramentas de bioinformática à disposição dos pesquisadores das áreas de saúde e de biotecnologia.

A formação de biofilmes de *C. violaceum* foi evidenciada pela capacidade desta bactéria de produzir polissacarídeos extracelulares como, por exemplo, celulose bacteriana (RECOUVREUX, 2004). Outros componentes importantes, também polissacarídeos, serão aqui descritos e discutidos, especialmente aqueles relacionados à ligação que se acredita existir entre os biofilmes de *C. violaceum* e suas infecções mais letais.

Sabe-se que a matriz extracelular em biofilmes é complexa e um dos principais componentes são os polissacarídeos. Dentre os polissacarídeos, a poli-(β -1,6-*N*-acetil-D-glicosamina) tem sido associada à formação de biofilmes em algumas bactérias, podendo existir em biofilmes de outras bactérias ainda não relatadas, pois, aparentemente, o conjunto de proteínas necessárias para sua formação conservou-se em muitos organismos. A identificação deste polissacarídeo entre várias bactérias e, conseqüentemente, dos polipeptídeos necessários para sua síntese, conduziu ao estudo de uma vacina capaz de auxiliar o organismo humano na defesa contra a formação de biofilmes (CERCA *et al.*, 2007b).

Dentre as bactérias que possuem o conjunto de proteínas necessário para a síntese de poli-(β -1,6-*N*-acetil-D-glicosamina), encontra-se a linhagem ATCC 12472 da *Chromobacterium violaceum*. Esta linhagem de *C. violaceum*, patógeno oportunístico (TI *et al.*, 1993), teve seu genoma seqüenciado recentemente por um consórcio de laboratórios brasileiros. Apesar dos estudos derivados deste

sequenciamento apresentarem alguns genes considerados patogênicos, não se conhece a totalidade deles e como estes estão organizados no genoma.

O esclarecimento do funcionamento e a relação de genes com a formação de biofilmes pode corroborar num controle de infecções de *C. violaceum*, bem como de outras bactérias que possuam grupo de genes com funções similares.

Neste trabalho foram feitas comparações com proteínas de outras bactérias que estão relacionadas com a formação de biofilmes. A preservação de funções das proteínas durante a evolução pode ser avaliada comparando os aminoácidos essenciais para sua funcionalidade. Para melhor visualizar possíveis aminoácidos importantes na função da proteína, a modelagem estrutural realizada neste trabalho contribui para a identificação de importantes regiões com tal característica.

Neste sentido, o presente trabalho, após uma revisão na literatura sobre a relação de biofilmes com patogenicidade, relaciona um grupo de proteínas em *Chromobacterium violaceum* com outras de organismos comprovadamente relacionadas a biofilmes. A relação entre as proteínas é realizada inicialmente pelo alinhamento de seqüências de aminoácidos e concretizada pela modelagem estrutural no intuito de identificação de aminoácidos importantes pela visualização espacial.

CAPÍTULO II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biofilmes

Biofilmes podem ser definidos como comunidades de microrganismos ligados um ao outro numa superfície inerte ou viva (dispositivos médicos, células ou tecidos humanos), sendo que esta ligação superficial ocorre através da produção de substâncias exopoliméricas. A composição destas substâncias poliméricas extracelulares (EPS) produzidas depende dos organismos presentes e das condições ambientais, sendo constituídas essencialmente por polissacarídeos (ZHU *et al.*, 2007).

Atualmente é reconhecido que a formação de biofilmes é um importante aspecto de várias, senão da maioria das doenças bacterianas, dentre as quais inclui-se a osteomielite, cáries dentárias, infecções relacionadas a implantes médicos, infecções de implantes oculares e infecções crônicas de pulmão em pacientes com fibrose cística. O estabelecimento de biofilmes faz com que estes microrganismos suportem agentes antimicrobianos em concentrações muito superiores àquelas que seriam necessárias para matar bactérias planctônicas (ou livres no ambiente).

Biofilmes são constituídos por complexas estruturas tridimensionais com alta resistência a estresses ambientais. O conhecimento adquirido neste campo de pesquisa poderá trazer muitos benefícios conceituais para os campos da biologia e da biotecnologia. Na medicina, interesses científicos recentes por biofilmes emergiram em grande parte pela sua presumida relevância clínica, já que estão fortemente relacionados a infecções.

Ainda não está suficientemente esclarecido se os microrganismos utilizam realmente a produção de biofilmes para comunicação, coordenação e especialização dentro dos biofilmes para benefício da comunidade, como contraponto à hipótese de simplesmente reagirem com o ambiente para sua própria sobrevivência.

O desenvolvimento de biofilmes ocorre com a seqüência de algumas etapas que compreendem basicamente:

- adesão inicial reversível por células planctônicas;
- transição da adesão reversível para irreversível;
- amadurecimento do biofilme; e
- dispersão de algumas células do biofilme, podendo iniciar uma nova comunidade.

2.2 Genes e Estruturas Necessárias para a Formação de Biofilmes

O desenvolvimento de biofilmes é realizado em etapas com a participação de algumas estruturas. Genes flagelares estão envolvidos em estágios prematuros de desenvolvimento de biofilmes, mas não são necessários no amadurecimento de biofilmes (PRATT e KOLTER, 1998). Pratt e Kolter mostram que a mobilidade flagelo-mediada, bem como a estrutura *fimbriae* tipo 1, contribuem para os estágios iniciais de desenvolvimento de biofilmes em superfícies abióticas.

A formação da estrutura tridimensional na arquitetura de biofilmes em diversas bactérias relaciona-se com a síntese de exopolissacarídeos (EPS). O ácido colânico é um exopolissacarídeo produzido pela maioria das cepas de *E. coli* e acredita-se desempenhar papel importante na fase de amadurecimento do biofilme (HANNA *et al.*, 2003).

Também o polissacarídeo poli(β -1,6-*N*-acetil-D-glicosamina), que está relacionado com a adesão celular em *S. epidermidis* (MACK *et al.*, 1996a), está envolvido em ligação superficial abiótica, adesão intercelular e formação de

biofilme em *E. coli* (ITOH *et al.*, 2005). A importância deste polissacarídeo na composição de biofilmes comprova-se pelo fato da sua despolimerização levar à dispersão de biofilmes (ITOH *et al.*, 2005).

2.3 Relação entre Formação de Biofilmes, Exopolissacarídeos e Patogenicidade

Pela perspectiva médica, as bactérias associadas a biofilmes em implantes ou *catéters* têm sido de grande interesse devido às graves infecções que elas causam. Os impactos clínicos de biofilmes bacterianos têm levado muitos pesquisadores a investigar os mecanismos regulatórios por trás de sua formação e dissolução no intuito de encontrar alvos específicos para agentes quimioterapêuticos.

Métodos convencionais para a eliminação de infecção por bactérias (como os antibióticos) são muitas vezes ineficientes com biofilmes bacterianos (NICKEL *et al.*, 1985). As altas doses necessárias para livrar-se de um sistema de biofilmes bacterianos são, em alguns casos, impraticáveis, pois ao invés de eliminar as bactérias, acabam prejudicando o paciente. Outra característica em infecções que envolvem o modo de crescimento por biofilmes é que estas são geralmente crônicas e difíceis de erradicar.

Devido a sua alta resistência a antibióticos, biofilmes causam sérios problemas à saúde humana, como, por exemplo, infecções pulmonares e do trato urinário (POTERA, 1999). Estimativas indicam que 65% das infecções bacterianas humanas envolvem biofilmes, sendo que entre 65% a 80% das infecções crônicas em nações industrializadas estão relacionadas com a formação de biofilmes.

Para estabelecer uma infecção, a bactéria deve orquestrar a expressão de um grupo de moléculas que determinam a patogenicidade, as quais são conhecidas coletivamente como fatores de virulência (NILSSON *et al.*, 1997). Uma

delicada coordenação destes fatores de virulência é crucial para a sobrevivência do patógeno e o sucesso na invasão ao hospedeiro.

Staphylococcus aureus e *Staphylococcus epidermidis* são as mais freqüentes causas de infecções sanguíneas hospitalares adquiridas (WISPLINGHOFF *et al.*, 2004). Na patogênese desenvolvida por estes organismos, o polissacarídeo PIA (*polysaccharide intercellular adhesin*) possui importante papel, sendo considerado fator de virulência (RUPP *et al.*, 1999; RUPP *et al.*, 2001). O papel deste homopolímero (PIA) na patogênese é o de proteger o microrganismo do sistema de defesa hospedeiro (VUONG *et al.*, 2004b).

PNAG ou poli-(*N*-acetil-glicosamina), um polissacarídeo quimicamente idêntico ao PIA, tem sido utilizado como antígeno alvo no desenvolvimento de vacina para bactérias de *Staphylococcus* (CERCA *et al.*, 2007a). Este polissacarídeo, sintetizado em diversas bactérias, é foco de estudo para um possível antígeno em *E. coli* (CERCA *et al.*, 2007b). A síntese deste polímero por outras bactérias abre a possibilidade de ação deste antígeno para outros organismos patogênicos.

A bactéria Gram-negativa *Bordetella pertussis* é responsável por doenças associadas ao trato respiratório (coqueluche), estando relacionada a mortes em crianças. As vacinas utilizadas no combate a esta doença são eficazes contra os sintomas clínicos, mas pouco efetivas no combate à infecção. Esta bactéria possui o operon *bpsABCD* relacionado a um polissacarídeo que contribui para a formação de biofilmes no trato respiratório de ratos (SLOAN *et al.*, 2007). Este grupo de genes (operon) atua na formação de biofilmes contribuindo com a estabilidade e manutenção da arquitetura tridimensional de biofilmes (PARISE *et al.*, 2007).

A bactéria Gram-negativa *Yersinia pestis*, agente causador da peste bubônica que dizimou em torno de 25 milhões de pessoas na Europa no século XIV, necessita do *locus hms* para efetiva infecção da pulga vetor da doença (JARRETT *et al.*, 2004). Este material extracelular secretado, que acredita-se ser composto por polissacarídeos, “bloqueia” o proventrículo (sistema digestivo) da

pulga, habilitando a efetiva transmissão da praga de algumas pulgas aos mamíferos ao picá-los. A peste bubônica, que é a forma clínica mais comum deste organismo, é fatal em menos de uma semana para 40-70% dos pacientes, se antibióticos apropriados não forem administrados rapidamente.

2.4 Biofilmes e Polissacarídeos em Nível Molecular

2.4.1 Operon

Operons representam uma unidade organizacional básica de genes na complexa estrutura hierárquica dos processos biológicos numa célula de procariotos. A predição de operons baseia-se na composição das seguintes características: a) um operon consiste de um ou mais genes, arranjados na mesma fita de uma seqüência genômica; b) as distâncias intergênicas no operon geralmente são mais curtas em relação às distâncias inter-operons; c) os genes num operon compartilham de uma região promotora e uma terminadora; d) os genes do operon são bem conservados entre espécies filogeneticamente relacionadas; e) as funções dos genes num operon são normalmente relacionadas (CHEN *et al.*, 2004).

2.4.2 Aminoácidos e proteínas

A formação das proteínas depende da codificação pelos genes das bases U (uracila), C (citosina), A (adenina) e G (guanina). Cada três destas bases codifica um aminoácido (Tabela 1), que forma a estrutura das proteínas.

A organização das ligações químicas destes aminoácidos no espaço determina a estrutura secundária de uma proteína que pode ser:

- α -hélice;
- Folha- β ou folha pregueada.

Tabela 1. Código genético, relacionando às bases codificadas pelo DNA com os respectivos aminoácidos. O esquema mostra também o aminoácido típico de início de uma proteína (metionina, códon AUG) e os códons de término de uma proteína (UAA,UAG,UGA). Obtido de Documentos Embrapa (CORDEIRO, 2003).

Primeira Letra	Segunda Letra				Terceira Letra	
	U	C	A	G		
U	Fenilalanina (Fen)	Serina (Ser)	Tirosina (Tir)	Cisteína (Cis)	U	
	Fenilalanina (Fen)	Serina (Ser)	Tirosina (Tir)	Cisteína (Cis)	C	
	Leucina (Leu)	Serina (Ser)	Final de Tradução	Final de Tradução	A	
	Leucina (Leu)	Serina (Ser)	Final de Tradução	Triptofano (Trp)	G	
C	Leucina (Leu)	Prolina (Pro)	Histidina (His)	Arginina (Arg)	U	
	Leucina (Leu)	Prolina (Pro)	Histidina (His)	Arginina (Arg)	C	
	Leucina (Leu)	Prolina (Pro)	Glutamina (Glu)	Arginina (Arg)	A	
	Leucina (Leu)	Prolina (Pro)	Glutamina (Glu)	Arginina (Arg)	G	
	Isoleucina (Ile)	Treonina (Tre)	Asparagina (Asn)	Serina (Ser)	U	
	Isoleucina (Ile)	Treonina (Tre)	Asparagina (Asn)	Serina (Ser)	C	
	Isoleucina (Ile)	Treonina (Tre)	Lisina (Lis)	Arginina (Arg)	A	
	Metionina (Met)	Treonina (Tre)	Lisina (Lis)	Arginina (Arg)	G	
	G	Valina (Val)	Alanina (Ala)	Ácido Aspártico (Asp)	Glicina (Gli)	U
		Valina (Val)	Alanina (Ala)	Ácido Aspártico (Asp)	Glicina (Gli)	C
Valina (Val)		Alanina (Ala)	Ácido Glutâmico (Glu)	Glicina (Gli)	A	
Valina (Val)		Alanina (Ala)	Ácido Glutâmico (Glu)	Glicina (Gli)	G	

2.4.3 Biofilmes e polissacarídeos

Formação de biofilmes e exopolissacarídeos possui uma relação já consolidada. Dentro da classe de polissacarídeos extracelulares, existem o alginato, produzido em *Pseudomonas aeruginosa*, e o ácido colânico, em *E. coli* (DAVIES *et al.*, 1993; DANESE *et al.*, 2000). Embora alguns polissacarídeos estejam presentes, não se conhece o seu exato papel na formação de biofilmes (JACKSON *et al.*, 2002; STAPPER *et al.*, 2004). Outro polissacarídeo componente de biofilmes é a celulose (SOLANO *et al.*, 2002), mas sua expressão não se constitui um pré-requisito na colonização em infecções humanas (BOKRANZ *et al.*, 2005).

Recentemente, o polissacarídeo poli-(β -1,6-N-acetil-D-glicosamina) vem sendo observado como um importante constituinte de biofilmes. O importante papel que este polissacarídeo possui na constituição de biofilmes foi demonstrado

na inibição da formação de biofilmes que sua despolimerização causa por hidrólise das ligações glicosídicas (ITOH *et al.*, 2005).

Em *S. epidermidis*, a molécula de adesina PIA (*polysaccharide intercellular adhesin*) atua nas fases acumulativas de aderência, no qual organismos aderem um ao outro e elaboram biofilme (MACK *et al.*, 1996b). Este polissacarídeo, constituinte do biofilme, caracteriza-se estruturalmente por 130 resíduos de acetilglicosamina interligadas pela conformação β -1,6, sendo a maioria (80%) *N*-acetilada.

O polissacarídeo PIA é sintetizado pelo operon *icaADBC* em *S. epidermidis*. Os polipeptídeos IcaA e IcaD, resultantes deste operon, estão localizados na membrana e juntos exibem atividade *N*-acetilglicosaminiltransferase, onde IcaA representa a enzima catalítica que requer IcaD para uma completa atividade (GERKE *et al.*, 1998). Já a atividade de IcaB resulta na desacetilação do polissacarídeo PIA que é necessária para associação à superfície celular bacteriana. Esta desacetilação mediada acredita-se ser importante na formação de biofilmes e para evasão da fagocitose, mediada pelo polissacarídeo PIA, atuando ligada à superfície celular de *Staphylococcus* (VUONG *et al.*, 2004a). Uma provável proteína da membrana, IcaC, é necessária para a formação de longos polímeros e pode estar envolvida na exportação do polissacarídeo PIA em formação (GERKE *et al.*, 1998). A Figura 1 apresenta um modelo de biossíntese do polissacarídeo PIA proposto por VUONG e colaboradores (2004a).

Modelo da Biossíntese de PIA

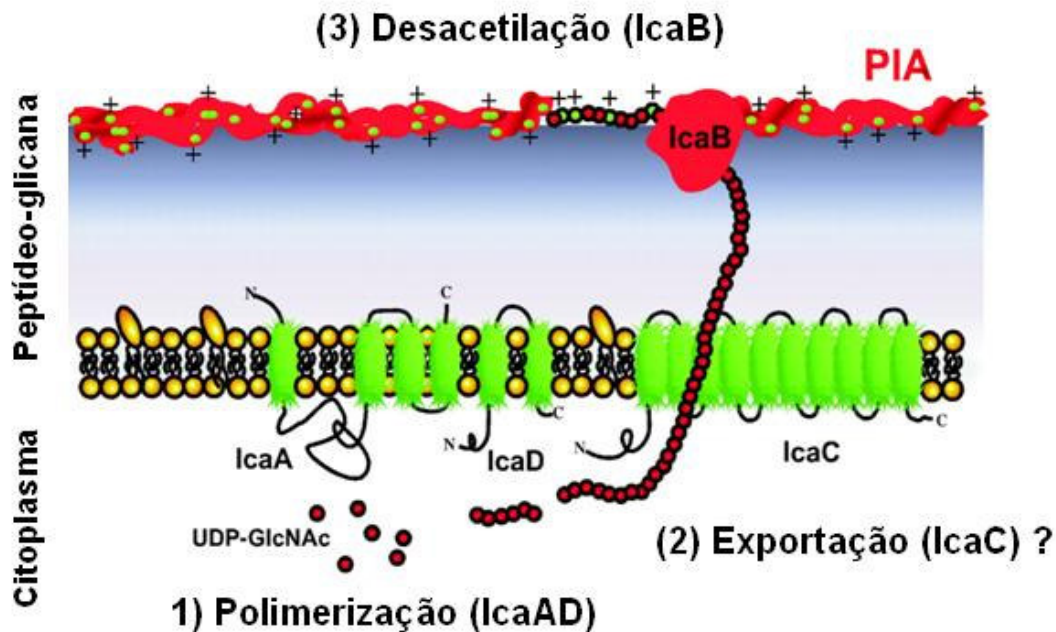


Figura 1. Modelo proposto de síntese do polissacarídeo PIA em *S. epidermidis*. Adaptado de VUONG *et al.*, 2004a. Fonte: Cuong Vuong, Stanislava Kocianova, Jovanka M. Voyich, Yufeng Yao, Elizabeth R. Fischert, Frank R. DeLeo e Michale Otto, do Instituto Nacional da Saúde, Hamilton, Montana.

No modelo proposto por Vuong e colaboradores (2004a), o polissacarídeo PIA é sintetizado em três etapas. A síntese inicia com a proteína IcaA adicionando os monômeros Glicosamina-*N*-Acetil ao polímero em formação. IcaA necessita da proteína IcaD para uma completa atividade (GERKE *et al.*, 1998). A transferência para o exterior da célula presume-se ser realizada pela proteína IcaC. Estando no exterior da célula, a proteína IcaB tem o papel de desacetilar o polissacarídeo introduzindo-lhe cargas positivas.

Outro grupo de genes relacionado à formação de biofilmes com região homóloga ao *icaADBC* de *S. epidermidis* é o *pgaABCD* de *E. coli*. Tal região genética sintetiza um polissacarídeo de unidades β -1,6-*N*-acetil-D-glicosamina que promove ligação superficial, adesão intercelular e formação de biofilmes (WANG *et al.*, 2004). Este polissacarídeo, nomeado PGA, que possui menos de 3% de resíduos desacetilados e peso molecular alto (≥ 400 kDa), influi na formação de

biofilme independentemente da ação de outras estruturas como *pili*, *curli* e mobilidade.

O polipeptídeo PgaC de *E. coli* refere-se a uma proteína da membrana interna da família glicosiltransferase com 2 hélices transmembrana na terminação N e 3 domínios transmembrana na terminação C (WANG *et al.*, 2004). Já a proteína PgaB é prevista como uma lipoproteína contendo 672 aminoácidos com provável domínio N-desacetilase. Com localização provável na membrana externa, encontra-se a proteína PgaA contendo 807 aminoácidos que, juntamente com PgaB, demonstra inibir a exportação do polissacarídeo PGA extracelularmente (ITOH *et al.*, 2008). A menor proteína do operon *pgaABCD*, a PgaD, com localização provável na membrana interna contendo 137 aminoácidos, é também necessária para a formação do polissacarídeo PGA.

Em *Yersinia pestis*, um material extracelular secretado, muito provavelmente um polissacarídeo, está relacionado ao operon *hmsHFRS* (FORMAN *et al.*, 2006). A maior proteína do operon *hms* de *Y. pestis* é a HmsH, com 822 aminoácidos contendo uma estrutura típica de uma proteína transmembrana. Mutação sítio-dirigida em alguns aminoácidos desta proteína determinaram que o resíduo R (Arginina) 134, mesmo não sendo crucial, pode moderadamente reduzir a eficácia na formação de biofilmes (FORMAN *et al.*, 2006).

HmsF de *Y. pestis* pertence a uma extensa família de desacetilases. Em substituições de resíduos conservados do domínio desacetilase, demonstrou-se que os resíduos D (ácido aspártico) 114 e D (ácido aspártico) 115 impediram completamente a formação de biofilmes, provavelmente afetando a sua possível atividade para desacetilação. A substituição do resíduo H (histidina) 184 também influi negativamente na formação de biofilmes. Já a alteração do resíduo W (triptofano) 143 comprovou que, apesar de não ser essencial, afeta a funcionalidade da proteína, possivelmente a atividade enzimática (FORMAN *et al.*, 2006).

Alguns estudos já relataram as similaridades entre as prováveis glicosiltransferases de *S. epidermidis* (proteína IcaA), *Y. pestis* (proteína HmsR) e de *E. coli* (proteína PgaC) e a função crítica destas proteínas na formação de biofilmes (PENDRAK e PERRY, 1993; HEILMANN *et al.*, 1996; WANG *et al.*, 2004). A comparação de seqüências entre as proteínas HmsR, IcaA, PgaC e BscA (*Gluconobacter xylinus*) levou à identificação do motivo conservado 'D,D,D35QxxRW' (SAXENA e BROWN, 1997). Nas substituições de aminoácidos testadas, quatro dos resíduos no motivo 'D,D,D35QxxRW' de HmsR, D (ácido aspártico) 176, D (ácido aspártico) 269, Q (Glutamina) 305, R (Arginina) 308, demonstraram ser críticos para a produção da matriz extracelular de biofilmes em *Y. pestis* (FORMAN *et al.*, 2006).

A menor proteína sintetizada pelo operon Hms de *Y. pestis*, a HmsS contém a predição de 2 domínios transmembrana. Substituições feitas em resíduos de aminoácidos conservados desta proteína identificou os resíduos W (triptofano) 80 e Y (tirosina) 83 como sendo críticos para a função de HmsS, levando a perda de sua função. Ambos os resíduos W80 e Y83 estão dentro da prevista região citoplasmática de HmsS (FORMAN *et al.*, 2006).

O gene *bpsA* de espécies *Bordetella*, pertencente ao operon *bpsABCD*, prevê codificar uma proteína com 661 aminoácidos possuindo 4 domínios transmembrana com similaridade à HmsH de *Y. pestis* e à PgaA de *E. coli*. O polipeptídeo BpsB prevê codificar uma proteína com 701 aminoácidos que possui similaridade com IcaB de *S. epidermidis*. Assim como IcaB, BpsB possui provável domínio polissacarídeo N-desacetilase. Já o provável domínio da proteína BpsC, comparado com a IcaA de *S. epidermidis* e PgaC de *E. coli*, indica fazerem parte da família 2 das enzimas glicosiltransferase (CAMPBELL *et al.*, 1997). O motivo para uma glicosiltransferase processiva (isto é, que transfere múltiplos resíduos de açúcares para um aceptor) também está presente na proteína BpsC (PARISE *et al.*, 2007).

2.5 Polissacarídeo Poli-(β -1,6-N-Acetil-D-Glicosamina)

Um variado número de regiões genéticas que implicam na produção de exopolissacarídeos estão relacionados à ligação superficial, adesão intercelular e manutenção e desenvolvimento da arquitetura de biofilmes.

Recentemente, o polissacarídeo poli-(β -1,6-N-acetil-D-glicosamina) tem sido implicado na formação de biofilmes em várias bactérias patogênicas.

PIA (*polysaccharide intercellular adhesin*) é um homopolímero de ligações β -1,6 dos resíduos N-acetilglicosamina que está localizado na superfície celular da bactéria Gram-positiva *S. epidermidis* e é necessário para formação de biofilmes. Este polissacarídeo contém ao menos 130 resíduos de ligações interglicosídicas na conformação β -1,6 (MACK *et al.*, 1996a). Entre 16,4% e 9,9% dos monômeros N-acetil-D-glicosamina (Figura 2) estão desacetilados, proporcionando uma carga positiva ao polímero. Esta desacetilação é necessária para a ligação de PIA à superfície celular bacteriana e para a evasão ao sistema de defesa do organismo ao qual a bactéria está localizada (VUONG *et al.*, 2004a). Imagina-se que pela produção de PIA a bactéria pode mudar suas propriedades eletrostáticas na superfície celular, que está carregada negativamente. Isto demonstra que a desacetilação, encampada pela proteína IcaB, é um importante mecanismo de virulência nas infecções desta bactéria. O polissacarídeo poli-N-acetilglicosamina (PNAG), que é sintetizado por *S. aureus* e é muitas vezes referido como sendo PIA, necessita do mesmo grupo de genes *icaADBC* para ser produzido (FLUCKIGER *et al.*, 2005).

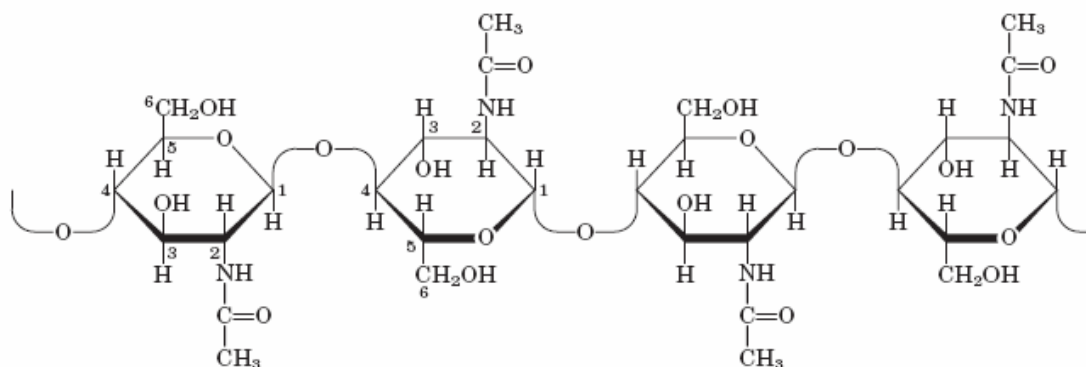


Figura 2. Representação de um segmento da quitina, um homopolímero constituído de unidade de moléculas *N*-acetil-D-glicosamina interligadas por ligações β -1,4. Obtido de LEHNINGER *et al.*, 2000.

O grupo de genes *pga*ABCD em *E. coli* sintetiza um polissacarídeo designado PGA (poliglicosamina) que considera-se bioquimicamente indistinguível de PNAG de *S. aureus*.

PNAG/PIA possuem o poder de proteger células *Staphylococci* de morte fagocítica pelo sistema imune de defesa do hospedeiro (VUONG *et al.*, 2004a; VUONG *et al.*, 2004b). Esta característica faz com que o PNAG torne-se um potencial candidato à vacina para infecções (MAIRA-LITRAN *et al.*, 2005). Tal potencial como vacina do PNAG foi testado em infecções causadas por *E. coli*, indicando que a expressão deste antígeno por bactérias Gram-negativas e Gram-positivas pode torná-lo efetivamente um alvo numa vacina para múltiplas espécies patogênicas de bactérias que sintetizam um polissacarídeo semelhante (CERCA *et al.*, 2007b).

Com as múltiplas propriedades químicas da molécula PNAG que influenciam na adesão superficial celular e na proteção contra o sistema de defesa do hospedeiro, testou-se com sucesso a interação deste polissacarídeo com anticorpos. Este estudo verificou que uma importante propriedade química de

PNAG na interação com anticorpos está fortemente ligada ao seu grau de acetilação (CERCA *et al.*, 2007a).

Embora PNAG fosse primeiramente associado à produção de biofilmes pela espécie *Staphylococcus*, já se associa a produção de biofilmes com este polissacarídeo numa variedade de espécies bacterianas incluindo *Escherichia coli*, *Yersinia pestis* e *Bordetella pertussis*. Esta relação pode levar ao desenvolvimento de uma vacina potencialmente aplicável para diversas espécies bacterianas.

2.6 Patogenicidade em *Chromobacterium violaceum*

Chromobacterium violaceum é considerado um patógeno eventual para animais e humanos, sendo seu potencial patogênico em humanos primeiramente descrito em 1927 na Malásia (SNEATH *et al.*, 1953).

Embora o poder de infecção de *C. violaceum* seja baixo, cada vez mais aparecem relatos de casos de infecção humana por este organismo. Existem mais de 150 casos relatados que resultaram em septicemia e abscessos pulmonares, da pele e do fígado em vários países, principalmente em áreas tropicais e subtropicais (DAUPHINAIS e ROBBEN, 1968; OGNIBENE e THOMAS, 1970; PETRILLO *et al.*, 1984; TI *et al.*, 1993). Na maioria dos casos, a porta de entrada para infecção de *C. violaceum* é a pele “rompida” exposta ao solo ou água contaminada pelo organismo (LEE *et al.*, 1999).

Ainda que casos de infecção por *C. violaceum* sejam raros, a infecção por este microrganismo pode levar a uma taxa de fatalidade superior a 57%, como em um caso relatado de doença granulomatosa crônica em crianças (MACHER *et al.*, 1982). Os casos com resultados fatais apresentam características clínicas, tais como sepsis, múltiplos abscessos no fígado, meningite e complicações pulmonares.

Mesmo que casos de infecção humana por *C. violaceum* sejam raros, o aumento da incidência de tais casos sugere este organismo como patógeno

emergente. Este aumento denota um cuidado crescente com o seu potencial patogênico e requer o estudo de terapias efetivas para tratamento desta potencial infecção fatal.

A análise genômica da bactéria Gram-negativa *Chromobacterium violaceum* linhagem ATCC 12472 apresenta alguns genes associados a organismos patogênicos. Encontram-se genes relacionados com adesão celular hospedeira como os envolvidos na reunião da maquinaria do *pili* tipo IV e da via de secreção do tipo II. Verifica-se ainda estarem presentes genes relacionados com invasão celular na qual encontram-se três grandes *clusters* gênicos do sistema de secreção do tipo III. Possui também parte dos genes envolvidos na síntese de lipopolissacarídeos e peptídeo-glicanas, ambos envolvidos no choque séptico. Genes que codificam proteínas membros da família RTX, que incluem toxinas como hemolisinas e colicinas, também se encontram no genoma de *C. violaceum*. Esta bactéria possui ainda enzimas como a catalase, peroxidases e superóxido desmutase, que estão potencialmente envolvidas no processo de desintoxicação. A patogênese de *C. violaceum* pode ainda estar relacionada com os genes para síntese de violaceína que esta bactéria possui (BRITO *et al.*, 2004).

Uma vez que biofilmes possuem implicações na medicina pela ligação que possuem com infecções, é de grande valia encontrar meios de controle para a formação de biofilmes. A capacidade de *C. violaceum* formar biofilmes (MARTINELLI *et al.*, 2002; RECOUVREUX, 2004) indica que um entendimento na formação de biofilmes pode contribuir no controle de sua patogenicidade.

2.7 Resistência a Antibióticos pelos Microrganismos

Antibióticos caracterizam-se pelo seu modo de ação no organismo alvo, sendo os mais comuns:

- Inibição da síntese de ácidos nucléicos (antibióticos rifampicina, cloroquinas);
- Inibição da síntese de proteínas (antibióticos tetraciclina, cloranfenicol);
- Ação na membrana celular (polienos, polimixinas);
- Interferência no sistema enzimático (sulfametoxazole);
- Ação na parede celular (penicilina, vancomicina).

No entanto, cada vez mais os microrganismos estão expressando resistência a antibióticos através de produção de enzimas que destroem o componente ativo da droga, sintetizando enzimas alteradas que são pouco afetadas pela droga (Figura 3), mutando alvos estruturais do antibiótico ou alterando constituintes da parede celular, dificultando a entrada do antibiótico pela permeabilidade da membrana (WICKENS, 2005).

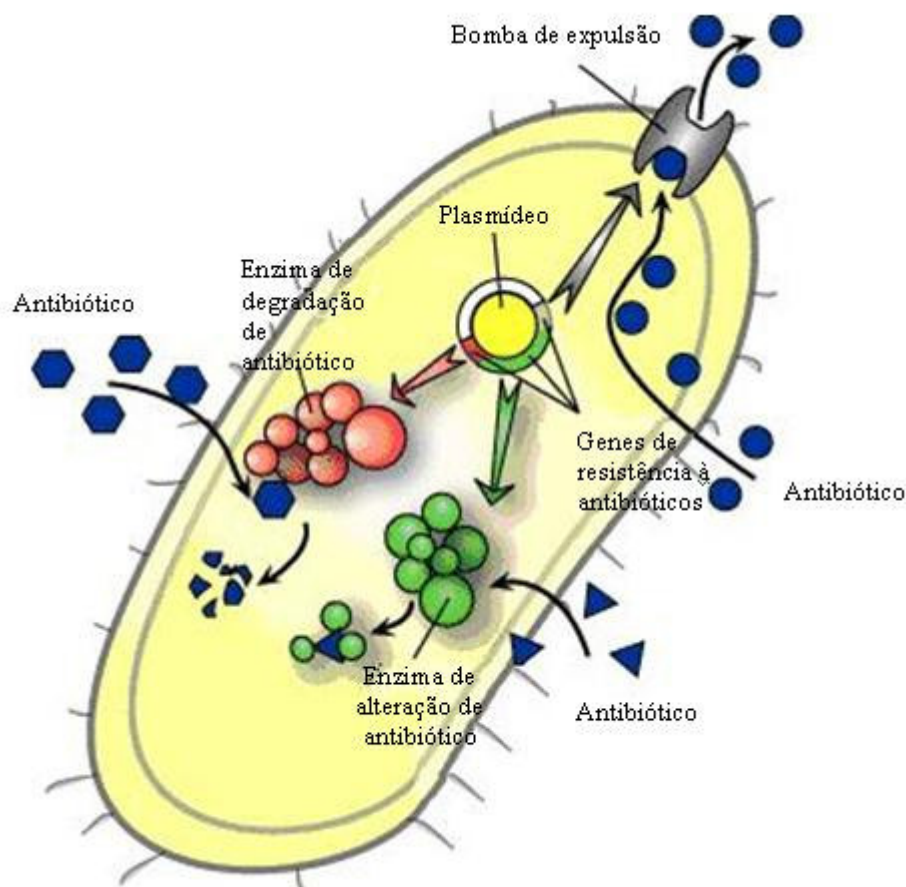


Figura 3. Esquema de uma célula bacteriana com o ataque de antibióticos e seus mecanismos de defesa. Em azul: antibióticos; em vermelho: enzimas de degradação de antibióticos; em verde: enzimas de alteração de antibióticos; em cinza: bombas de expulsão de antibióticos; ao centro: plasmídeo com os genes de resistência a antibióticos (BATES *et al.*, 2001). Adaptado de www.scq.ubc.ca.

Com o aumento da resistência a drogas pelos microrganismos, estima-se que aproximadamente 70% das bactérias que causam infecções são resistentes ao menos a uma das drogas comumente utilizadas para o tratamento. Alguns organismos são resistentes a todas as drogas já aprovadas e devem ser tratadas com novas drogas em fase experimental e potencialmente tóxicas.

A bactéria *Chromobacterium violaceum* possui genes de resistência a antibióticos do tipo beta-lactama (penicilina e cefalosporina), que são inibidores seletivos da síntese da parede celular. Possui também genes relacionados com a expulsão de drogas citotóxicas para o ambiente extracelular. A maquinaria genética desta bactéria conta ainda com resistência à bacitracina, biciclomicina,

cloramfenicol, kasugamicina e metilenomicina (FANTINATTI-GARBOGGINI *et al.*, 2004). Isto pode ajudar a explicar a comum resistência às drogas em infecções causadas por esta bactéria.

2.8 Genômica Comparativa e Ferramentas de Bioinformática

A busca pelo entendimento do código genético fez surgir os bioinformatas que desenvolvem algoritmos para facilitar a interpretação da codificação que o genoma de um microrganismo apresenta. O trabalho de bioinformatas disponibilizou publicamente uma grande quantidade de programas e servidores. Algumas destas ferramentas disponíveis publicamente na rede mundial de computadores encontram-se listados na Tabela 2.

Tabela 2. Programas e servidores disponíveis publicamente na Internet para análise de dados biológicos.

NOME	ENDEREÇO NA INTERNET	REFERÊNCIA
Bancos de Dados		
GenBank	www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank	(BENSON <i>et al.</i> , 2000)
PDB	www.rcsb.org/pdb/	(BERMAN <i>et al.</i> , 2000)
Alinhamento de Sequências		
BLASTP	www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/	(ALTSCHUL <i>et al.</i> , 1990)
CLUSTAL W	www.ebi.ac.uk/clustalw/	(JEANMOUGIN <i>et al.</i> , 1998)
BioEdit	www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit	(TIPPMANN, 2004)
Fontes de Procura por Proteína-Molde		
PHYRE	www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/	(KELLEY <i>et al.</i> , 2000)
3D-JIGSAW	www.bmm.icnet.uk/servers/3djigsaw/	(BATES <i>et al.</i> , 2001)
SWISS-MODEL	ca.expasy.org/spdbv/	(PEITSCH, 1996)
Modelagem de Proteínas		
3D-JIGSAW	www.bmm.icnet.uk/servers/3djigsaw/	(BATES <i>et al.</i> , 2001)
SwissPdbViewer	www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL	(KAPLAN e LITTLEJOHN, 2001)
PHYRE	www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/	(KELLEY <i>et al.</i> , 2000)
Validação de Modelos		
PROCHECK	www.biochem.ucl.ac.uk/~roman/procheck	(LASKOWSKI <i>et al.</i> , 1996)
VERIFY3D	nihserver.mbi.ucla.edu/Verify_3D/	(EISENBERG <i>et al.</i> , 1997)
Predição de Proteínas com Regiões Típicas de Membrana		
PRED-TMBB	bioinformatics.biol.uoa.gr/PRED	(BAGOS <i>et al.</i> , 2004)
HMM-TM	bioinformatics.biol.uoa.gr/HMM	(BAGOS <i>et al.</i> , 2006)

Dentro das instituições que disponibilizam publicamente este banco de dados biológicos, destaca-se o NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), sediado nos Estados Unidos, que disponibiliza o GenBank® (BENSON *et al.*, 2000). Este banco de dados concentra os principais sequenciamentos de genomas publicados mundialmente.

Para o alinhamento de seqüências de proteínas dispõe-se do servidor BlastP (ALTSCHUL *et al.*, 1990) que apresenta a identidade de uma seqüência de aminoácidos referindo-se à presença do mesmo aminoácido na mesma posição em duas seqüências alinhadas. Apresenta ainda a similaridade de uma seqüência, mensurando quantos aminoácidos similares estão presentes na mesma posição numa dada seqüência.

O alinhamento múltiplo, que compara ao mesmo tempo várias seqüências, baseia-se na expressão da semelhança evolutiva e estrutural entre as proteínas. Clustal W (JEANMOUGIN *et al.*, 1998) é um servidor que utiliza alinhamento progressivo criando uma árvore-guia baseado em análise filogenética. Esta estratégia produz alinhamentos razoáveis, podendo gerar imprecisões entre seqüências vagamente relacionadas. No entanto, a utilização de várias seqüências para criar perfis aumenta a precisão do alinhamento para seqüências mais vagamente relacionadas (GIBAS e JAMBECK, 2001).

Também entre as informações sobre proteínas disponíveis em servidores na Internet, dispõe-se da predição da hélice transmembrana. Esta predição, relacionada com a estrutura secundária, inclui o reconhecimento de regiões nas seqüências protéicas que podem ser inseridas nas membranas das células. Os métodos para prever as hélices transmembrana nas seqüências de proteínas identificam as regiões na seqüência que podem dobrar-se numa hélice e, ao mesmo tempo, existir no ambiente hidrofóbico da membrana. Entre os servidores de predição de hélice transmembrana disponíveis encontra-se o HMM-TM (<http://bioinformatics.biol.uoa.gr/HMM-TM/>).

Uma importante fonte na busca de informações sobre proteínas denomina-se PDB (*Protein Data Bank*) que disponibiliza publicamente a estrutura tridimensional de proteínas obtida por cristalografia por difração de raios-X ou por difração de ressonância magnética nuclear (NMR).

Uma metodologia bem sucedida na predição de estruturas tridimensionais constitui-se na modelagem comparativa ou modelagem por homologia. Esta modelagem baseia-se no conhecimento de que a conformação estrutural de uma proteína é mais conservada que sua seqüência durante o processo evolutivo e que pequenas mudanças nas seqüências resultam em sutis modificações na estrutura espacial (NAYEEM *et al.*, 2006). Entre as ferramentas de construção automatizada de estruturas protéicas encontra-se o 3D-JIGSAW (BATES *et al.*, 2001).

A obtenção de um modelo protéico virtual através de homologia envolve basicamente as etapas de: busca de proteínas com estruturas tridimensionais homólogas, alinhamento das seqüências, construção das coordenadas no espaço e a validação do modelo. Uma visualização esquemática é apresentada na Figura 4.

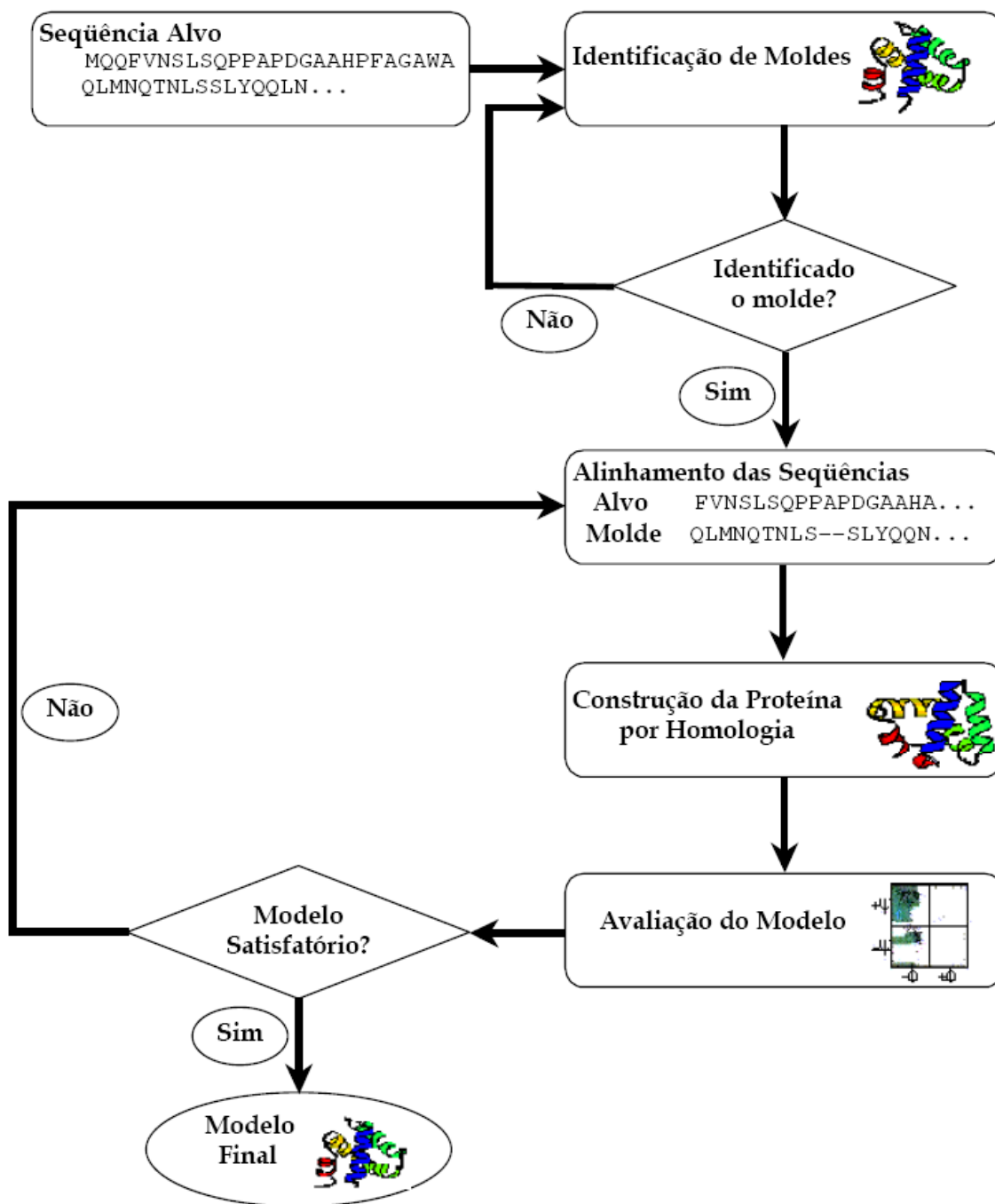


Figura 4. Esquema geral da modelagem de proteínas por homologia. Fonte: PIEMOLINI, 2004.

Ainda dentro da modelagem estrutural de proteínas existe também o método de reconhecimento do enovelamento/empacotamento de proteínas que está disponível num banco de dados, que é efetuado pelo servidor PHYRE (KELLEY *et al.*, 2000). A técnica de reconhecimento de estruturas tridimensionais

de proteínas é considerada eficiente, pois há um restrito número de diferentes maneiras pelas quais podem ser encontradas na natureza, em grande parte em função da evolução e das restrições impostas pelas leis da física e química.

Depois de gerado um modelo molecular protéico virtual, torna-se importante a avaliação do nível de qualidade e de confiabilidade do mesmo. Nesta etapa é avaliada a qualidade da estrutura espacial da proteína, possíveis erros estruturais em regiões localizadas e os parâmetros estereoquímicos (JOHNSON *et al.*, 1994). Um programa utilizado na avaliação dos parâmetros estereoquímicos (ângulos torsionais da cadeia principal e laterais) da proteína gerada é o chamado PROCHECK (LASKOWSKI *et al.*, 1996) que avalia a qualidade do gráfico de Ramachandran (RAMACHANDRAN *et al.*, 1963). O gráfico de Ramachandran define os resíduos que se encontram nas regiões energeticamente mais favoráveis e desfavoráveis e orienta a avaliação da qualidade de modelos teóricos ou experimentais de proteínas.

A validação de modelos estruturais construídos neste trabalho contempla também o uso do programa Verify3D (EISENBERG *et al.*, 1997), que avalia o ambiente do modelo tridimensional (3D) de cada resíduo com sua própria seqüência de aminoácido (1D), considerando um ambiente mediano o qual é encontrado num banco de dados de proteínas conhecidas. A cada resíduo é estabelecida uma probabilidade de estar neste ambiente.

CAPÍTULO III

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Ferramentas de Bionformática para Genômica Comparativa

Este trabalho emprega ferramentas de bioinformática disponíveis publicamente na rede mundial de computadores para realizar estudos de genômica comparativa. As ferramentas utilizadas foram: Clustal W, Phyre, 3D-JIGSAW, PRED-TMMB, HMM-TM, Procheck, Ramachandran, Verify 3D e uma descrição delas encontra-se na Secção Genômica Comparativa da Revisão Bibliográfica.

3.2 Bactérias Formadoras de Biofilmes Utilizadas para Estudo de Genômica Comparativa

Nas comparações realizadas foram utilizadas as seqüências de aminoácidos dos organismos listados na Tabela 3. Estes organismos com suas respectivas regiões genômicas foram selecionados para este estudo pela sua comprovada ligação com a formação de biofilmes ou de produção de polissacarídeos, como descrito na Revisão Bibliográfica. Para tanto, foram utilizados o operon *pgaABCD* de *Escherichia coli* (linhagem K12), *icaADBC* de *Staphylococcus epidermidis*, *hmsHFERS* de *Yersinia pestis* (linhagem KIM6+) e *hmsHFR-BP1941* de *Bordetella pertussis* (linhagem Tohama I). Todas estas regiões genômicas foram comparadas com o operon *hmsHFR-CV2940* da linhagem ATCC 12472 de *Chromobacterium violaceum*.

Tabela 3. Bactérias com respectivas regiões genômicas utilizadas no estudo comparativo.

Organismo e Número de Acesso GenBank	Número de Acesso no GenBank	Gene/ORF
<i>Chromobacterium violaceum</i> , ATCC 12472 NC_005085	NP_902610	CV2940
	NP_902611	<i>hmsR</i>
	NP_902612	<i>hmsF</i>
	NP_902613	<i>hmsH</i>
<i>Escherichia coli</i> , K12 NC_000913	P69435	<i>pgaA</i>
	P75906	<i>pgaB</i>
	P75905	<i>pgaC</i>
	P69433	<i>pgaD</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i> , DQ149646	AAZ78357	<i>icaA</i>
	AAZ78358	<i>icaD</i>
	AAZ78359	<i>icaB</i>
	AAZ78360	<i>icaC</i>
<i>Yersinia pestis</i> , KIM6+ YPU22837	AAB66588	<i>hmsH</i>
	AAB66589	<i>hmsF</i>
	AAB66590	<i>hmsR</i>
	AAB66591	<i>hmsS</i>
<i>Bordetella pertussis</i> , Tohama I NC_002929	NP_880625	BP1941
	NP_880626	<i>hmsR</i>
	NP_880627	<i>hmsF</i>
	NP_880628	<i>hmsH</i>

Cada polipeptídeo que é gerado por cada um dos genes listados na Tabela 3 foi comparado com a proteína de mesmo nome ou de provável domínio semelhante em todos os organismos deste estudo, segundo informação apresentada no GenBank (BENSON *et al.*, 2000). Este banco de dados, após uma procura por nome de proteína/ORF, apresenta sua seqüência de aminoácidos com seu provável domínio enzimático. Neste sentido, foram comparados os grupos de proteínas listados na Tabela 4.

Tabela 4. Grupos de proteínas utilizados para alinhamento múltiplo.

Proteína/ORF	Organismo
HmsR	<i>Y. pestis</i>
HmsR	<i>C. violaceum</i>
HmsR	<i>B. pertussis</i>
IcaA	<i>S. epidermidis</i>
PgaC	<i>E. coli</i>
HmsF	<i>Y. pestis</i>
HmsF	<i>C. violaceum</i>
HmsF	<i>B. pertussis</i>
PgaB	<i>E. coli</i>
IcaB	<i>S. epidermidis</i>
HmsH	<i>Y. pestis</i>
HmsH	<i>C. violaceum</i>
HmsH	<i>B. pertussis</i>
PgaA	<i>E. coli</i>
IcaC	<i>S. epidermidis</i>
HmsS	<i>Y. pestis</i>
CV2940	<i>C. violaceum</i>
BP1941	<i>B. pertussis</i>
PgaD	<i>E. coli</i>
IcaD	<i>S. epidermidis</i>

Uma aproximação inicial entre os grupos de proteínas (Tabela 4) foi realizada utilizando-se o servidor Clustal W (JEANMOUGIN *et al.*, 1998), através de alinhamento múltiplo, no intuito de identificar possíveis resíduos conservados entre as proteínas em estudo. O servidor Clustal W realiza o alinhamento múltiplo baseando-se na semelhança evolutiva entre as proteínas, identificando, desta forma, aminoácidos essenciais na função da proteína. As seqüências dos grupos de proteínas (Tabela 4) para análise no Clustal W, foram obtidas no GenBank (BENSON *et al.*, 2000) com arquivos no formato "Fasta". Para a identificação de aminoácidos críticos foram utilizados como parâmetro àqueles essenciais na formação de biofilmes em *Y. pestis* (FORMAN *et al.*, 2006). O alinhamento gerado no formato ".aln" foi então visualizado no programa BioEdit (TIPPMANN, 2004).

Como algumas proteínas possuem localização na membrana externa, utilizou-se o servidor PRED-TMMB para prever a distribuição dos aminoácidos na membrana. Este servidor prevê e discrimina proteínas com o domínio β -barril (em

forma de barril fechado) na membrana externa de bactérias Gram-negativas baseado na estrutura de 16 proteínas de membrana externa conhecidas em nível de resolução atômica (BAGOS *et al.*, 2004). Para esta análise foi submetido a seqüência de aminoácidos da proteína HmsF de *Chromobacterium violaceum* ATCC12472 e HmsF de *Y. pestis* KIM6+.

A predição de proteínas transmembrana com domínio α -hélice foi realizada pelo servidor HMM-TM (BAGOS *et al.*, 2006). Este servidor utiliza algoritmos de cálculo probabilístico baseado no Modelo de Hidden Markov para prever a existência de uma proteína na membrana, discriminando os aminoácidos com conformação espacial em α -hélice e que podem existir neste ambiente hidrofóbico. Foi efetuada a análise das proteínas de membrana HmsR e CV2940 de *C. violaceum* ATCC12472 e comparada com as proteínas HmsR e HmsS de *Y. pestis* KIM6+.

3.3 Modelagem Estrutural

A modelagem estrutural foi realizada pelos servidores 3D-JIGSAW (BATES *et al.*, 2001) e PHYRE (KELLEY *et al.*, 2000).

O servidor PHYRE gera um modelo de proteína baseado no reconhecimento do enovelamento de proteínas. O modelo é gerado inicialmente encontrando um molde através do alinhamento de seqüências, copiando as coordenadas e rotulando os resíduos de acordo com a seqüência-alvo (baseado no alinhamento). Para a geração de um modelo estrutural o servidor 3D-JIGSAW utiliza a modelagem comparativa (ou modelagem por homologia), obtendo a estrutura tridimensional de estruturas conhecidas com significativa homologia. Para isto, a proteína-alvo é “quebrada” em pequenos segmentos e então procurado num banco de dados um segmento que se iguala ao polipeptídeo que está sendo modelado. A procura no banco de dados baseia-se na similaridade de seqüência e conformacional e compatibilidade com a estrutura alvo. O modelo então é criado extraindo as coordenadas das posições alinhadas.

A visualização tridimensional da proteína gerada, dos moldes utilizados, bem como dos aminoácidos críticos na formação de biofilmes, foi efetuada pelo programa Swiss-PdbViewer (KAPLAN e LITTLEJOHN, 2001). Neste trabalho as estruturas secundárias foram padronizadas como vermelho para as α -hélices, amarelo para as folhas- β (ou folha pregueada) e verde para as regiões de loops (ou alças).

Para verificar a validade do modelo tridimensional foi utilizado o programa ProCheck (LASKOWSKI *et al.*, 1996), que apresenta a qualidade estereoquímica através do gráfico de Ramachandran (RAMACHANDRAN *et al.*, 1963). Este gráfico apresenta a estabilidade das ligações peptídicas da cadeia polipeptídica, analisando os ângulos de torção (ψ e Φ). A conformação da cadeia peptídica é descrita pelos ângulos na estrutura principal da proteína (ângulo entre o nitrogênio e carbono alfa ($N - C_{\alpha} = \Phi$ (phi) e ângulo entre o carbono alfa e carbono ($C - C_{\alpha} = \psi$ (psi)). A análise de um modelo tridimensional pelo gráfico de Ramachandran baseia-se em estruturas cristalográficas de 118 proteínas numa resolução melhor que 2,0 Å (LASKOWSKI *et al.*, 1993). Para esta análise das estruturas a alta resolução foram definidas regiões permitidas, adicionalmente permitidas, generosamente permitidas e proibidas. A região mais favorável no gráfico está expressa em vermelho, a região permitida em amarelo, a região generosamente permitida em amarelo claro e a não permitida em branco. As regiões vermelhas correspondem à conformação onde nenhum choque estereoquímico é observado, ou seja, onde encontram-se as α -hélices e folhas- β .

No intuito de uma verificação mais sólida e ampla da qualidade do modelo construído, efetuou-se uma análise pelo programa Verify3D (EISENBERG *et al.*, 1997). Este programa mede a compatibilidade entre o modelo da sua estrutura tridimensional com sua seqüência primária, através de um perfil 3D. Cada posição do resíduo na estrutura é caracterizado pelo seu ambiente químico considerando 3 parâmetros: área do resíduo que está no interior da proteína, a fração de área de cadeia lateral que está ocupada por átomos polares (O e N) e a estrutura

secundária local. A relação 3D-1D que tiver valores negativos indica que aquele aminoácido está num ambiente incorreto.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 O Operon *hms* em *Chromobacterium violaceum*

O operon *hms*HFR-CV2940 (ERMOLAEVA *et al.*, 2001) possui razoável identidade com *clusters* de genes de *Yersinia pestis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bordetella pertussis*, entre outros. Este trabalho procurou relacionar a função dos polipeptídeos do operon *hms* de *Chromobacterium violaceum* (Figura 5) com o grupo de genes das bactérias acima por estas já apresentarem uma relação comprovada com a produção de biofilmes e/ou de polissacarídeos.

Considerando que a semelhança de estrutura entre duas proteínas já é, em geral, suficiente para supor semelhança de função, a conservação do operon é então um forte indicativo de que as funções das proteínas por ele codificadas devam servir ao mesmo propósito. Neste sentido a estrutura do operon *hms* de *C. violaceum*, que inclui a ORF CV2940 é, portanto, compatível com a estrutura de genes sabidamente patológicos.

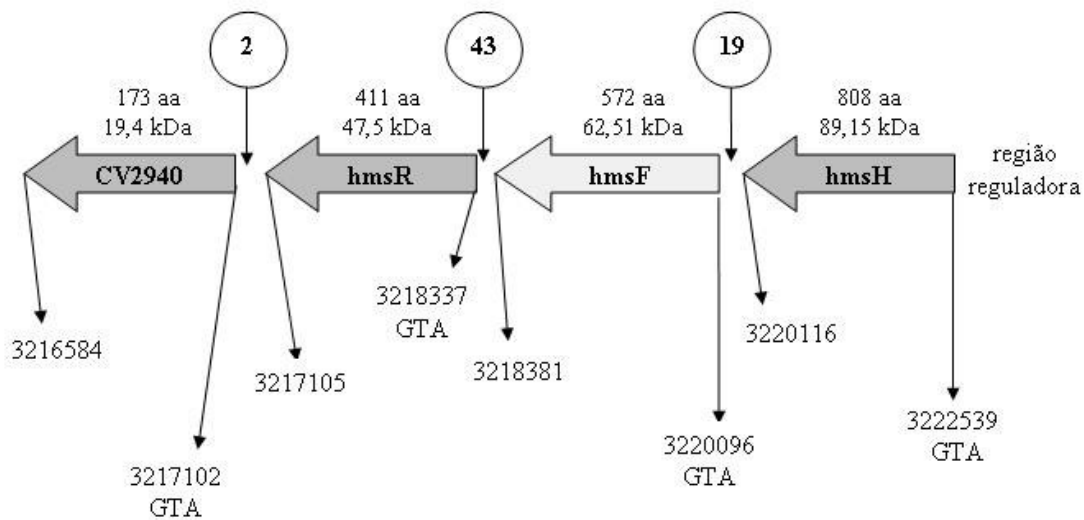


Figura 5. Esquema do operon *hms* em *C. violaceum*, codificado na fita reversa do DNA genômico. As setas indicam os genes/ORFs do operon. Os números acima das setas correspondem ao número de aminoácidos e ao peso molecular do polipeptídeo resultante de cada gene/ORF. Sob as setas está indicada a posição de início com o códon de início e, ainda, a posição de parada do respectivo gene/ORF. Os números que aparecem no interior dos círculos indicam a distância intergênica. As informações apresentadas foram obtidas do Brazilian National Genome Project Consortium (2003).

4.2 Conservação dos Resíduos Críticos e Localização das Enzimas

O gene *hmsR* em *C. violaceum* codifica um polipeptídeo com 411 aminoácidos, possuindo identidade com proteínas com domínio da família 2 glicosiltransferase (BRAZILIAN NATIONAL GENOME PROJECT CONSORTIUM, 2003), que possuem função essencial na polimerização de polissacarídeos. Acredita-se que esta enzima atue em conjunto com outras enzimas sintetizadas pelo mesmo grupo de genes (operon), utilizando-se, como substrato na formação do polissacarídeo, a molécula UDP-*N*-acetilglicosamina presente no citoplasma (VUONG *et al.*, 2004a). A proteína HmsR de *C. violaceum* localiza-se na membrana interna, apresentando os aminoácidos distribuídos nas regiões transmembrana conforme demonstrado nas Figura 6 e Figura 7.

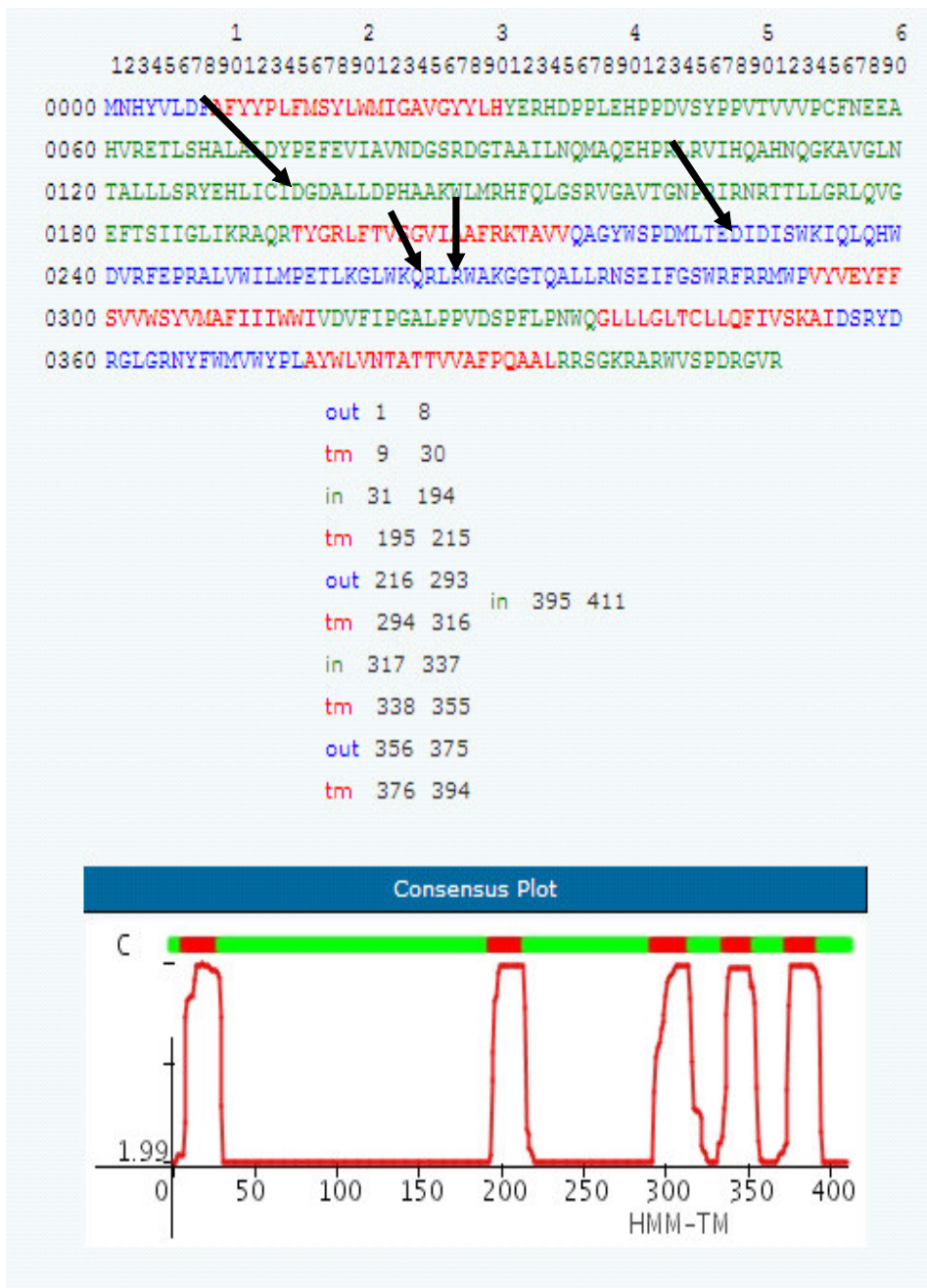


Figura 6. Predição das regiões transmembrana pelo servidor HMM-TM da proteína HmsR de *C. violaceum*. As flechas indicam a localização dos resíduos considerados essenciais para formação de biofilmes em *Y. pestis*. Em verde: região interna; em azul: região externa e em vermelho: região transmembrana.

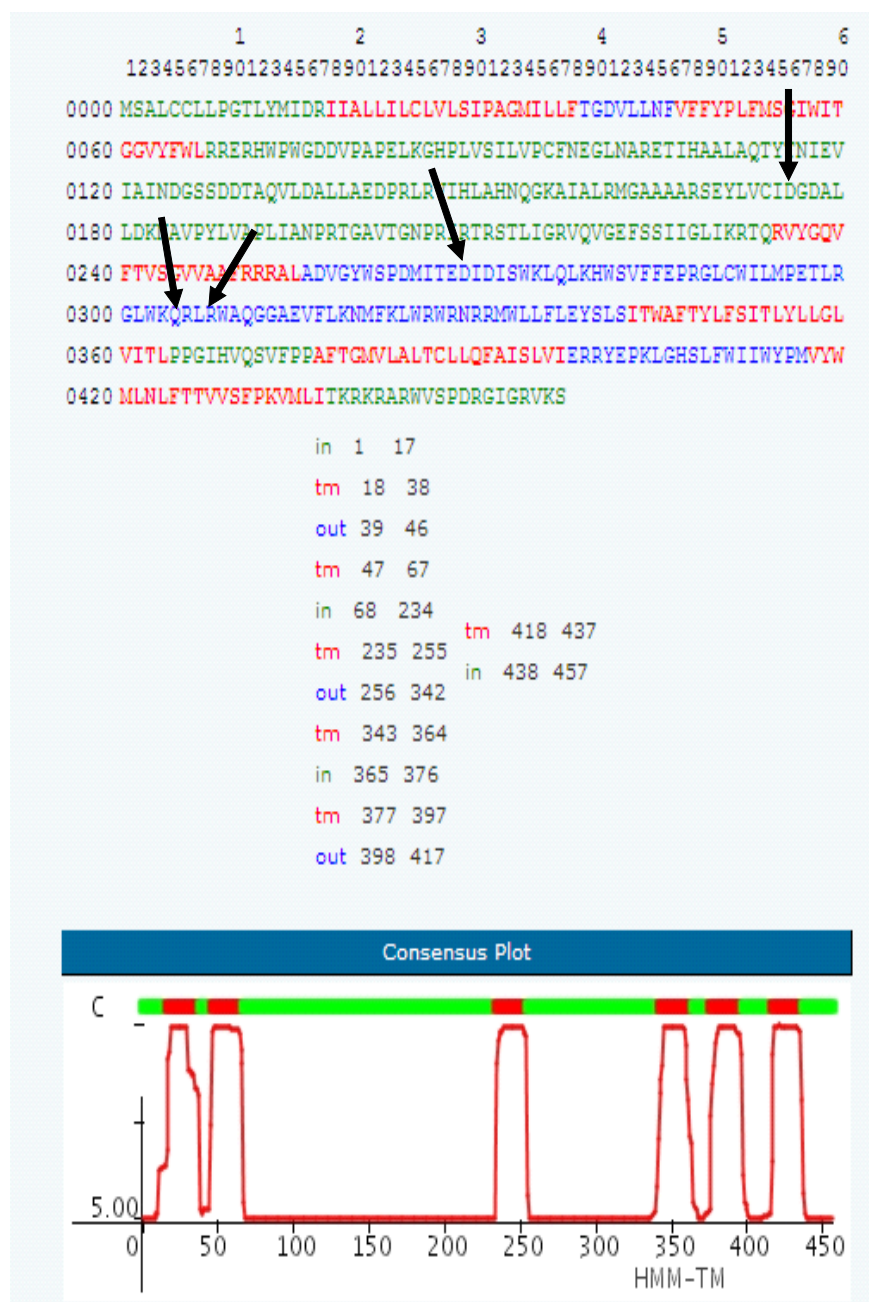


Figura 7. Predição das regiões transmembrana pelo servidor HMM-TM da HmsR de *Y. pestis*. As flechas indicam a localização dos resíduos considerados essenciais para formação de biofilmes em *Y. pestis*. Em verde: região interna; em azul: região externa e em vermelho: região transmembrana.

A revisão bibliográfica apresenta um trabalho realizado para identificar os resíduos de aminoácidos importantes na função desta proteína na formação de

biofilmes (FORMAN *et al.*, 2006). Na comparação por alinhamento múltiplo gerado pelo servidor Clustal W com outras prováveis proteínas glicosiltransferase, verifica-se que se conservam também em *C. violaceum* os aminoácidos críticos para produção de biofilmes (Figura 8). Um dos resíduos essenciais para produção de biofilmes identificados em *Y. pestis* é o aspartato ou ácido aspártico (D), de seqüência número 176. No alinhamento múltiplo verifica-se que este resíduo encontra-se conservado em todas as bactérias utilizadas no estudo, sendo que em *C. violaceum* este resíduo encontra-se na seqüência com o número D135. Outro aminoácido importante na formação de biofilmes, o aspartato (D) 269 em *Y. pestis*, também encontra-se conservado em todas as bactérias deste estudo e, em *C. violaceum*, é representado pelo aspartato (D) 228. O alinhamento múltiplo mostra ainda que o aminoácido glutamina (Q) 305, crítico para produção da matriz extracelular em *Y. pestis*, conserva-se em todos os organismos do estudo, e em *C. violaceum* é representado na seqüência de aminoácidos pelo número Q264. Outro aminoácido essencial na formação da matriz extracelular em *Y. pestis*, a arginina (R) 308, também está conservado em todos os organismos e, em *C. violaceum*, encontra-se no resíduo arginina (R) 267. A conservação também em *C. violaceum* destes aminoácidos, considerados essenciais para *Y. pestis*, indica que a proteína HmsR tem a mesma atuação na síntese da matriz extracelular.

<i>Y. pestis</i>	121	IAINDGSSDD	TAQVLDALLA	EDPRLRVIHL	AHNQGRKAIAL	RMGAAAARSE	YLVCTIDGDAL
<i>E. coli</i>	108	IAVNDGSTDK	TRAILDRMAA	QIPHLRVIHL	AQNQGRKAIAL	KTGAAAARSE	YLVCTIDGDAL
<i>C. violaceum</i>	80	IAVNDGSRDG	TAAILNQMAQ	EHPRLRVIHQ	AHNQGRKAVGL	NTALLLSRYE	HLICIDGDAL
<i>B. pertussis</i>	83	IAVNDGSRDN	TGALLNELAE	QYPRLLVVHQ	SRNEGKAIGL	NTAAQLSDAE	FLLCIDGDSL
<i>S. epidermidis</i>	80	IIINDGSSDN	TAEIIYDFRK	NHD-FKRVDL	EVNRGKANAL	NEGIRQASYE	YVMCIDADTV
<i>Y. pestis</i>	181	LDKNAVPELV	APLIANPRTG	AVTGNPRIPT	RSTLIGRVQV	GEFSSIIGLI	KRTQRVYGQV
<i>E. coli</i>	168	LDRDAAAYIV	EPMLYNPRVG	AVTGNPRIPT	RSTLVGKIQV	GEYSSIIGLI	KRTQRIYGNV
<i>C. violaceum</i>	140	LDPHAAKWLW	RHFQLGSRVG	AVTGNPRIRN	RTLLGRIQV	GEFTSIIGLI	KRAQRTYGR
<i>B. pertussis</i>	143	PHPDSITYML	THFLHAGHVG	AVTGNPRIRN	RSTVLGRMQV	GEFSSIVGLI	KRTQQLYGKL
<i>S. epidermidis</i>	139	IDDDAPFYMI	EDFKKNPKLG	AVTGNPRIRN	KSSILGKIQT	IEYASIIIGCI	KRSQSLAGAI
<i>Y. pestis</i>	241	FTVSGVVAAF	RRRALADVGY	WSPDMITEDI	DISWKLQKHK	WSVFFEPGRGL	CMILMPETLR
<i>E. coli</i>	228	FTVSGVIAAF	RRSALAEVGY	WSDDMITEDI	DISWKLQLNQ	WTIFYEPRAL	CMILMPETLK
<i>C. violaceum</i>	200	FTVSGVIAAF	RKTAVVQAGY	WSPDMLTEDI	DISWKIQLOH	WDVRFEPRAL	VMILMPETLK
<i>B. pertussis</i>	203	MTVSGVMTMF	RKQALHQVGY	WSPDMQTEDE	DISWKLQLAG	WTLRYEPRAL	TWILMPETFR
<i>S. epidermidis</i>	199	NTISGVFTLF	KKSALKDVGY	WDTDMITEDI	AVSWKLHLFD	YEIKYEPRAL	CMMLVPETIG
<i>Y. pestis</i>	301	GLWFRQRLRWA	QGGAEVFLKN	MFKLWRWRNR	RMWLLFLEYS	LSITWAFTYL	FSITLYLLGL
<i>E. coli</i>	288	GLWFRQRLRWA	QGGAEVFLKN	MTRLWRKENF	RMWELFFEYC	LTITWAFTCL	VGFIYAVQL
<i>C. violaceum</i>	260	GLWFRQRLRWA	KGGTQALLRN	SEIFGSRFR	RMWVYVEYF	FSVVWSYVMA	FIIIIWIVDV
<i>B. pertussis</i>	263	GLFRQRYRWA	RGGIETALKY	APRMLNPRQI	LMWEIFLEFS	LSVLWAYAML	FLICMAVLGQ
<i>S. epidermidis</i>	259	GLWFRQRLRWA	QGGHEVLLRD	FWPTIKTKKL	SLYILMFEQI	ASITWVYIVL	CYLSFLVITA

Figura 8. Parte do alinhamento múltiplo de HmsR de *C. violaceum* comparado com HmsR de *Y. pestis*; PgaC de *E. coli*; IcaA de *S. epidermidis* e HmsR de *B. pertussis*. Estão demarcados os resíduos críticos conservados: aspartato (D), glutamina (Q) e arginina (R).

4.2 Modelagem Tridimensional e Localização dos Resíduos Críticos

Para visualização tridimensional da proteína com suas regiões catalíticas, construiu-se um modelo para o polipeptídeo codificado pelo gene *hmsR* de *C. violaceum*. O servidor 3D-JIGSAW utilizou como molde a proteína SpsA (Figura 9), uma glicosiltransferase da família 2 registrada no banco de dados PDB pelo código 1qg8 (CHARNOCK e DAVIES, 1999). Estas enzimas podem catalisar a inversão de nucleotídeos-difosfatos alfa-ligados para formação de produtos beta-ligados. Dentro dos substratos para a ocorrência deste mecanismo catalítico pode estar a molécula UDP-*N*-acetilglicosamina. Embora estudos complementares com técnicas de obtenção direta sejam necessários, pode-se cogitar que a proteína HmsR em *C.*

violaceum também possa utilizar este nucleotídeo difosfato alfa-ligado, geralmente presente no citosol nas bactérias, para produzir o polissacarídeo com ligações beta poli(beta-1,6-*N*-acetil-D-glicosamina).

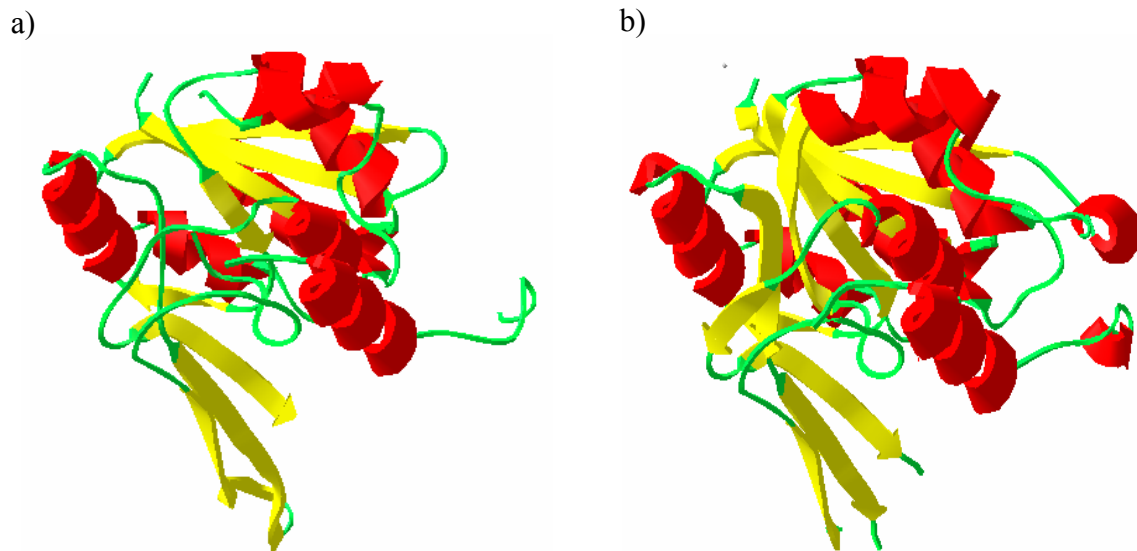


Figura 9. Modelo estrutural tridimensional da proteína HmsR de *C. violaceum* (a) e do molde utilizado 1qg8 (b).

A modelagem estrutural gerada (Figura 10) apresenta os aminoácidos críticos para a função desta proteína na formação de biofilmes dispostos tridimensionalmente muito proximamente. Tal disposição espacial entre resíduos essenciais na atividade de uma enzima, numa análise inicial, é geralmente associada a um sítio catalítico (MATHEWS, 2000). Estão presentes nesta região catalítica os resíduos conservados entre as espécies deste estudo: aspartato (D 135), aspartato (D 228), glutamina (Q264) e arginina (R 267), numa conformação espacial com capacidade para envolver com esta região um possível substrato.

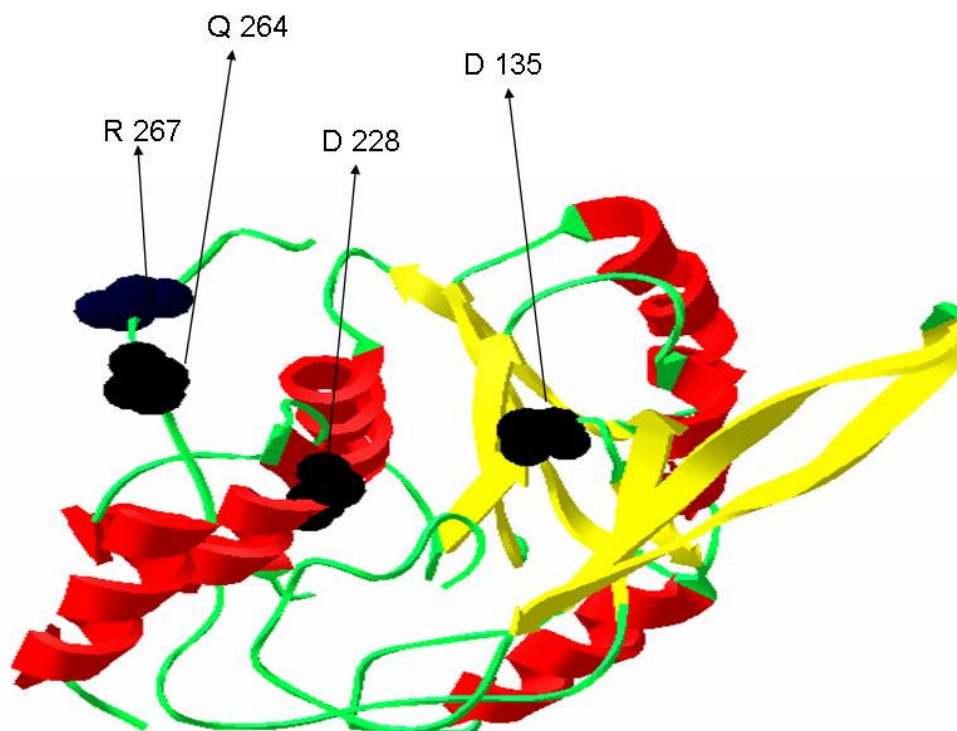


Figura 10. Modelo construído da proteína HmsR de *C. violaceum* com localização espacial dos resíduos críticos: aspartatos D135 e D228, glutamina Q264 e arginina R267.

A análise do modelo tridimensional gerado para HmsR de *C. violaceum* mostrou, através do gráfico de Ramachandran, que o modelo possui 99,1% dos resíduos em regiões energeticamente permitidas, demonstrando boa qualidade estereoquímica (Figura 11). Na avaliação ambiental de cada resíduo de aminoácido, o programa Verify3D apresentou duas regiões (resíduos 175 a 187 e 230 a 237) com relação 3D-1D negativos, indicando um provável enovelamento incorreto nesta região. A análise também mostrou que os aminoácidos com provável função catalítica (D135, D228, Q264 e R267) encontram-se em ambiente considerado possível.

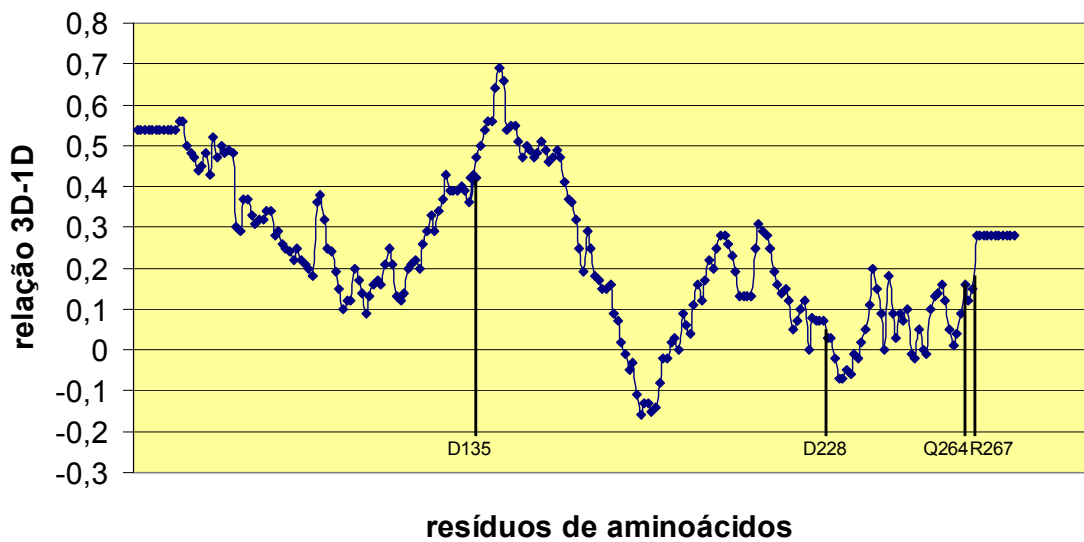
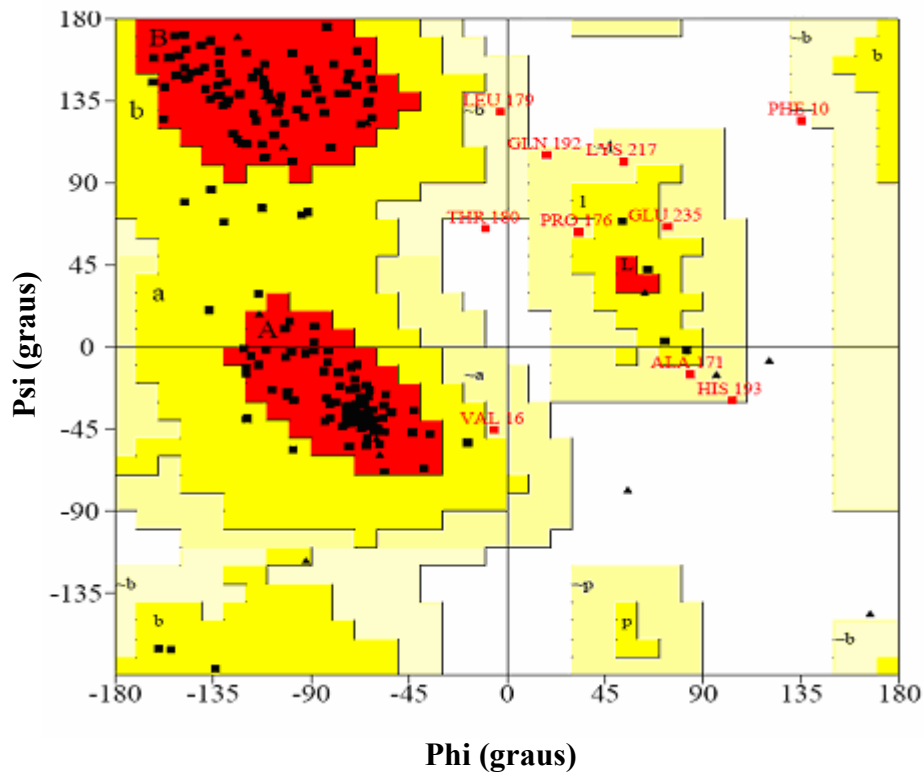


Figura 11. Gráfico de Ramachandran para o modelo tridimensional gerado HmsR de *C. violaceum* (acima) e (abaixo) gráfico apresentando resultados do programa Verify3D com resíduos demarcados aspartato D135, D228, glutamina Q264 e arginina R267.

O gene *hmsF* de *C. violaceum* codifica um polipeptídeo de 572 aminoácidos com localização subcelular na membrana externa com conformação prevista semelhante ao polipeptídeo HmsF de *Y. pestis* (Figura 12) e domínio com função de enzimas que desacetilam polissacarídeos (BRAZILIAN NATIONAL GENOME PROJECT CONSORTIUM, 2003). A desacetilação de polissacarídeos possui importante papel na formação de biofilmes, pois acredita-se que modifique a carga elétrica do polissacarídeo em formação facilitando a aderência à superfície bacteriana (VUONG *et al.*, 2004a).

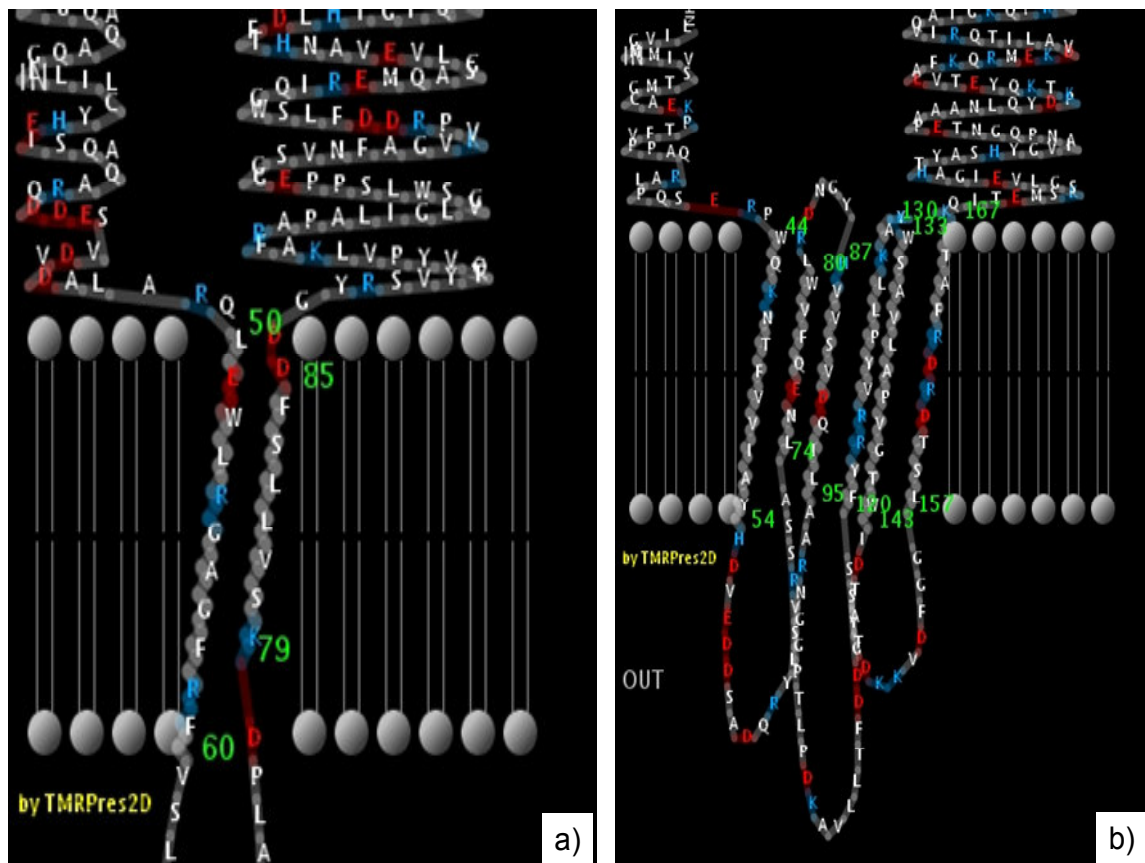


Figura 12. Predição da distribuição dos aminoácidos na membrana externa pelo servidor PRED-TMMB da proteína HmsF de *C. violaceum* (a) e de HmsF de *Y. pestis* (b).

O alinhamento múltiplo entre os organismos deste estudo mostra que a HmsF de *C. violaceum* conserva os aminoácidos considerados críticos para a formação de matriz extracelular em biofilmes (Figura 13). Os aminoácidos

aspartato D114 e D115 da proteína HmsF de *Y. pestis*, que possuem função na atividade desacetilase de HmsF, conservam-se em todos os organismos relacionados na pesquisa, e em *C. violaceum* conservam-se correspondendo aos aspartatos D86 e D87. Outro aminoácido que influencia na formação da matriz extracelular em *Y. pestis* é a histidina H184, que no alinhamento conserva-se em todas as bactérias deste trabalho e em *C. violaceum* corresponde ao aminoácido H156. Também o aminoácido crítico na formação de biofilmes, o triptofano W143 em *Y. pestis*, mostra-se conservado em quase todas as bactérias analisadas, divergindo somente da única bactéria Gram-positiva analisada neste estudo, a *S. epidermidis*. Este aminoácido corresponde em *C. violaceum* ao resíduo W115.

<i>Y. pestis</i>	89	VSVDQILAAR	NGGPTLPDKA	VLLTFDDGYS	SFYRRVYPLL	KAYKWSAVLA
<i>E. coli</i>	89	VSIAQIREAH	RGGKPLPEKA	VVLTFDDGYQ	SFYTRVFPIL	QAFQWPAVWA
<i>B. pertussis</i>	88	ISMQQIIDS	AGVRPLPPRP	ILLTFDDGYA	STYTKVFPLL	KRFNYPAVVA
<i>C. violaceum</i>	61	VSLDDAMAAR	AGGPAEPDKS	VLLSFDDGYR	SVYTQVYPVL	KAFRAPALIG
<i>S. epidermidis</i>	96	LTLKEFIKYK	EKGK-FPKRS	VWINEFDDMDQ	TIYDNAFPVL	KKYHIPATGF
<i>Y. pestis</i>	139	PVGTWIDTAT	DKKVDFGG-L	STDRDRFATW	KQITEMSKSG	LVEIGAHTYA
<i>E. coli</i>	139	PVGSWVDTPA	DKQVKFGD-E	LVDREYFATW	QQVREVARSR	LVELASHTWN
<i>B. pertussis</i>	138	VVTSMWDAPA	GTKIRLSPKI	EVPHDFMTW	AQLREMAQSG	LVELASHSHN
<i>C. violaceum</i>	111	LVGSWLSPEE	GGSVNFAG-V	KVPRDDFLSW	GQIREMQASG	LVEVANHTFD
<i>S. epidermidis</i>	145	LITNHIGSTN	FHNLNLLS--	-----K	QQLDEMYETG	LWDFESHTHD

Figura 13. Parte do alinhamento múltiplo da HmsF de *C. violaceum* comparado com PgaB de *E. coli*; IcaB de *S. epidermidis*; HmsF de *Y. pestis* e HmsF de *B. pertussis*. Estão demarcados os resíduos críticos para formação de matriz extracelular em *Y. pestis*: D (aspartato), W (triptofano) e H (histidina).

Na obtenção do modelo tridimensional de HmsF de *C. violaceum* (Figura 14), o servidor 3D-JIGSAW utilizou como molde a proteína *SpPgdA*, codificada no PDB como 2c1g (BLAIR *et al.*, 2005), uma desacetilase de *N*-acetil-glicosamina. A desacetilação envolve principalmente resíduos aspartato (D) e histidina (H), com a co-participação de resíduos triptofano (W). O modelo gerado apresentando a

localização espacial dos resíduos considerados críticos na formação de biofilmes para *Y. pestis* (Figura 14) mostra que eles encontram-se proximamente localizados no espaço. Embora a efetiva comprovação possa ser feita apenas com técnicas diretas de reações substrato-enzima, pode-se supor previamente que este modelo possui uma região catalítica de uma enzima desacetilase para resíduos *N*-acetilglicosamina. Como a proteína IcaB da bactéria Gram-positiva *S. epidermidis* atua na superfície externa celular, onde é efetuada a desacetilação do polissacarídeo, e na bactéria Gram-negativa *E. coli* seu homólogo PgaB funciona na exportação do polissacarídeo, pode-se sugerir que a desacetilação tenha função biológica distinta nestas duas espécies de bactérias. Embora o modo de ação na síntese de polissacarídeos seja distinto, seu papel no conjunto é largamente aceito. Portanto, sendo *C. violaceum* uma bactéria Gram-negativa, como o é a *E. coli*, é mais provável que a HmsF funcione de modo semelhante à PgaB, já que possuem o mesmo tipo de membrana celular.

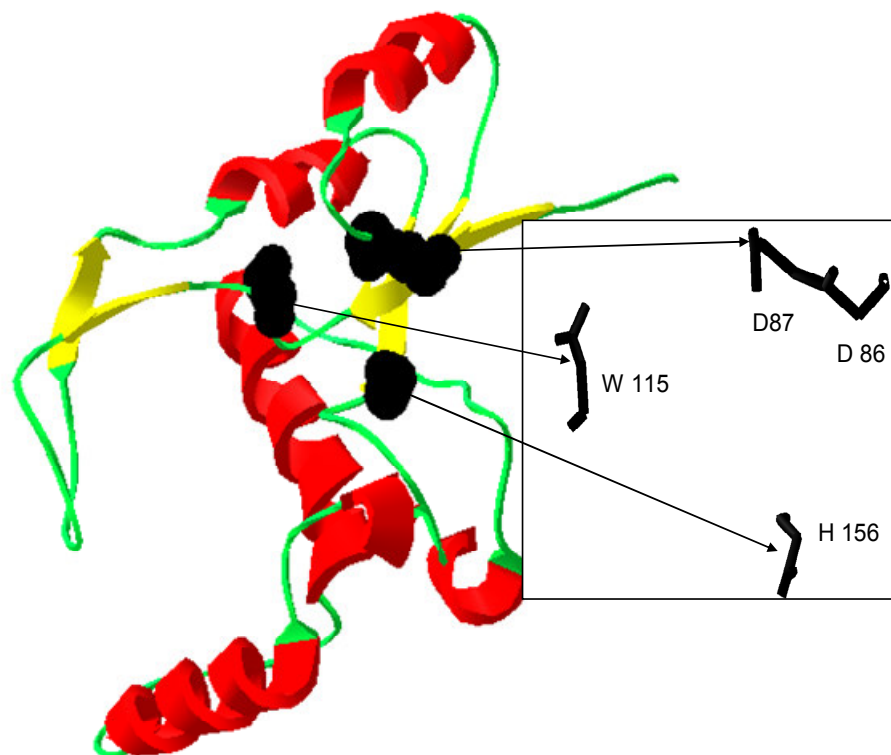


Figura 14. Estrutura tridimensional de HmsF de *C. violaceum* com resíduos críticos localizados em posição favorável à conservação da função.

Na verificação do modelo estrutural gerado, constatou-se uma boa qualidade estereoquímica, com o gráfico de Ramachandran (Figura 15) apresentando 98,5% dos resíduos em regiões permitidas. O modelo também mostra uma boa qualidade quando comparado com os resultados obtidos no programa Verify3D, apresentando a maioria dos aminoácidos com relação 3D-1D positiva.

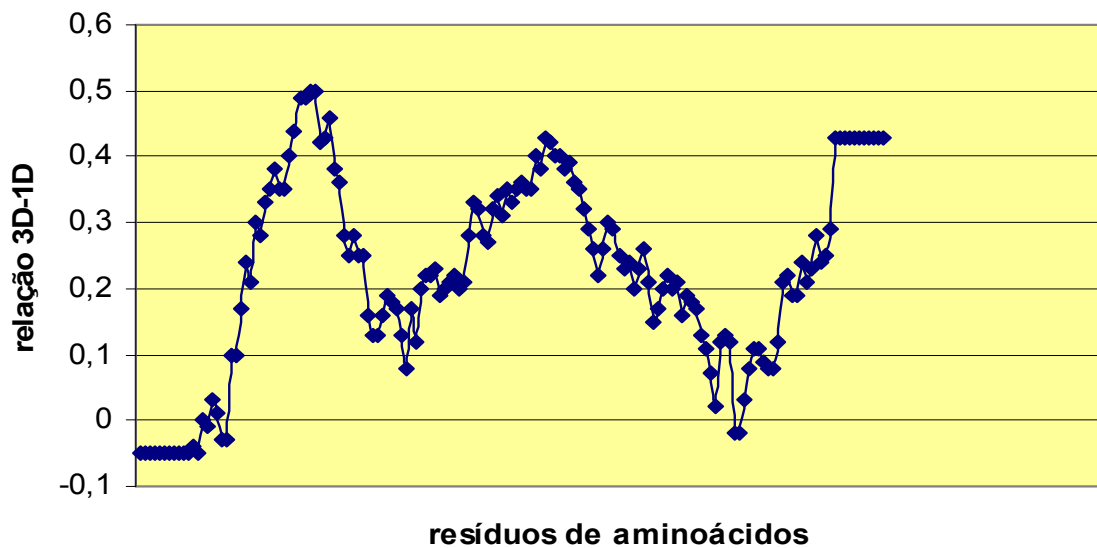
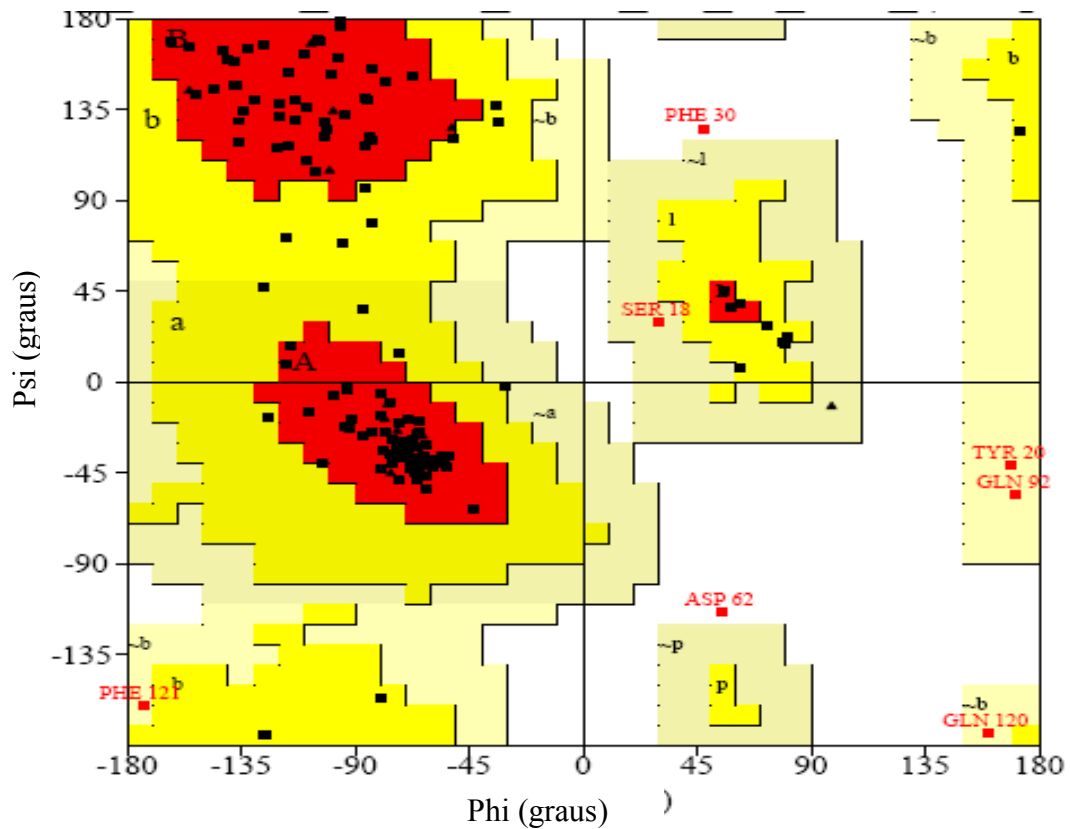


Figura 15. Gráfico de Ramachandran pelo modelo estrutural 3D gerado de HmsF de *C. violaceum* (acima) e gráfico dos resultados gerados pelo programa Verify3D (abaixo).

O gene *hmsH* de *C. violaceum* é o maior do operon *hmsHFR-CV2940* (ERMOLAEVA *et al.*, 2001), codificando 808 aminoácidos e possuindo localização subcelular na membrana externa (BRAZILIAN NATIONAL GENOME PROJECT

CONSORTIUM, 2003), de forma semelhante ao que ocorre na proteína HmsH de *Y. pestis*.

No alinhamento múltiplo efetuado, observa-se que o resíduo arginina R113 que teve uma fraca atuação na formação de biofilmes em *Y. pestis* (FORMAN *et al.*, 2006), e que em *C. violaceum* corresponde ao resíduo R104, conserva-se em quase todos os organismos estudados, apenas não se conservando em *S. epidermidis*, uma bactéria Gram-positiva (Figura 16). Sugere-se que o fato do resíduo arginina, de consenso entre as bactérias Gram-negativas, e não presente na bactéria Gram-positiva *S. epidermidis*, pode ter relação com a composição diferenciada das membranas celulares destas duas divisões de bactérias, visto que as bactérias Gram-positivas não possuem a membrana externa. Embora a importância funcional dos resíduos nesta proteína não esteja clara, a localização subcelular desta proteína na membrana externa em ambas as bactérias Gram-negativas *C. violaceum* e *Y. pestis*, reforça a hipótese de similaridade de função.

<i>E. coli</i>	97	PARGYAAVAV	AYRNLQQWQN	SLTLWQKALS	LEPQNKDYQR	GQILTLADAG
<i>Y. pestis</i>	101	SSRGLASAAR	AYRNEKRWDQ	ALALWQSSLK	KDPTNPDLIS	GMIMTQADAG
<i>B. pertussis</i>	6	TRRTRPASVR	GIRRRLLVA	GLAFVGA AAA	AAPS----VR	DQVQEASRSG
<i>C. violaceum</i>	92	SAPTLRLLAS	AARDRHDIAS	AVELYRRLPE	KQRD-ASWLA	ALAMAQAEAG
<i>S. epidermidis</i>	1	-----	-----	-----	-----	-----
<i>E. coli</i>	147	HYDTALVKLK	QLNSGAPD--	-KANLLAEAY	IYKLAGRHQD	ELRAMTESLP
<i>Y. pestis</i>	151	RGGVVLKQAT	ELAERDPT--	-VQNYMTLSY	LNRATDRNYD	ALQASSEAVR
<i>B. pertussis</i>	52	AANLALDLAT	EHR-----	-----	-ALFTPLEYA	QLQHA AIAQR
<i>C. violaceum</i>	141	ADSQALATLD	AADGKGGAGS	ALERARARAY	VLAAGPESAR	ALAYAQSALA
<i>S. epidermidis</i>	1	-----	-----	-----	-----	-----
<i>E. coli</i>	194	ENASTQQYPT	EYVQALRNN-	-----QLAAA	IDDANLT---	--PDIRADIH
<i>Y. pestis</i>	198	LAPTSEEVLK	NHLEILQRNR	I-VEPALRLA	KENPNLVSAE	HYRQLERDAA
<i>B. pertussis</i>	84	LRWSRAETWN	-----	-----	-----	-----
<i>C. violaceum</i>	191	RFPDDPDLAR	TYVGLLLRLH	APFEAAAAMT	RYRLKDFVLQ	SRAELDQAAM
<i>S. epidermidis</i>	1	-----	-----	-----	-----	-----

Figura 16. Parte do alinhamento múltiplo comparando: HmsH de *C. violaceum*; HmsH de *Y. pestis*; HmsH de *B. pertussis*; PgaA de *E. coli* e IcaC de *S. epidermidis*. Encontra-se demarcado o resíduo arginina (R) de efeito moderado na formação de biofilmes em *Y. pestis*.

A construção do modelo tridimensional, efetuada pelo servidor PHYRE, que utilizou como parâmetro a cadeia A da proteína-molde registrada no PDB sob código 1w3b (JINEK *et al.*, 2004), resultou na proteína apresentada na Figura 17. A utilização como molde da proteína 1w3b denota uma grande importância, pois esta possui atividade aditiva de *N*-acetilglicosamina (GlcNac) (JINEK *et al.*, 2004), que é a unidade básica do polissacarídeo poli(β -1,6-*N*-acetil-D-glicosamina). O domínio de repetidos tetratricopeptídeos (TPR) presentes na composição tridimensional deste polipeptídeo, possuindo função de transportador de proteínas (HAUCKE *et al.*, 1996), aliado à especificidade de ligação ao possível substrato UDP-GlcNac (KREPPPEL e HART, 1999), indica que o modelo tridimensional HmsH de *C. violaceum* gerado pode utilizar-se deste substrato para sintetizar o polissacarídeo poli(β -1,6-*N*-acetil-D-glicosamina).

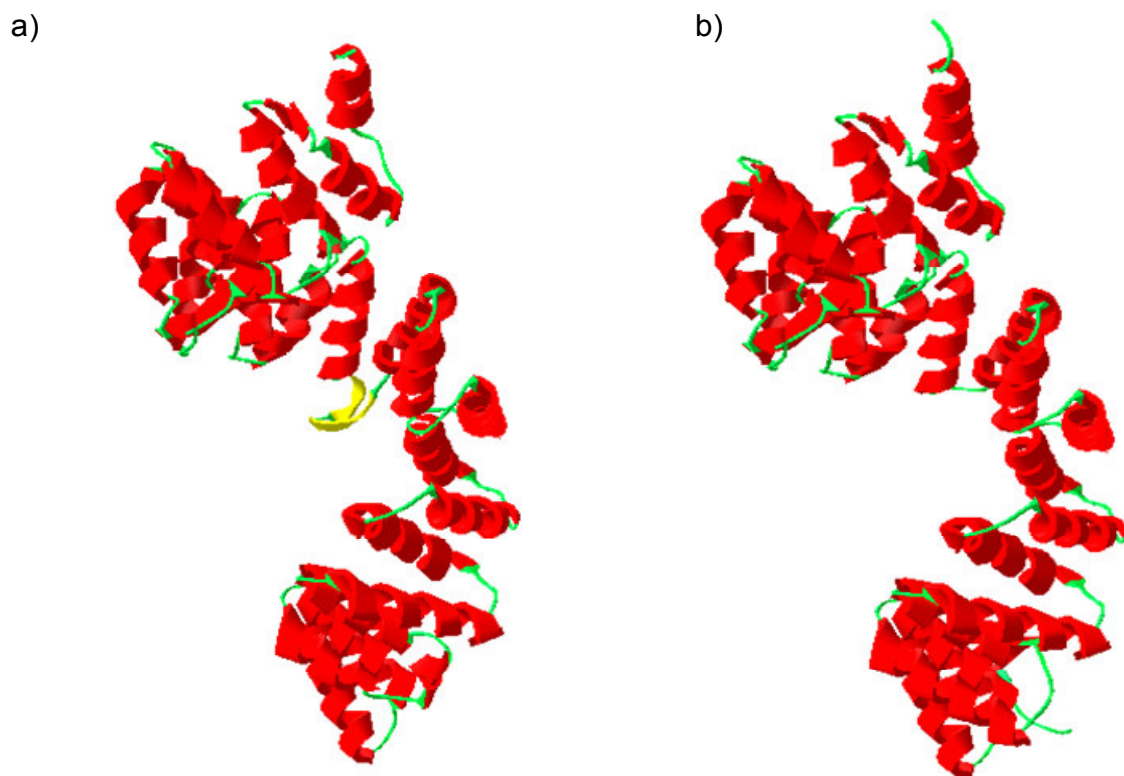


Figura 17. Modelo tridimensional da proteína HmsH de *C. violaceum* construída (a) comparada com a proteína molde 1w3b cadeia A (b).

O modelo tridimensional gerado apresenta a localização espacial do aminoácido arginina R104 (Figura 18).

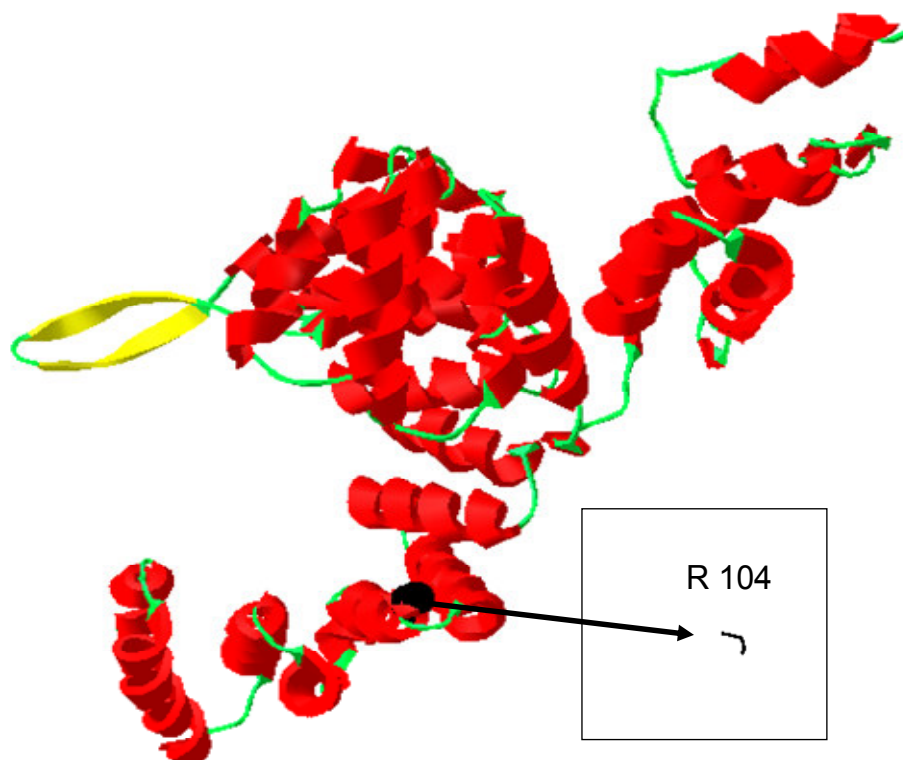


Figura 18. Modelo tridimensional de HmsH de *C. violaceum* gerado com a identificação e localização espacial do aminoácido arginina R104.

A confiabilidade do modelo da HmsH de *C. violaceum* apresentado evidencia-se pela sua boa qualidade estereoquímica, uma vez que 99,4% dos resíduos estão em regiões energeticamente permitidas no gráfico de Ramachandran (Figura 19). A boa qualidade do modelo gerado acentua-se na análise dos resultados obtidos pelo programa Verify3D, que apresenta todos os aminoácidos com relação 3D-1D positiva.

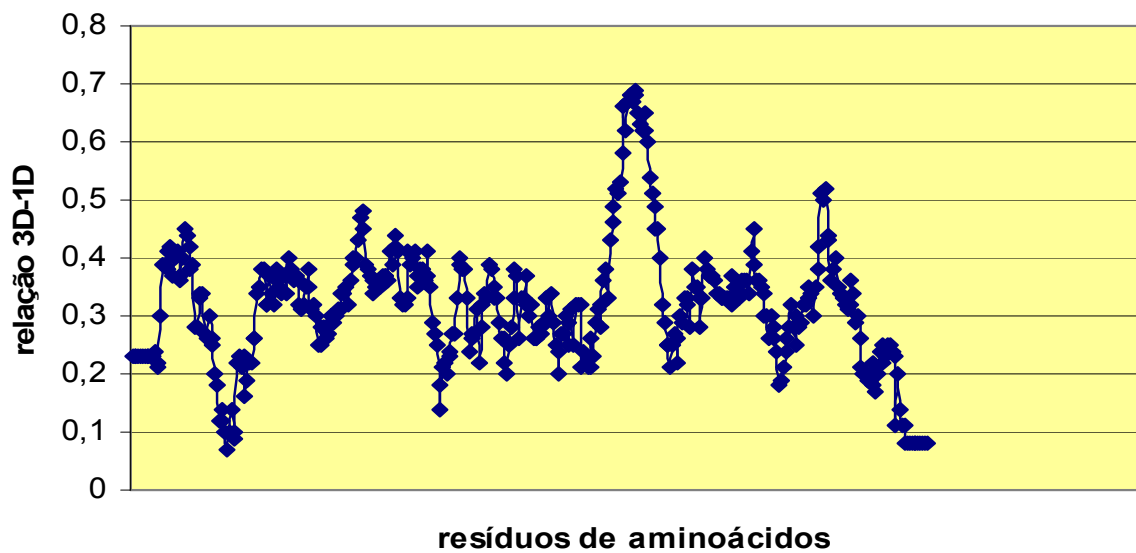
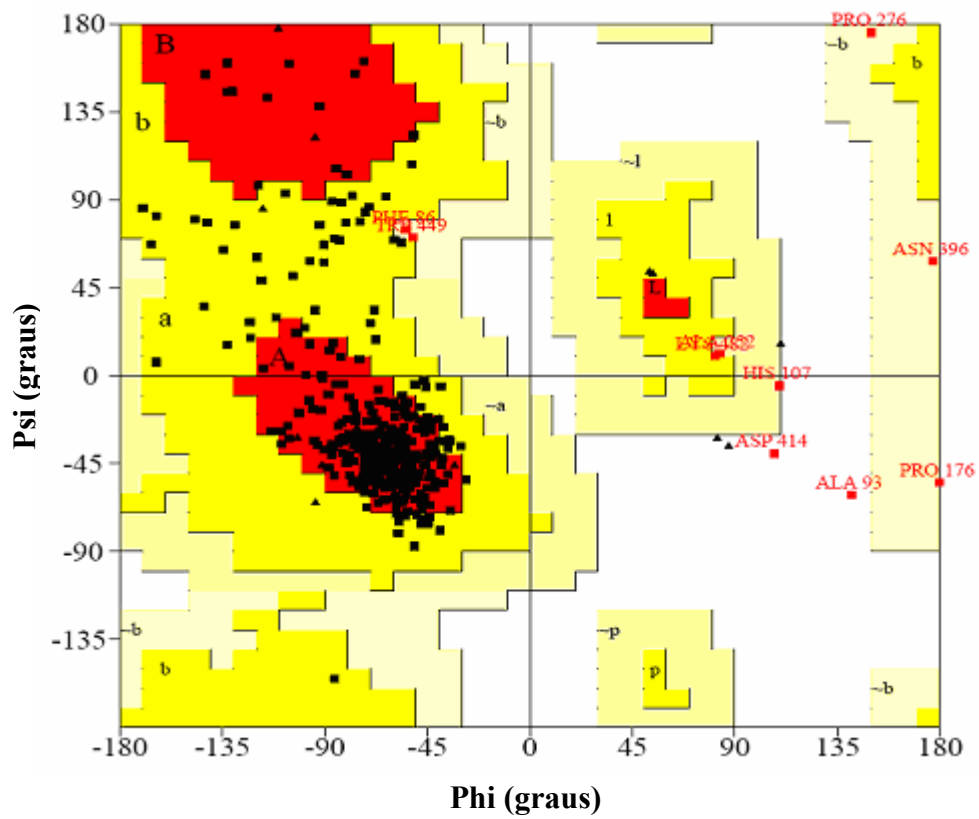


Figura 19. Gráfico de Ramachandran analisando o modelo 3D da proteína HmsH de *C. violaceum* (acima) e gráfico apresentando resultados do programa Verify3D (abaixo).

CV2940 é a menor proteína do operon *hmsHFR-CV2940*, codificando apenas 173 aminoácidos, com a predição de 2 regiões transmembrana com localização na membrana interna (Figura 20) realizada pelo servidor HMM-TM (<http://bioinformatics.biol.uoa.gr/HMM-TM>).

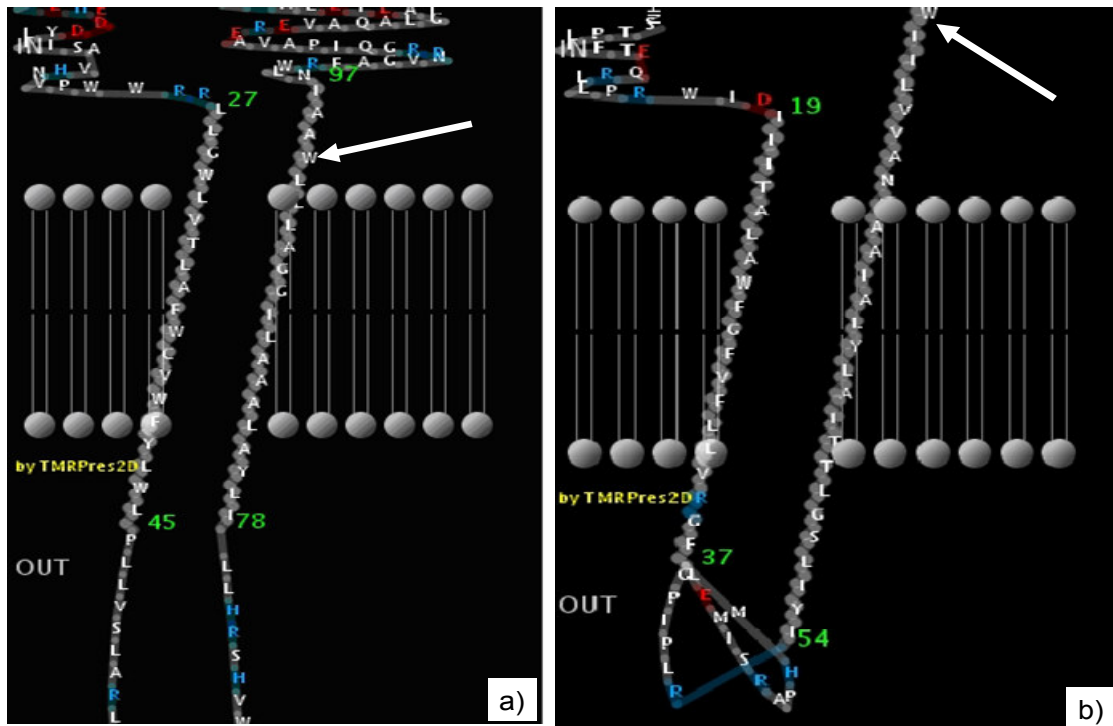


Figura 20. Predição do servidor HMM-TM com as regiões transmembrana da proteína CV2940 de *C. violaceum* (a) e HmsS de *Y. pestis* (b). As setas localizam o aminoácido crítico na formação de biofilmes triptofano (W).

O alinhamento múltiplo realizado entre as bactérias deste estudo mostra que o resíduo crítico triptofano W80 em *Y. pestis* conserva-se também nas bactérias Gram-negativas *E. coli* e *C. violaceum*, correspondendo, nesta última, ao resíduo W94 (Figura 21). Já o resíduo tirosina Y83 de *Y. pestis* mostrou-se conservado somente em *E. coli*. Observa-se que o resíduo tirosina Y66 em *Y. pestis*, não utilizado para a mutação (FORMAN *et al.*, 2006), apresenta consenso com o resíduo tirosina Y80 em *C. violaceum*, o que indica que uma mutação especificamente neste resíduo pode também determinar uma função crítica na formação de biofilmes.

<i>E. coli</i>	1	-----MN	NLIITTRQSP	VRLV---VDY	VATTILWTLF	ALFIFLAFMD
<i>Y. pestis</i>	1	-----MS	TPLIFTEQRL	LPRW---IDI	IITALAWFGF	VFLVLRGFLE
<i>C. violaceum</i>	1	MATPLHEHED	DYLIISAVHN	VPWWRLLGW	LVTLAFWCVM	FYLWLPLLVLS
<i>B. pertussis</i>	1	-----MH	QHGVDG-LL	YGCWYRIVRP	LLVILTWFVF	SLYIHHSLVV
<i>S. epidermidis</i>	1	-----MV	KPRQRQYPTV	TSYLNIVRES	LFITISGVFW	MYCIVVMIVY
↓						
<i>E. coli</i>	40	LLTG-----	---YYWQS--	-EARSRLQFY	FLLAVANAVV	LIVWAIYNKL
<i>Y. pestis</i>	40	MISRAPHMGP	IPLRIYIL--	-SGLTTIALLY	LAIAAFNAVV	LIIVARYNQV
<i>C. violaceum</i>	51	LARLGGMRVP	VPGWVRGIGW	VHSRHLILY	ALAAALIGGA	LLIWAALNLW
<i>B. pertussis</i>	42	VGGTAAQIAE	LLVYITVVA-	-TMAAALTAW	MIVCRFHG--	WIRARDNEEV
<i>S. epidermidis</i>	43	IGTLINS---	-----	-QMESVITIR	IALNVENTEI	YKLFQWMLF
<i>E. coli</i>	78	RFQ-KQQHHA	AYQYTPQEYA	ESLAIPEDELY	QQLQKSHRMS	VHFTSQGQIK
<i>Y. pestis</i>	87	RFQ-VERRGH	RPDLDDDELA	SSMALSPALI	AQLKSGSCLT	LYNDEHGHL
<i>C. violaceum</i>	101	RFAGVNRGQ	IPAVAEREVA	QALGIAETEL	ARGRRSKVCI	ARHQDDGWL
<i>B. pertussis</i>	88	GVGLDPEYAL	PPRWPLPEGA	NRLLDHDEA	GAIQVVSAMY	VPAAIEPVVA
<i>S. epidermidis</i>	79	VLIIFIFFTF	SLAFQYKRG	RDI-----	-----	-----

Figura 21. Parte do alinhamento múltiplo comparando: CV2940 de *C. violaceum*; BP1941 de *B. pertussis*; HmsS de *Y. pestis*; IcaD de *S. epidermidis* e PgaD de *E. coli*. Estão demarcados com um retângulo os resíduos críticos identificados em *Y. pestis* W (triptofano) e Y (tirosina). A seta indica o resíduo tirosina (Y) com possível função similar à tirosina considerada crítica (demarcada com retângulo) em *Y. pestis*.

CAPÍTULO V

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 Conclusões

O estudo comparativo de genes que estão envolvidos em diferentes aspectos da resistência a antibióticos pode levar a novas estratégias de combate a infecções mais resistentes, como é o caso das infecções oportunistas e muitas vezes fatais de *Chromobacterium violaceum*. Em qualquer fase em que se interrompa a sinalização intercelular responsável, por exemplo, pela formação de biofilmes, deve haver uma diminuição em sua habilidade para escapar da ação de drogas mais eficazes. O conhecimento dos sítios de interesse (regiões conservadas, em princípio) pode ser o primeiro passo no caminho de se encontrar uma droga "bloqueadora" da ação. Vários outros caminhos podem ser concebidos. Por exemplo, no caso da organização de genes em operons, um "ataque" sobre o controle da transcrição parece ser uma via importante.

A produção de biofilmes por vários organismos sugere a conservação de proteínas ou conjunto de proteínas com função similar para sua síntese. Esta premissa contribui para o entendimento de que encontrando-se similaridade funcional em proteínas em um determinado organismo, pode-se manipular também outros. Operons ligados com a síntese de biofilmes estão determinados em várias bactérias, apenas necessitando-se o melhor entendimento das proteínas que desempenham importante papel na formação da matriz extracelular em biofilmes. Em *C. violaceum*, o operon *hmsHFR-CV2940* possui correspondência com operons de outros organismos comprovadamente produtores de biofilmes, indicando uma função similar deste grupo de genes com a destas bactérias produtoras de biofilmes.

Uma proteína importante na síntese de polissacarídeos, a HmsR, uma glicosiltransferase, possui os resíduos críticos conservados para sua função também em *C. violaceum*. Os resíduos aspartato D135 e D228, glutamina Q264 e arginina R267 em *C. violaceum* conservam-se em todas as bactérias, indicando similaridade de função para este polipeptídeo. A localização espacial dos resíduos considerados críticos na formação de biofilmes, numa região tipicamente catalítica, realça fortemente o papel enzimático que HmsR de *C. violaceum* demonstra possuir na síntese de polissacarídeos.

A proteína HmsF de *C. violaceum* conserva todos os aminoácidos considerados críticos para a formação de biofilmes. Além da conservação de aminoácidos importantes, a localização subcelular na membrana externa com conformação semelhante à HmsF da também bactéria Gram-negativa *Y. pestis* reforça a hipótese de um papel similar para esta proteína em *C. violaceum*.

A HmsH conserva o resíduo arginina, de efeito moderado na formação de biofilmes em *Y. pestis*, entre as bactérias deste estudo, excetuando-se apenas a bactéria Gram-positiva *S. epidermidis*.

A proteína CV2940 conserva, em primeira análise, o resíduo crítico triptofano, que se localiza, tanto em HmsS de *Y. pestis* como em *C. violaceum*, na região citoplasmática destas proteínas. Já a preponderância do resíduo tirosina Y83 de *Y. pestis*, que conserva-se somente em *E. coli* entre os organismos estudados, merece uma melhor análise. A localização na membrana interna em ambas as bactérias, indica uma possível similaridade funcional para esta proteína.

A análise do alinhamento múltiplo mostra que se conservam resíduos críticos em *C. violaceum* principalmente nas proteínas HmsR e HmsF, importantes personagens na síntese de polissacarídeos. A análise da localização subcelular entre todas as proteínas deste estudo, que se apresentam na membrana celular, juntamente com a localização tridimensional de resíduos essenciais, em regiões

tipicamente catalíticas, contribuiu para se sugerir que este operon em *C. violaceum* possui função similar na formação de biofilmes.

5.2 Sugestões para Trabalhos Futuros

O estudo realizado neste trabalho sugere a realização de análises complementares para confirmar as suposições feitas no presente trabalho. Dentro das sugestões para outros trabalhos, indica-se:

- Mutação sítio-dirigida na proteína HmsR nos resíduos aqui indicados como sendo críticos para sua funcionalidade na síntese da matriz extracelular em biofilmes;
- Mutação sítio-dirigida na proteína HmsF nos resíduos indicados neste estudo para comprovar funcionalidade na formação de biofilmes;
- Realização de técnicas diretas de reações substrato-enzima.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol**, v.215, n.3, p.403-10. 1990.
- BAGOS, P. G.; LIAKOPOULOS, T. D.; HAMODRAKAS, S. J. Algorithms for incorporating prior topological information in HMMs: application to transmembrane proteins. **BMC Bioinformatics**, v.7, p.189. 2006.
- BAGOS, P. G.; LIAKOPOULOS, T. D.; SPYROPOULOS, I. C.; HAMODRAKAS, S. J. PRED-TMBB: a web server for predicting the topology of beta-barrel outer membrane proteins. **Nucleic Acids Res**, v.32, n.Web Server issue, p.W400-4. 2004.
- BATES, P. A.; KELLEY, L. A.; MACCALLUM, R. M.; STERNBERG, M. J. Enhancement of protein modeling by human intervention in applying the automatic programs 3D-JIGSAW and 3D-PSSM. **Proteins**, v.Suppl 5, p.39-46. 2001.
- BENSON, D. A.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D. J.; OSTELL, J.; RAPP, B. A.; WHEELER, D. L. GenBank. **Nucleic Acids Res**, v.28, n.1, p.15-8. 2000.
- BERMAN, H. M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T. N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I. N.; BOURNE, P. E. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Res**, v.28, n.1, p.235-42. 2000.
- BLAIR, D. E.; SCHUTTELKOPF, A. W.; MACRAE, J. I.; VAN AALTEN, D. M. Structure and metal-dependent mechanism of peptidoglycan deacetylase, a streptococcal virulence factor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.102, n.43, p.15429-34. 2005.
- BOKRANZ, W.; WANG, X.; TSCHAPE, H.; ROMLING, U. Expression of cellulose and curli fimbriae by Escherichia coli isolated from the gastrointestinal tract. **J Med Microbiol**, v.54, n.Pt 12, p.1171-82. 2005.

BRAZILIAN NATIONAL GENOME PROJECT CONSORTIUM. The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.100, n.20, p.11660-5. 2003.

BRITO, C. F.; CARVALHO, C. B.; SANTOS, F.; GAZZINELLI, R. T.; OLIVEIRA, S. C.; AZEVEDO, V.; TEIXEIRA, S. M. *Chromobacterium violaceum* genome: molecular mechanisms associated with pathogenicity. **Genet Mol Res**, v.3, n.1, p.148-61. 2004.

CAMPBELL, J. A.; DAVIES, G. J.; BULONE, V.; HENRISSAT, B. A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. **Biochem J**, v.326 (Pt 3), p.929-39. 1997.

CERCA, N.; JEFFERSON, K. K.; MAIRA-LITRAN, T.; PIER, D. B.; KELLY-QUINTOS, C.; GOLDMANN, D. A.; AZEREDO, J.; PIER, G. B. Molecular basis for preferential protective efficacy of antibodies directed to the poorly acetylated form of staphylococcal poly-N-acetyl-beta-(1-6)-glucosamine. **Infect Immun**, v.75, n.7, p.3406-13. 2007a.

CERCA, N.; MAIRA-LITRAN, T.; JEFFERSON, K. K.; GROUT, M.; GOLDMANN, D. A.; PIER, G. B. Protection against *Escherichia coli* infection by antibody to the *Staphylococcus aureus* poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.104, n.18, p.7528-33. 2007b.

CHARNOCK, S. J.; DAVIES, G. J. Structure of the nucleotide-diphospho-sugar transferase, SpsA from *Bacillus subtilis*, in native and nucleotide-complexed forms. **Biochemistry**, v.38, n.20, p.6380-5. 1999.

CHEN, X.; SU, Z.; DAM, P.; PALENIK, B.; XU, Y.; JIANG, T. Operon prediction by comparative genomics: an application to the *Synechococcus* sp. WH8102 genome. **Nucleic Acids Res**, v.32, n.7, p.2147-57. 2004.

CORDEIRO, M. C. R. Engenharia Genética: conceitos básicos, ferramentas e aplicações. Embrapa:Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária 2003.

DANESE, P. N.; PRATT, L. A.; KOLTER, R. Exopolysaccharide production is required for development of Escherichia coli K-12 biofilm architecture. **J Bacteriol**, v.182, n.12, p.3593-6. 2000.

DAUPHINAIS, R. M.; ROBBEN, G. G. Fatal infection due to Chromobacterium violaceum. **Am J Clin Pathol**, v.50, n.5, p.592-7. 1968.

DAVIES, D. G.; CHAKRABARTY, A. M.; GEESEY, G. G. Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by Pseudomonas aeruginosa. **Appl Environ Microbiol**, v.59, n.4, p.1181-6. 1993.

EISENBERG, D.; LUTHY, R.; BOWIE, J. U. VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Methods Enzymol**, v.277, p.396-404. 1997.

ERMOLAEVA, M. D.; WHITE, O.; SALZBERG, S. L. Prediction of operons in microbial genomes. **Nucleic Acids Research**, v.29, n.5, p.1216-1221. 2001.

FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; ALMEIDA, R.; PORTILLO VDO, A.; BARBOSA, T. A.; TREVILATO, P. B.; NETO, C. E.; COELHO, R. D.; SILVA, D. W.; BARTOLETI, L. A.; HANNA, E. S.; BROCCHI, M.; MANFIO, G. P. Drug resistance in Chromobacterium violaceum. **Genet Mol Res**, v.3, n.1, p.134-47. 2004.

FLUCKIGER, U.; ULRICH, M.; STEINHUBER, A.; DORING, G.; MACK, D.; LANDMANN, R.; GOERKE, C.; WOLZ, C. Biofilm formation, icaADBC transcription, and polysaccharide intercellular adhesin synthesis by staphylococci in a device-related infection model. **Infect Immun**, v.73, n.3, p.1811-9. 2005.

FORMAN, S.; BOBROV, A. G.; KIRILLINA, O.; CRAIG, S. K.; ABNEY, J.; FETHERSTON, J. D.; PERRY, R. D. Identification of critical amino acid residues in the plague biofilm Hms proteins. **Microbiology**, v.152, n.Pt 11, p.3399-410. 2006.

GERKE, C.; KRAFT, A.; SUSSMUTH, R.; SCHWEITZER, O.; GOTZ, F. Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the Staphylococcus epidermidis polysaccharide intercellular adhesin. **J Biol Chem**, v.273, n.29, p.18586-93. 1998.

GIBAS, C.; JAMBECK, P. **Desenvolvendo Bioinformática**. Rio de Janeiro: Editora Campus Ltda. 2001. 440 p.

HANNA, A.; BERG, M.; STOUT, V.; RAZATOS, A. Role of capsular colanic acid in adhesion of uropathogenic Escherichia coli. **Appl Environ Microbiol**, v.69, n.8, p.4474-81. 2003.

HAUCKE, V.; HORST, M.; SCHATZ, G.; LITHGOW, T. The Mas20p and Mas70p subunits of the protein import receptor of yeast mitochondria interact via the tetratricopeptide repeat motif in Mas20p: evidence for a single hetero-oligomeric receptor. **Embo J**, v.15, n.6, p.1231-7. 1996.

HEILMANN, C.; SCHWEITZER, O.; GERKE, C.; VANITTANAKOM, N.; MACK, D.; GOTZ, F. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming Staphylococcus epidermidis. **Mol Microbiol**, v.20, n.5, p.1083-91. 1996.

ITOH, Y.; RICE, J. D.; GOLLER, C.; PANNURI, A.; TAYLOR, J.; MEISNER, J.; BEVERIDGE, T. J.; PRESTON, J. F., 3RD; ROMEO, T. Roles of pgaABCD Genes in Synthesis, Modification, and Export of the Escherichia coli Biofilm Adhesin, Poly- β -1,6-N-acetyl-D-glucosamine (PGA). **J Bacteriol**. 2008.

ITOH, Y.; WANG, X.; HINNEBUSCH, B. J.; PRESTON, J. F., 3RD; ROMEO, T. Depolymerization of beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine disrupts the integrity of diverse bacterial biofilms. **J Bacteriol**, v.187, n.1, p.382-7. 2005.

JACKSON, D. W.; SUZUKI, K.; OAKFORD, L.; SIMECKA, J. W.; HART, M. E.; ROMEO, T. Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of Escherichia coli. **J Bacteriol**, v.184, n.1, p.290-301. 2002.

JARRETT, C. O.; DEAK, E.; ISHERWOOD, K. E.; OYSTON, P. C.; FISCHER, E. R.; WHITNEY, A. R.; KOBAYASHI, S. D.; DELEO, F. R.; HINNEBUSCH, B. J. Transmission of *Yersinia pestis* from an infectious biofilm in the flea vector. **J Infect Dis**, v.190, n.4, p.783-92. 2004.

JEANMOUGIN, F.; THOMPSON, J. D.; GOUY, M.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Multiple sequence alignment with Clustal X. **Trends Biochem Sci**, v.23, n.10, p.403-5. 1998.

JINEK, M.; REHWINKEL, J.; LAZARUS, B. D.; IZAURRALDE, E.; HANOVER, J. A.; CONTI, E. The superhelical TPR-repeat domain of O-linked GlcNAc transferase exhibits structural similarities to importin alpha. **Nat Struct Mol Biol**, v.11, n.10, p.1001-7. 2004.

JOHNSON, M. S.; SRINIVASAN, N.; SOWDHAMINI, R.; BLUNDELL, T. L. Knowledge-based protein modeling. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v.29, n.1, p.1-68. 1994.

KAPLAN, W.; LITTLEJOHN, T. G. Swiss-PDB Viewer (Deep View). **Brief Bioinform**, v.2, n.2, p.195-7. 2001.

KELLEY, L. A.; MACCALLUM, R. M.; STERNBERG, M. J. Enhanced genome annotation using structural profiles in the program 3D-PSSM. **J Mol Biol**, v.299, n.2, p.499-520. 2000.

KREPPPEL, L. K.; HART, G. W. Regulation of a cytosolic and nuclear O-GlcNAc transferase. Role of the tetratricopeptide repeats. **J Biol Chem**, v.274, n.45, p.32015-22. 1999.

LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. Procheck - a Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures. **Journal of Applied Crystallography**, v.26, p.283-291. 1993.

LASKOWSKI, R. A.; RULLMANN, J. A.; MACARTHUR, M. W.; KAPTEIN, R.; THORNTON, J. M. AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. **J Biomol NMR**, v.8, n.4, p.477-86. 1996.

LEE, J.; KIM, J. S.; NAHM, C. H.; CHOI, J. W.; KIM, J.; PAI, S. H.; MOON, K. H.; LEE, K.; CHONG, Y. Two cases of *Chromobacterium violaceum* infection after injury in a subtropical region. **J Clin Microbiol**, v.37, n.6, p.2068-70. 1999.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: **Sarvier Editora de Livros Médicos**. 2000. 839 p. p.

MACHER, A. M.; CASALE, T. B.; FAUCI, A. S. Chronic granulomatous disease of childhood and *Chromobacterium violaceum* infections in the southeastern United States. **Ann Intern Med**, v.97, n.1, p.51-5. 1982.

MACK, D.; FISCHER, W.; KROKOTSCH, A.; LEOPOLD, K.; HARTMANN, R.; EGGE, H.; LAUFS, R. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. **J Bacteriol**, v.178, n.1, p.175-83. 1996a.

MACK, D.; HAEDER, M.; SIEMSEN, N.; LAUFS, R. Association of biofilm production of coagulase-negative staphylococci with expression of a specific polysaccharide intercellular adhesin. **J Infect Dis**, v.174, n.4, p.881-4. 1996b.

MAIRA-LITRAN, T.; KROPEC, A.; GOLDMANN, D. A.; PIER, G. B. Comparative opsonic and protective activities of *Staphylococcus aureus* conjugate vaccines containing native or deacetylated *Staphylococcal* Poly-N-acetyl-beta-(1-6)-glucosamine. **Infect Immun**, v.73, n.10, p.6752-62. 2005.

MARTINELLI, D.; BACHOFEN, R.; BRANDL, H. Effect of medium composition, flow rate, and signaling compounds on the formation of soluble extracellular materials by biofilms of *Chromobacterium violaceum*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.59, n.2-3, p.278-83. 2002.

MATHEWS, C. K. V. H., K.E.; AHERN, K.G. **Biochemistry**. San Francisco, CA: Robin Heyden. 2000. 1186 p.

NAYEEM, A.; SITKOFF, D.; KRYSTEK, S., JR. A comparative study of available software for high-accuracy homology modeling: from sequence alignments to structural models. **Protein Sci**, v.15, n.4, p.808-24. 2006.

NICKEL, J. C.; RUSESKA, I.; WRIGHT, J. B.; COSTERTON, J. W. Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. **Antimicrob Agents Chemother**, v.27, n.4, p.619-24. 1985.

NILSSON, I. M.; LEE, J. C.; BREMELL, T.; RYDEN, C.; TARKOWSKI, A. The role of staphylococcal polysaccharide microcapsule expression in septicemia and septic arthritis. **Infect Immun**, v.65, n.10, p.4216-21. 1997.

OGNIBENE, A. J.; THOMAS, E. Fatal infection due to *Chromobacterium violaceum* in Vietnam. **Am J Clin Pathol**, v.54, n.4, p.607-10. 1970.

PARISE, G.; MISHRA, M.; ITOH, Y.; ROMEO, T.; DEORA, R. Role of a putative polysaccharide locus in *Bordetella* biofilm development. **J Bacteriol**, v.189, n.3, p.750-60. 2007.

PEITSCH, M. C. ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling. **Biochem Soc Trans**, v.24, n.1, p.274-9. 1996.

PENDRAK, M. L.; PERRY, R. D. Proteins essential for expression of the Hms+ phenotype of *Yersinia pestis*. **Mol Microbiol**, v.8, n.5, p.857-64. 1993.

PETRILLO, V. F.; SEVERO, V.; SANTOS, M. M.; EDELWEISS, E. L. Recurrent infection with *Chromobacterium violaceum*: first case report from South America. **J Infect**, v.9, n.2, p.167-9. 1984.

PIEMOLINI, L. T. **Modelagem Estrutural da PHA Sintase de *Chromobacterium violaceum* para Estudos de Mutação Sítio-dirigida**. 2004. f. - Departamento de

Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

POTERA, C. MICROBIOLOGY: Forging a Link Between Biofilms and Disease. 283: 1837-1839 p. 1999.

PRATT, L. A.; KOLTER, R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. 30: 285-293 p. 1998.

RAMACHANDRAN, G. N.; RAMAKRISHNAN, C.; SASISEKHARAN, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J Mol Biol*, v.7, p.95-9. 1963.

RECOUVREUX, D. D. O. S. **Produção de Celulose Bacteriana: Identificação do Operon bcs e Produção de Biofilme Celulósico por *Chromobacterium violaceum*.** 2004. f. - Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RUPP, M. E.; FEY, P. D.; HEILMANN, C.; GOTZ, F. Characterization of the importance of *Staphylococcus epidermidis* autolysin and polysaccharide intercellular adhesin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. *J Infect Dis*, v.183, n.7, p.1038-42. 2001.

RUPP, M. E.; ULPHANI, J. S.; FEY, P. D.; BARTSCHT, K.; MACK, D. Characterization of the importance of polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis* in the pathogenesis of biomaterial-based infection in a mouse foreign body infection model. *Infect Immun*, v.67, n.5, p.2627-32. 1999.

SAXENA, I.; BROWN, R. Identification of cellulose synthase(s) in higher plants: sequence analysis of processive β -glycosyltransferases with the common motif 'D, D, D35Q(R,Q)XRW'. *Cellulose*, v.4, n.1, p.33-49. 1997.

SLOAN, G. P.; LOVE, C. F.; SUKUMAR, N.; MISHRA, M.; DEORA, R. The Bordetella Bps polysaccharide is critical for biofilm development in the mouse respiratory tract. **J Bacteriol**, v.189, n.22, p.8270-6. 2007.

SNEATH, P. H.; WHELAN, J. P.; BHAGWAN SINGH, R.; EDWARDS, D. Fatal infection by Chromobacterium violaceum. **Lancet**, v.265, n.6780, p.276-7. 1953.

SOLANO, C.; GARCIA, B.; VALLE, J.; BERASAIN, C.; GHIGO, J. M.; GAMAZO, C.; LASA, I. Genetic analysis of Salmonella enteritidis biofilm formation: critical role of cellulose. **Mol Microbiol**, v.43, n.3, p.793-808. 2002.

STAPPER, A. P.; NARASIMHAN, G.; OHMAN, D. E.; BARAKAT, J.; HENTZER, M.; MOLIN, S.; KHARAZMI, A.; HOIBY, N.; MATHEE, K. Alginate production affects Pseudomonas aeruginosa biofilm development and architecture, but is not essential for biofilm formation. **J Med Microbiol**, v.53, n.Pt 7, p.679-90. 2004.

TI, T. Y.; TAN, W. C.; CHONG, A. P.; LEE, E. H. Nonfatal and fatal infections caused by Chromobacterium violaceum. **Clin Infect Dis**, v.17, n.3, p.505-7. 1993.

TIPPMANN, H. F. Analysis for free: comparing programs for sequence analysis. **Brief Bioinform**, v.5, n.1, p.82-7. 2004.

VUONG, C.; KOCIANOVA, S.; VOYICH, J. M.; YAO, Y.; FISCHER, E. R.; DELEO, F. R.; OTTO, M. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. **J Biol Chem**, v.279, n.52, p.54881-6. 2004a.

VUONG, C.; VOYICH, J. M.; FISCHER, E. R.; BRAUGHTON, K. R.; WHITNEY, A. R.; DELEO, F. R.; OTTO, M. Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects Staphylococcus epidermidis against major components of the human innate immune system. **Cell Microbiol**, v.6, n.3, p.269-75. 2004b.

WANG, X.; PRESTON, J. F., 3RD; ROMEO, T. The pgaABCD locus of Escherichia coli promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. **J Bacteriol**, v.186, n.9, p.2724-34. 2004.

WICKENS, H. E. W., P. . Understanding antibiotic resistance **Pharmaceutical Journal**, v.274;501-504. 2005.

WISPLINGHOFF, H.; BISCHOFF, T.; TALLENT, S. M.; SEIFERT, H.; WENZEL, R. P.; EDMOND, M. B. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clin Infect Dis**, v.39, n.3, p.309-17. 2004.

ZHU, Y.; WEISS, E. C.; OTTO, M.; FEY, P. D.; SMELTZER, M. S.; SOMERVILLE, G. A. Staphylococcus aureus biofilm metabolism and the influence of arginine on polysaccharide intercellular adhesin synthesis, biofilm formation, and pathogenesis. **Infect Immun**, v.75, n.9, p.4219-26. 2007.