

RAFAEL NOBREGA STIPP

**CARACTERIZAÇÃO DOS REGULONS DE COVR E
VICRK EM *STREPTOCOCCUS MUTANS*.**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do Título de Doutor em Biologia Bucodental, Área de Microbiologia e Imunologia.

Orientadora:

Prof^ª. Dr^ª. Renata de Oliveira Mattos Graner.

Co-orientador:

Prof^º. Dr^º. José Francisco Höfling

**PIRACICABA, SP
2010**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8^a. / 6159

St57c	<p>Stipp, Rafael Nobrega. Caracterização dos regulons de CovR e VicRK em <i>Streptococcus mutans</i>. / Rafael Nobrega Stipp. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2010.</p> <p>Orientadores: Renata de Oliveira Mattos Graner, José Francisco Höfling. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Análise em microsséries. 2. Parede celular. 3. Cárie dentária. 4. Regulação da expressão gênica. 5. Fatores de virulência. I. Mattos-Graner, Renata de Oliveira. II. Höfling, José Francisco. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.</p> <p>(mg/fop)</p>
-------	---

Título em Inglês: Characterization of CovR and VicRK regulons in *Streptococcus mutans*

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Microarray analysis. 2. Cell wall. 3. Dental caries. 4. Gene expression regulation. 5. Virulence factors

Área de Concentração: Microbiologia e Imunologia

Titulação: Doutor em Biologia Buco-Dental

Banca Examinadora: Frederico José Gueiros Filho, José Francisco Höfling, Márcia Pinto Alves Mayer, Pedro Luís Rosalen, Ricardo Della Coletta

Data da Defesa: 19-02-2010

Programa de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 19 de Fevereiro de 2010, considerou o candidato RAFAEL NOBREGA STIPP aprovado.



Prof. Dr. JOSE FRANCISCO HOFLING



Profa. Dra. MARCIA PINTO ALVES MAYER



Prof. Dr. FREDERICO JOSÉ GUEIROS FILHO



Prof. Dr. PEDRO LUIZ ROSALEN



Prof. Dr. RICARDO DELLA COLETTA

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,

Aos meus pais, Jair Brieda Stipp e Kátia Maria Nóbrega Stipp, que estiveram comigo e incentivaram-me em todos os momentos. Ensinaram-me ter responsabilidade, honestidade e outros valores importantes para a vida.

Aos próximos e aos meus professores e mestres, pelo imenso apoio.

Com carinho, dedico.

Esta tese foi elaborada em formato "tradicional" e disposta com atento às regulamentações vigentes:

1) Informativo da Comissão Central de Pós Graduação/UNICAMP número 002/06, ano de 2006, disponível para consulta no *link*:

www.fea.unicamp.br/alimentarium/docs/ccpg_inf002_06.pdf

2) Manual de normalização de teses e dissertações da FOP/UNICAMP, de autoria por Heloísa Maria Ceccotti e Danielle Dantas de Sousa, ano de 2006, disponível para consulta no *link*:

<http://www.fop.unicamp.br/cpg/arquivos/Tese-Manual-ed-2006.pdf>

3) Não considerando o Novo Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa (NAOLP), com prazo de aplicação máximo para 2012, devido à ausência de programas de edição de texto de qualidade que sejam compatíveis com o NAOLP.

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

À Universidade Estadual de Campinas na pessoa do Reitor Prof^o. Dr^o. Fernando Ferreira Costa, e à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, por meio do Diretor Prof^o. Dr^o. Francisco Haiter Neto, pela oportunidade cedida.

À Coordenadoria de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do Coordenador Prof^o. Dr^o. Jacks Jorge Júnior e da secretária Érica A. Pinho Sinhoreti, pela pronta atenção dispensada.

Aos professores da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pela positiva participação na minha formação, desde a graduação em Odontologia.

Aos examinadores que aceitaram compor a banca de tese (em ordem alfabética) Prof^o. Dr^o. Frederico José Gueiros Filho, Prof^o. Dr^o. José Francisco Höfling, Prof^a. Dr^a. Márcia Pinto Alves Mayer, Prof^o. Dr^o. Pedro Luís Rosalen e Prof^o. Dr^o. Ricardo Della Coletta.

Aos examinadores que aceitaram compor a banca suplente de tese (em ordem alfabética) Prof^o. Dr^o. Gustavo Pompermaier Garlet, Prof^o. Dr^o. Marcelo Rocha Marques e Prof^a. Dr^a. Michelle Agostín.

Aos examinadores que compuseram a banca de qualificação, Prof^o. Dr^o. José Francisco Höfling, Prof^o. Dr^o. Sérgio Roberto Peres Line e Prof^o. Dr^o. Daniel Saito, pela avaliação e colaboração nesse trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Renata de Oliveira Mattos Graner, pela orientação, pelo auxílio e elaboração nesse trabalho, pela amizade e dedicação empenhada no ensino e na pesquisa, além da contribuição à minha formação profissional.

Aos Prof^o. Dr^o. Reginaldo Bruno Gonçalves e Prof^o. Dr^o. José Francisco Höfling, pela confiança, oportunidades oferecidas e co-orientação. Agradeço ainda pelo incentivo dado, pela inestimável orientação direta e indireta e pela contribuição à minha formação profissional.

Aos professores doutores Prof^o. Dr^o. Edgar Graner e Prof^o. Dr^o. Ricardo Della Coletta pelo espaço proporcionado nas instalações laboratoriais da área de Patologia do

Departamento de Diagnóstico Oral e disposição com que me auxiliaram em diversos momentos deste trabalho.

Aos pesquisadores principais Dr^o. Daniel J. Smith e Dr^a. Margaret J. Duncan do The Forsyth Institute, Boston, MA, EUA que, via auxílio NIH-Fogarty TW-06324 e NIH-DE-06153, me proporcionaram a oportunidade de realizar parte dos experimentos no exterior. Agradeço também a eles a orientação e disposição com que me auxiliaram em parte deste trabalho, bem como as muitas outras pessoas daquele Instituto que contribuíram no decorrer do período do estágio fora do Brasil.

Aos companheiros da Pós-Graduação (em ordem alfabética), Cristiane R. Salmon, Glauce Almeida, Marcelo R. Marques, Marco A. Carvalho e Michelle Agostini pela convivência e troca de experiências.

Aos companheiros da área de Microbiologia e Imunologia (em ordem alfabética) Cristiane Duque, Erika H. Chú, Flávia S. Mariano Rodrigues, Ítalo Sarto C. Rodrigues, Iza T. Alves Peixoto, Janaina de Cássia O. Sardi, Julianna J. de C. Moraes, Natalia L. Vizoto, Paula C. Aníbal, Regianne U. Kamiya e Sérgio Eduardo B. da Cruz pela convivência diária e ensinamentos compartilhados.

Aos funcionários desta Faculdade, Anderson L. Teixeira e Wilma C. Ferraz, do Laboratório de Microbiologia e Imunologia, ao funcionário José Alfredo da Silva do Laboratório de Bioquímica e aos funcionários Adriano Luis Martins e Eliene Aparecida Orsini Narvaes, do Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura, pela disposição com que me auxiliaram e relacionamento desenvolvido ao longo desse tempo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelos recursos concedidos para a realização desse trabalho, sob número 06/55933-8 (Bolsa de Doutorado) e 07/57454-2 (Auxílio Regular à Pesquisa).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelos recursos concedidos no Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior (PDEE), sob número 4510-07-0.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram com esse trabalho durante esses anos.

meus sinceros agradecimentos

"... e que o mundo não se torne uma *idiocracia*..."

Idiocracy 2006; 20th Century Fox, EUA

RESUMO.

S. mutans são os principais patógenos da cárie, pois expressam diversas proteínas importantes para a colonização e aumento em proporção nos biofilmes dentais na presença de sacarose. Estas incluem as glicosiltransferases (Gtf), que sintetizam uma matriz extracelular de glucano a partir da sacarose, e proteínas ligadoras de glucano (Gbps), as quais participam da interação entre *S. mutans* e matriz de glucanos. Há evidências de que diversos genes de virulência são regulados por sistemas reguladores de transcrição de dois componentes, dentre os quais CovR (de Control of Virulence) e VicRK (de Virulence Control). Propomos neste estudo descobrir novos alvos e/ou funções dos sistemas CovR e VicRK e avaliar características celulares e fenotípicas decorrentes da ausência desses sistemas. Para isso construímos cepas *S. mutans* mutantes *knockout* dos genes *covR* (SMU.1924) ou *vick* (SMU.1517) e realizamos comparações com as respectivas cepas selvagens (WT). A caracterização dos transcriptomas foi triada por *microarray* e quantificada por qPCR, demonstrando que vinte e três genes foram super expressos na ausência de CovR, enquanto trinta genes foram reprimidos na ausência de VicK. Para demonstrar a regulação direta, as regiões promotoras destes genes foram submetidas a ensaios de retardamento da mobilidade eletroforética com as proteínas recombinantes CovR ou VicR. Além dos genes já conhecidos, os ensaios mostraram CovR como regulador negativo de quatro novos genes e VicR como regulador de cinco novos genes, dentre os quais há, em ambos os casos, genes com provável função na biogênese da parede celular. Nos ensaios fenotípicos, os mutantes *covR*- demonstraram diminuição no crescimento total em cultura, enquanto que os mutantes *vick*- observados por microscopia eletrônica de varredura apresentaram formação de cadeias extremamente longas com células atípicas. A formação de biofilme *in vitro* por mutantes *covR*- foi de 3 a 17 vezes maior comparado ao WT, enquanto mutantes *vick*- demonstraram uma redução de 3,5 a 6,5 vezes. Foi observado

aumento de 40% na hidrofobicidade celular nos mutantes *covR*- quando comparados a cepa WT, enquanto os mutantes *vicK*- tiveram aumento de 10 vezes, tornando-se altamente hidrofóbicos, provavelmente em decorrência das alterações na superfície da parede celular. Os mutantes *covR*- foram 30% mais resistente a autólise que as cepas WT, enquanto que os mutantes *vicK*- possuem o dobro de resistência. Em conclusão, os regulons controlados por CovR e VicKR incluem diversos genes com provável função na biogênese de parede celular, além de genes importantes para a formação de biofilmes. A inativação destes sistemas promoveu alterações fenotípicas notáveis, que realçam os achados da participação destes sistemas na biogênese das estruturas celulares.

Palavras-chave: Análise em Microséries, Parede Celular, Cárie Dental, Regulação Bacteriana da Expressão Gênica, Virulência.

ABSTRACT.

Streptococcus mutans, a major dental caries pathogen, expresses several virulence genes that mediate its growth and accumulation on tooth surfaces. In this process, GtfB and GtfC catalyze the extracellular synthesis of water-insoluble glucan matrix from sucrose, and are essential for accumulation of *S. mutans* in the dental biofilm. Glucan binding protein B might also mediate cell surface interaction with glucan. Two component transduction systems, such as CovR (Control of Virulence) and VicRK (Virulence Control), regulate, at least, part of *S. mutans* virulence genes. In this study we characterized CovR and VicRK functions and some phenotypic traits related to their absences. Knockouts strains *covR*- (SMU.1924) and *vicK*- (SMU.1517) strains were constructed and compared by differential microarray against wild type. Quantitative RT-PCR confirmed twenty-three up-regulated genes in *covR*-, while thirty down-regulated genes in *vicK*-mutant. Recombinant CovR and VicR proteins were used in protein:DNA-promoter electrophoretic mobility shift assay (EMSA) to confirm direct regulator-promoter interaction and transcription. In addition to already-know CovR and VicR targets, qPCR and EMSA revealed that CovR acts as a negative regulator of four additional genes, and VicR controls five undescribed promoters. In both cases, genes controlled are mainly involved in biofilm growth and in cell wall biogenesis. Phenotypically, *covR*- mutants showed lower yield in culture, while *vicK*- mutants had altered cell morphology and long chains formation. Inactivation of *covR* significantly increased *in vitro* biofilm formation in all strains (3 to 17-fold increase, $p < 0.01$), while *vicK* mutants showed poor biofilm growth (3.5 to 6.5-fold reduction; $p < 0.01$). Cell hydrophobicity was increased by 40% in *covR*- mutants and by 10-fold in *vicK*- mutants, possibly due cell surface changes. Both knockouts also increased the autolysis resistance, in about 30% for the *covR*- mutants and in 2-fold for the *vicK*- mutant. It is concluded that CovR and VicR systems have

important participation on *S. mutans* physiology, regulating genes that not only are involved in biofilm formation but that have functions in cell wall biogenesis.

Keywords: Microarray Analysis, Cell Wall, Dental Caries, Bacterial Gene Expression Regulation, Virulence Factors.

LISTA DE ABREVIATURAS ADOTADAS.

10%CO₂: pressão parcial de dióxido de carbono a 10%.

16SRNA: gene codificador do RNA ribossômico 16S.

A_{550nm}: absorvância no comprimento de onda de 550 nanômetros.

Ag: Antígeno.

ATCC: Coleção Americana de tipos de cultura (de American Type Culture Collection).

BHA: BHI comercial acrescido de agar a 1,5% (peso/volume).

BHI: infusão de cérebro e coração comercial (de Brain Heart Infusion).

CAT: sistema cloranfenicol acetiltransferase.

cDNA: fragmentos de DNA sítio simples obtidos a partir da transcrição reversa de moldes de RNA.

covR: gene codificador da proteína regulatória CovR (de Control of virulence response regulator).

CsrRS: sistema de dois componentes (de capsule synthesis regulator), também chamado de CovRS.

DEPC: reagente Diethylpyrocarbonate.

DNA: ácido desoxirribonucléico genômico (de Deoxyribonucleic Acid).

dNTP: Trifosfatos de desoxirribonucleotídeos.

EDTA: reagente Ethylenediaminetetraacetic acid.

ermR: fenótipo resistente à eritromicina.

ermS: fenótipo sensível à eritromicina.

Fase log: fase logarítmica de crescimento.

GAS: group A streptococci (*Streptococcus pyogenes*).

Gbps: proteínas ligadoras de glucano.

GBS: group B streptococci (*Streptococcus agalactiae*).

gcrR: O mesmo que *covR* (de gbpC regulatory system)

gDNA: DNA cromossomal, genômico.

Gtfs: glicosiltransferases.

IgA: Imunoglobulina A.

JCV: Instituto John Craig Venter (EUA).

KDa: quilo Daltons (unidade de massa atômica).

MetilV: reagente Methyl Viologen Dichloridehydrate

MOPS: reagente *Morpholinopropane sulphonic acid*.

ORF: fases abertas de leitura (de *Open Reading Frame*).

pb: pares de base.

PCR: reação em cadeia da polimerase (de *Polymerase Chain Reaction*).

PCR-RFLP: polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição (de *Restriction Fragment Length Polymorphism*).

PcsB: Proteína ortóloga da GbpB de *S. mutans* (de *protein required for cell separation*)

pDNA: DNA plasmidial.

PMSF: reagente *Phenylmethylsulphonylfluoride*.

PVDF: *polyvinylidene difluoride membrane*.

qPCR: PCR em tempo real quantitativa.

r-CovR: proteína CovR recombinante, produzida em *Escherichia coli*.

r-VicR: proteína VicR recombinante, produzida em *Escherichia coli*.

RCF: unidade de força centrífuga relativa (de *Relative Centrifugal Force*)

RNA: ácido ribonucléico (de *Ribonucleic Acid*).

RNAm: ácido ribonucléico mensageiro.

RT: transcrição reversa que dará origem a cDNA (de *Reverse Transcription*).

RT-PCR quantitativa: o mesmo que qRT-PCR

qRT-PCR: transcrição reversa seguida de PCR quantitativa.

SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*.

S. mutans: *Streptococcus mutans*.

tarC: O mesmo que *covR* (de *tenacious adherence regulator*)

TCS: sistemas reguladores de transcrição de dois componentes (de *Two Component System*).

TE: tampão 10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0.

THB: caldo *Todd-Hewitt* (de *Todd-Hewitt Broth*).

vick: gene codificador da proteína quinase sensora de superfície VicK (de *Virulence Control Kinase*).

vicR: gene codificador da proteína regulatória VicR (de *Virulence Control Response Regulator*).

WT: cepa selvagem (de *wild type*)

SUMÁRIO

	Página
1 - Introdução	1
2 - Revisão de literatura	5
3 - Proposição	19
4 - Material e métodos	21
5 - Resultados	41
6 - Discussão	65
7 - Conclusão	81
8 - Referências bibliográficas	83
Anexos	95

1. INTRODUÇÃO

A cárie é uma das doenças infecciosas mais comuns em humanos, e seu tratamento curativo ainda representa enormes gastos aos sistemas públicos e privados de saúde em diversos países. *Streptococcus mutans* são os principais microrganismos envolvidos no desenvolvimento da cárie (Loesche, 1986; Banas, 2004) porque reúnem um grupo de fatores de virulência que lhes confere capacidade de se acumular no biofilme dental na presença de sacarose (Hamada *et al.*, 1981; Banas & Vickerman, 2003), de produzir e tolerar ácidos resultantes do seu metabolismo (Hirose *et al.*, 1993; Quivey *et al.*, 2001), os quais promovem a desmineralização do esmalte dentário.

A colonização e acúmulo de *S. mutans* no biofilme dental são dependentes da sua capacidade em sintetizar uma matriz extracelular de glucanos, principalmente os insolúveis em água (Hamada *et al.*, 1981). Esses polissacarídeos são sintetizados a partir da sacarose ingerida na dieta por enzimas extracelulares livres ou associadas à célula bacteriana, as glicosiltransferases (Gtfs) (Hamada *et al.*, 1981; Banas & Vickerman, 2003).

A supressão ou ativação da transcrição dos genes necessários para o crescimento em biofilmes, tanto em *S. mutans* como em algumas outras espécies do gênero *Streptococcus*, parecem estar sob controle de sistemas reguladores de transcrição de dois componentes (TCS) (Mitchell *et al.*, 2003; Qi *et al.*, 2004; Senadheera *et al.*, 2005; Biswas & Biswas, 2006). Os TCS compreendem a maior parte dos sistemas de resposta ambiental utilizados por procariontes, sendo comumente compostos por uma proteína de superfície sensora e uma proteína reguladora cognata, que ativam ou suprimem a transcrição gênica (revisado por Stock *et al.*, 2000). Análises no genoma da cepa *S. mutans* UA159 revelaram 14 prováveis TCS (Ajdic *et al.*, 2002, Biswas *et al.*, 2008), incluindo VicRK e cinco prováveis reguladores de resposta órfãos, dentre os quais está CovR (Idone *et al.*, 2003).

Nas espécies patogênicas de estreptococos estudadas, os sistemas CovRS e VicRK são, respectivamente, sistemas reguladores negativos e positivos de diversos genes de virulência. Estes sistemas foram bem caracterizados em *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes* (Lamy *et al.*, 2004, Churchward, 2007, Dubrac *et al.*, 2008). Diferentemente das espécies anteriores, o gene que codifica a proteína sensora CovS não foi identificado em *S. mutans*, sendo CovR considerado um regulador órfão nesta espécie.

Em *S. mutans*, já é conhecido que CovR controla negativamente a expressão de fatores de virulência como glicosiltransferases B, C e D, necessárias para o pleno crescimento em biofilme, e de proteína ligadora de glucano C, importante para agregação dependente de glucano e formação de biofilmes, (Idone *et al.*, 2003, Biswas & Biswas, 2006). Já o sistema VicRK parece ser altamente conservado e específico às bactérias Gram-positivas com baixo conteúdo G+C (Dubrac *et al.*, 2008). Em *S. mutans* o sistema VicRK controla positivamente a expressão de fatores de virulência como GtfB, GtfC, GtfD e GbpB (Senadheera *et al.*, 2007). Em espécies como *S. aureus* e *S. pneumoniae*, além de participar no controle da virulência, o sistema possui função crucial no controle do metabolismo da parede celular (revisado em Dubrac *et al.*, 2008).

Curiosamente, diversas enzimas e proteínas de superfície envolvidas primariamente na biogênese e divisão da parede vêm sendo identificadas como necessárias para virulência em estreptococos e em outros patógenos bacterianos (revisado em Boneca, 2005), demonstrando um campo promissor para estudos futuros. A compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no estabelecimento da espécie *S. mutans* no biofilme dentário pode fornecer elementos importantes para o desenvolvimento de novas estratégias para controle de infecção por estes microrganismos.

Neste sentido, um ou mais TCS podem, teoricamente, ser alvos interessantes no controle de espécies patogênicas, uma vez que fatores de virulência múltiplos poderiam ser combatidos simultaneamente (Stock *et al.*, 2000)

ou usados como ferramenta em terapias de substituição (Sun *et al.*, 2009). A procura por moléculas que bloqueiem esses sistemas tem se provado difícil e progredido lentamente, embora haja demonstrações de inibição específica de histidinas quinases bacterianas com o uso de *thienopyridine* (Gilmour *et al.*, 2005).

Neste estudo pretendemos caracterizar os regulons de CovR e VicRK em *S. mutans* e avaliar características celulares e fenotípicas decorrentes da ausência desses sistemas.

2. REVISÃO DE LITERATURA.

2.1. GLICOSILTRANSFERASES.

As glicosiltransferases (Gtfs) são enzimas extracelulares ou associadas à superfície celular bacteriana que hidrolisam a sacarose em moléculas de frutose e de glicose; a seguir, a mesma enzima polimeriza as moléculas de glicose resultantes em glucanos (Banas & Vickerman, 2003). As Gtfs possuem tamanho típico entre 140 e 175 KDa e apresentam dois domínios de maior importância: um domínio catalítico, o qual se liga à sacarose e a hidrolisa (Mooser *et al.*, 1991) e um domínio C-terminal, que se liga ao glucano recém sintetizado, sendo também necessário para a atividade enzimática de extensão e crescimento das cadeias de glucano (Kato & Kuramitsu, 1990; Mooser & Wong, 1988).

Durante o crescimento de *S. mutans* no biofilme dentário, a síntese extracelular de glucano ocorre pela ação conhecida de, pelo menos, três enzimas Gtfs: GtfB, GtfC e GtfD, codificadas pelos genes *gtfB*, *gtfC* e *gtfD* respectivamente. As atividades de cada Gtf são distinguidas pelo tipo de ligação glicosídica predominante no glucano sintetizado. GtfB catalisa a síntese de glucanos ricos em ligações glicosídicas do tipo α -1-3 (Aoki *et al.*, 1986), que resultam em polímeros insolúveis em água. GtfD catalisa a formação de glucanos ricos em ligações glicosídicas α -1-6, que resultam em moléculas solúveis em água (Hanada & Kuramitsu, 1989), enquanto que a GtfC está envolvida na síntese de glucanos solúveis e insolúveis em água (Hanada & Kuramitsu, 1988).

Uma grande quantidade de estudos foram realizados sobre a importância das Gtfs de *S. mutans* na biologia da placa dental e seu potencial como antígeno em vacinas anti-cárie (revisado em Monchois *et al.*, 1999; Banas & Vickerman, 2003 e Taubman & Nash, 2006). Brevemente, as quantidades de GtfB e GtfC produzidas por genótipos distintos se correlacionaram positivamente com a capacidade de aderência dependente de sacarose em superfícies lisas *in vitro*

(Tomita *et al.*, 1996; Mattos-Graner *et al.*, 2004). Crianças cárie-ativas são mais freqüentemente infectadas por cepas que produzem quantidades maiores de glucano, em relação às aquelas livres de cárie (Mattos-Graner *et al.*, 2000). A mutação do gene *gtfB* ocasiona uma queda de 4 vezes na capacidade de se acumular em biofilmes *in vitro* e de *gtfC*, 70 vezes (Tsumori & Kuramitsu, 1997).

Neste sentido, as Gtfs e proteínas ligadora de glucano (Item 2.2) são fatores de virulência que têm despertado grande interesse no desenvolvimento de métodos de controle de infecção por *S. mutans*, como, por exemplo, as vacinas anti-cáries testadas em modelos animais e humanos (Smith *et al.*, 1993; Childers *et al.*, 1999; Taubman & Nash, 2006).

2.2 PROTEÍNAS LIGADORAS DE GLUCANOS.

As proteínas ligadoras de glucano (Gbps, de *Glucan-binding proteins*) são um grupo de proteínas assim nomeadas devido a demonstrarem afinidade de ligação à glucano em ensaios *in vitro*. Entretanto, representam um grupo heterogêneo de proteínas que possuem variações no tamanho, no domínio ligador de glucano, na afinidade de ligação ao glucano, na distribuição entre espécies de estreptococos e na função primária. Algumas Gbps são, de fato, proteínas receptoras de superfície associadas a parede celular, enquanto que outras representam proteínas secretadas, que passam a ser associadas às células quando o glucano deposita-se sobre a superfície celular e, estas, ali o reconhecem e se acumulam (Banas & Vickerman, 2003).

Em *S. mutans* foram caracterizadas quatro Gbps (A/B/C/D), sendo todas importantes para a formação de biofilme. A GbpA é uma proteína não enzimática, secretada e com alta homologia ao domínio carboxi-terminal das Gtfs, também conhecido como domínio ligadora de glucano, que inclui seqüências repetidas ricas em resíduos de tirosina (Russel *et al.*, 1979). A GbpB não apresenta homologia com outras Gbps, embora apresente cerca de 70% de similaridade com hidrolases de mureína (Mattos-Graner *et al.*, 2001). A GbpC é

uma proteína ligada à parede celular de *S. mutans*, importante no processo de agregação bacteriana e cuja expressão parece ser mais intensa em condições de estresse osmótico (Sato *et al.*, 1997; 2002). A GbpD encontra-se de forma secretada, possui domínio ligadora de glucano com homologia a GbpA e outro domínio com alta similaridade a lipases, possuindo atividade lipídica confirmada (Shah & Russell, 2004).

Dentre as Gbps de *S. mutans* identificadas até o momento, a GbpB possui particularidades que a tornam interessante. Ela foi inicialmente purificada de sobrenadantes de cultura *S. mutans* através da afinidade por dextrano e demonstrou ter propriedades imunodominantes em crianças e adultos (Smith *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1998). Em estudo longitudinal, foi demonstrado que a maior intensidade da resposta de IgA salivar contra este antígeno está associada à menor susceptibilidade de infecção inicial por *S. mutans* (Nogueira *et al.*, 2005). Este dado indica que o padrão de resposta imune adaptativa a antígenos de GbpB em crianças tem influência na aquisição inicial deste microrganismo, sendo compatíveis com os estudos em modelos animais, nos quais a imunização com GbpB demonstra efeito protetor contra a cárie dentária (Smith *et al.*, 2001).

2.3 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE ENZIMAS EM BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS.

Uma etapa importante no controle dos processos celulares é a regulação das reações enzimáticas. Simplificadamente, são encontradas duas vias principais de regulação de enzimas: uma que controlará a atividade da enzima já formada e outra que regulará a sua quantidade, ou mesmo, a sua presença (Figura 1) (Madigan *et al.*, 2004).

O controle da **atividade** de enzimas envolve a inibição da atividade enzimática, pela ação de compostos celulares específicos ou determinadas substâncias presentes. Esse mecanismo ocorre frequentemente em vias metabólicas, tais como aquelas envolvidas em síntese de aminoácidos e é conhecido como inibição por retroalimentação. Na inibição por retroalimentação, o

aumento da concentração do produto final ou intermediário da via metabólica, inibe a atividade de enzimas que participam dos processos iniciais da via (Stock, 1989; Madigan *et al.*, 2004). Outro mecanismo encontrado para a regulação da atividade enzimática, em menor frequência, é a modificação enzimática. Nesse mecanismo, a proteína sintetizada sofre modificações reversíveis como, por exemplo, fosforilação ou outras que as tornam inativas por determinados períodos (Stock, 1989; Madigan *et al.*, 2004).

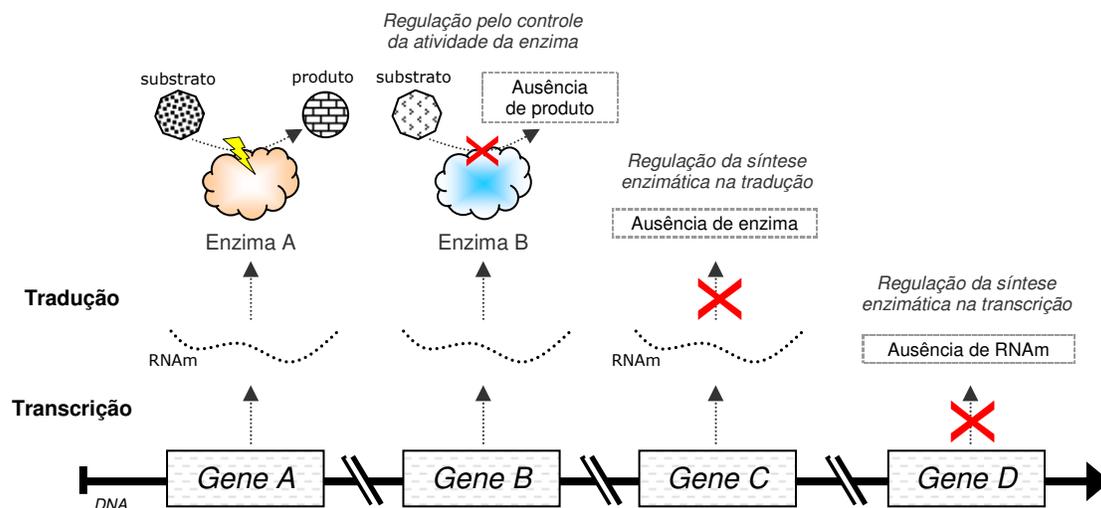


Figura 1: Visão geral dos diferentes níveis de regulação metabólica. O produto do gene A é a enzima A, sintetizada constitutivamente, catalisando sua reação. A enzima B é também sintetizada constitutivamente, mas sua atividade pode ser inibida. A síntese do produto do gene C pode ser bloqueada pelo controle da tradução do transcrito da enzima C. A síntese do produto D é inibida pela não expressão de RNAm do gene D. Adaptado de Madigan *et al.*, 2004.

A regulação da **síntese** de proteínas pode ocorrer de duas formas básicas: através de controle transcricional ou através de controle traducional. O controle transcricional influenciará diretamente a quantidade de RNAm transcrito específico, presente no interior da célula. Além do favorecimento natural da transcrição por promotores “fortes”, a transcrição gênica encontra-se em situações

de ativação ou repressão. Tais estados são dependentes de atividade de moléculas regulatórias que vão agir diretamente na seqüência de DNA alvo (operadora) (Rojo, 1999). Há, por exemplo, dois tipos de proteínas regulatórias repressoras, as que poderão efetuar sua função de inibição da transcrição quando se encontram ativadas e as que vão liberar a região para transcrição quando ativadas. Há também proteínas reguladoras de ativação, que irão favorecer a transcrição quando ativadas. Além disso, um estágio intermediário entre a ativação e a repressão pode estar presente (atenuação), que ocorre antes do final da síntese de RNAm, por bloqueio da transcrição por polipeptídios regulatórios (Rojo, 1999; Madigan *et al.*, 2004).

Conjuntos enzimáticos, ou mesmo a presença ou ausência de determinadas proteínas, podem ser requeridos simultaneamente para a adaptação do microrganismo a uma determinada condição ambiental. Para tanto, mecanismos de controle globais podem ser ativados, permitindo ao microrganismo responder de maneira eficiente, através do controle simultâneo de diversos genes (Stock *et al.*, 2000). Um exemplo destes mecanismos globais são os sistemas de *quorum sensing*, os quais são ativados em resposta ao aumento da densidade celular. Muitos desses mecanismos dependem da detecção de sinais extracelulares e dependem de sistemas de dois componentes (Stock *et al.*, 2000), os quais serão discutidos adiante.

De modo geral, número de mecanismos regulatórios distintos que são encontrados em células é extremamente vasto e, na maioria das vezes, os genes acabam por serem regulados por mais de um mecanismo (Stock *et al.*, 2000).

2.4 SISTEMAS REGULATÓRIOS DE DOIS COMPONENTES.

Os sistemas de dois componentes (TCS, de *Two Component System*) parecem ser essenciais para a adaptação, a sobrevivência e a virulência bacteriana, ativando ou suprimindo a expressão de genes ou grupos de genes em resposta às modificações das condições ambientais. São tipicamente compostos

por dois componentes principais: uma proteína trans-membrana sensora, comumente chamada de histidina quinase e um regulador de resposta (Figura 2). Dada a sinalização (ou exposição ambiental específica reconhecível), a histidina quinase de superfície se auto-fosforila e então fosforila um regulador de resposta, o qual muda de conformação para se ligar às seqüências regulatórias de genes alvos, ativando ou inibindo sua expressão (Stock *et al.*, 2000) (Figura 2).

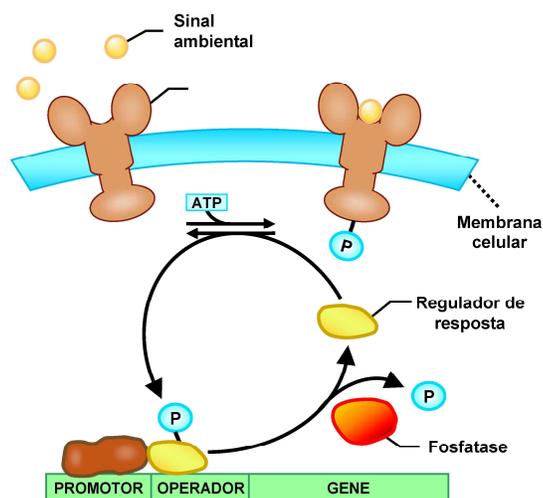


Figura 2: Um TCS típico consiste de um receptor de membrana histidina quinase sensora (geralmente designado pela letra K ou S, ex. *vick*) e um regulador de resposta intracelular (geralmente designado pela letra R, ex. *vicR*). Em resposta a um ou mais estímulos ambientais específicos, o sensor K sofre auto-fosforilação e transfere o grupo fosfato para um resíduo aspartato do R cognato. O R fosforilado adquire uma nova conformação para se ligar às seqüências regulatórias (operadoras) de genes alvos (regulon), ativando ou inibindo sua transcrição. Esse esquema básico é adaptável e variável de acordo com sistemas específicos. Adaptado de Madigan *et al.*, 2004.

Até o momento, análises do genoma da cepa *S. mutans* UA159 revelaram 14 prováveis TCS (Figura 3). Análises sistemáticas de inativação de cada uma das histidinas quinase demonstraram que nenhuma é requerida para a viabilidade celular, embora possam participar da resposta de *S. mutans* contra estresses ambientais (Lévesque *et al.*, 2007; Biswas *et al.* 2008). Por exemplo, a ausência da histidina quinase CiaH (Smu.1128) aumenta a tolerância frente

estresse promovido por altas concentrações de NaCl e H₂O₂ (Lévesque *et al.*, 2007), mas diminui a tolerância ao estresse ácido, ao estresse térmico e impede o crescimento na presença de O₂ (Biswas *et al.* 2008), além de diminuir a formação de biofilme (Qi *et al.* 2004). Entretanto, os exatos mecanismos responsáveis por essas respostas ainda são desconhecidos.

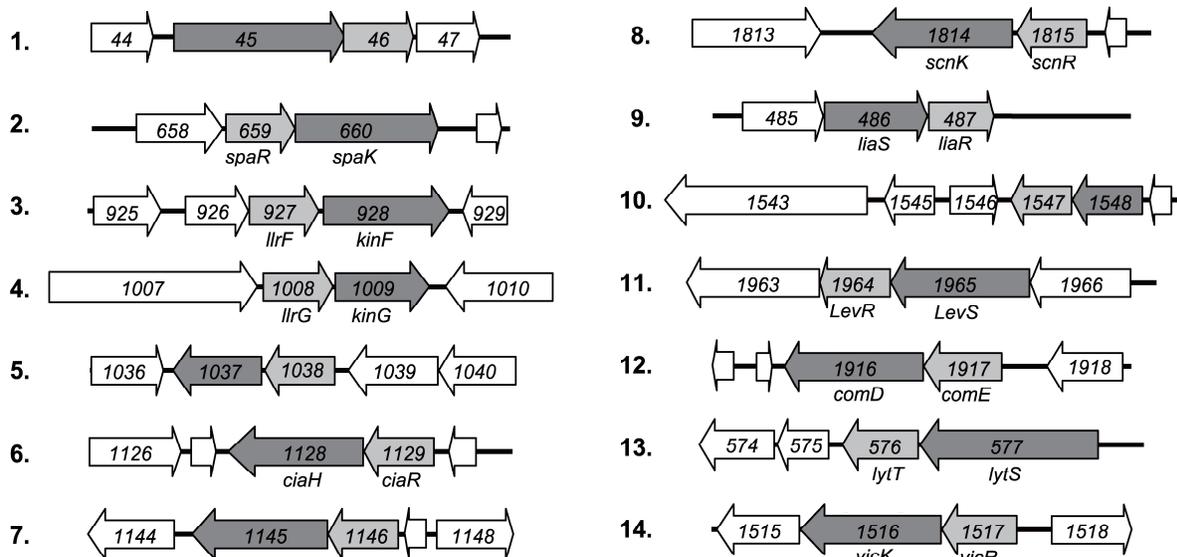


Figura 3: Diagrama esquemático dos lócus que codificam TCS em *S. mutans*. Os genes, os seus tamanhos relativos e as suas direções de transcrição estão representados pelas setas. As formas cheias representam os TCS: em cinza escuro as quinases sensoras e, em cinza claro, os reguladores de resposta. A nomenclatura utilizada e os números atribuídos às fases abertas de leitura foram designados de acordo com a literatura e o NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, acessível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>). Adaptado de Biswas *et al.*, 2008.

Muitos estudos foram e vêm sendo feitos com estratégias de mutação para avaliar o papel de cada TCS na biologia de *S. mutans* (Tabela 1). Entretanto, grande parte dos estudos não envolve análises moleculares aprofundadas que expliquem os mecanismos responsáveis pelos fenótipos observados, ou mesmo do regulon de cada sistema, para a definição das redes regulatórias e comunicação inter-sistemas.

Tabela 1: Sumário dos resultados dos principais trabalhos publicados envolvendo estratégias de mutação em genes TCS que afetaram a biologia de *S. mutans*.

Sistema estudado ^A	Gene inativado	Resultado com a inativação do gene (Referência)
Smu.1128 Smu.1129	<i>ciaH</i>	- diminuição da competência (Qi <i>et al.</i> , 2004; Ahn <i>et al.</i> , 2006). - diminuição da formação de biofilme (Qi <i>et al.</i> , 2004; Ahn <i>et al.</i> , 2006). - diminuição da resistência ao pH ácido (Qi <i>et al.</i> , 2004; Biswas <i>et al.</i> , 2008; Gong <i>et al.</i> , 2009). - aumento da resistência ao estresse osmótico (Lévesque <i>et al.</i> , 2007). - aumento da resistência ao estresse oxidativo-H ₂ O ₂ (Lévesque <i>et al.</i> , 2007). - diminuição da resistência ao estresse oxidativo-Metil-V (Biswas <i>et al.</i> , 2008). - diminuição da resistência ao estresse térmico (Biswas <i>et al.</i> , 2008). - impossibilidade de crescimento em presença de O ₂ (Biswas <i>et al.</i> , 2008). - diminuição da produção de mutacina (Qi <i>et al.</i> , 2004; Biswas <i>et al.</i> , 2008).
Smu.1916 Smu.1917	<i>comD</i>	- diminuição da competência (Li <i>et al.</i> , 2001; Ahn <i>et al.</i> , 2006). - diminuição da resistência ao pH ácido (Li <i>et al.</i> , 2002; Gong <i>et al.</i> , 2009). - diminuição da produção de mutacina (Biswas <i>et al.</i> , 2008).
Smu.1916 Smu.1917	<i>comE</i>	- diminuição da competência (Li <i>et al.</i> , 2001; Ahn <i>et al.</i> , 2006). - diminuição da resistência ao pH ácido (Li <i>et al.</i> , 2002).
	<i>comC</i>	- diminuição da competência (Li <i>et al.</i> , 2001). - diminuição da resistência ao pH ácido (Li <i>et al.</i> , 2002).
Smu.1965 Smu.1964	<i>levS</i>	- diminuição da resistência ao pH ácido (Lévesque <i>et al.</i> , 2007; Gong <i>et al.</i> , 2009). - diminuição da competência (Lévesque <i>et al.</i> , 2007).
Smu.486 Smu.487	<i>liaS</i> (<i>hk11</i>)	- impossibilidade de crescimento em presença de O ₂ (Biswas <i>et al.</i> , 2008). - diminuição da resistência ao pH ácido (Li <i>et al.</i> , 2002; Gong <i>et al.</i> , 2009). - diminuição da formação de biofilme (Li <i>et al.</i> , 2002). - diminuição da expressão de <i>gbcC</i> (Chong <i>et al.</i> , 2008a). - diminuição da produção de mutacina IV (Biswas <i>et al.</i> , 2008; Chong <i>et al.</i> , 2008a).
	<i>liaR</i> (<i>rr11</i>)	- diminuição da formação de biofilme (Li <i>et al.</i> , 2002). - diminuição da resistência ao pH ácido (Li <i>et al.</i> , 2002).
Smu.1037 Smu.1038	<i>hk1037</i>	- diminuição da resistência ao pH ácido (Gong <i>et al.</i> , 2009).
Smu.1145 Smu.1146	<i>hk1145</i>	- diminuição da resistência ao pH ácido (Lévesque <i>et al.</i> , 2007).
Smu.1814 Smu.1815	<i>scnK</i>	- diminuição da resistência ao pH ácido (Gong <i>et al.</i> , 2009). - diminuição da resistência ao estresse oxidativo-H ₂ O ₂ (Chen <i>et al.</i> , 2008).
	<i>sncR</i>	- diminuição da resistência ao estresse oxidativo-H ₂ O ₂ (Chen <i>et al.</i> , 2008).

^A Todos os sistemas conhecidos, exceto VicKR e CovR que serão revisados em separado. Demais sistemas com a histidina quinase removida, mas não citados na tabela acima, não apresentaram diferença em comparação à cepa selvagem na avaliação de: formação de biofilme, estresse por NaCl, estresse por H₂O₂, estresse por O₂ e competência. Dados até DEZ/2009.

2.4.1 SISTEMA VicRK

O sistema VicRK (de *Virulence Control*) foi originalmente identificado na espécie *Bacillus subtilis* e é altamente conservado e específico nas bactérias Gram-positivas de baixo conteúdo de C+G. Durante sua identificação em diferentes espécies, o sistema recebeu diferentes designações (YycG/F, MicA/B) e há um consenso para uma nomenclatura única como WalK/R (revisado em Dubrac *et al.*, 2008).

Nas espécies estudadas até o momento, esse sistema apresenta-se de três diferentes formas (Figura 4). Em espécies de *Streptococcus*, o operon é composto por três cístrons (*vicR*, *vicK* e *vicX*); já em *Bacillus* e *Listeria*, seis cístrons e, em espécies de *Staphylococcus*, *Lactobacillus* e *Enterococcus*, cinco cístrons. Os dois primeiros genes do operon codificam o regulador de resposta (VicR) e proteína sensora (VicK); os demais componentes codificam proteínas consideradas acessórias ao sistema.

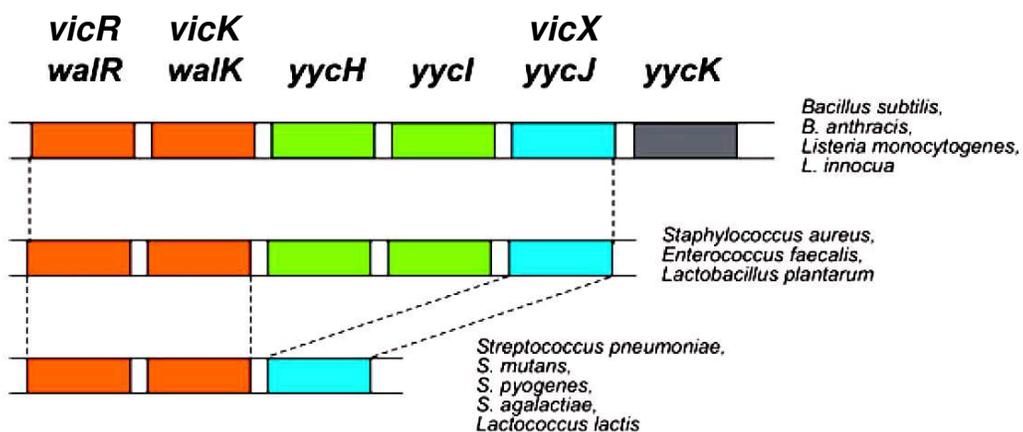


Figura 4: Mapa genético do operon *walRK* (*vicRK*). Três tipos de organização estrutural são encontradas em bactérias Gram-positivas de baixo conteúdo de C+G. À direita, espécies de maior interesse representando cada um dos tipos de organização. Adaptado de Dubrac *et al.*, 2008.

Os genes *yycH*, *yyjI* e *yyjK* (Figura 4) e respectivas proteínas codificadas parecem ter função atenuadora e, aparentemente, só estão presentes

em espécies onde a proteína histidina quinase sensora apresenta domínios extracelulares funcionais (revisado em Dubrac *et al.*, 2008).

VicR é um típico membro da família OmpR de reguladores de resposta, que possuem sítio de ligação ao DNA tipo hélice-giro-hélice aladas. O regulador parece tanto ativar como reprimir a expressão gênica em *B. subtilis*, dependendo da posição do seu sítio de ligação relativo ao promotor regulado (revisado em Dubrac *et al.*, 2008), entretanto o fenômeno de regulação negativa ainda não foi descrito em *S. mutans*.

Em estreptococos, VicK é uma proteína única trans-membrânica ancorada, com alça extracelular mínima, composta por apenas 4 a 12 aminoácidos (Ng & Winkler, 2004). As alças extracelulares são cruciais para detecção do estímulo externo, enquanto que o domínio de ancoragem pode ou não estar envolvido na percepção do sinal (revisado em Dubrac *et al.*, 2008).

VicX é proteína que possui domínios com alto grau de similaridade de aminoácidos à hidrolases dependentes de metal, pertencentes a superfamília das beta-lactamases, o que sugere uma possível participação em estruturas celulares e manutenção (Senadheera *et al.*, 2005; Dubrac *et al.*, 2008).

Em *S. mutans*, o sistema *vicRK* foi primeiramente descrito e nomeado como *covRSX* (Lee *et al.*, 2004). Apesar da nomenclatura equivocada, os autores deste estudo afirmaram ter recuperado mutante *knockout* do que seria o gene *vicR*. Mais tarde, foi suposto que não se tratava de um mutante verdadeiro, devido a um provável erro de localização dos *primers* utilizados para a construção (Senadheera *et al.*, 2005).

Em *S. mutans* e, como em todas as espécies testadas, a remoção de *vicR* em condições fisiológicas não é compatível com a viabilidade celular (Senadheera *et al.*, 2005; Dubrac *et al.*, 2008). Logo, as análises das funções desse operon em *S. mutans* ocorreram através de duas abordagens: uma variante que expressava cerca de cinco vezes mais o operon *vicRK*, e de um mutante *knockout* do gene *vick*. Os resultados sugeriram que o sistema participa na ativação da transcrição de *gtfB*, *gtfC*, *gtfD*, *ftf* e *gbpB* e, na sua ausência, a

capacidade de formação de biofilme, a capacidade de transformação e a resistência ao estresse oxidativo ficam prejudicados (Senadheera *et al.*, 2005).

A inativação de *vick* também demonstrou aumentar a resistência frente a autólise, através da regulação indireta do gene *altA*, responsável por codificar Autolisina A. Autolisinas bacterianas são enzimas capazes de hidrolisar o peptidoglicano, o principal constituinte da parede celular bacteriana. A parede celular bacteriana possui uma estrutura altamente dinâmica, que se expande quando a célula aumenta em volume ou passa a ser remodelada, conforme a célula se divide ou se diferencia (Ahn & Burne, 2006). O controle da atividade autolítica parece ocorrer, na maior parte dos casos, em nível pós-tradução. Entretanto, controles da transcrição de genes responsáveis por codificar autolisinas já foram citados (Smith *et al.*, 2000). Além de parecer ser crítica para autólise, a expressão correta de *altA* é fundamental para formação de biofilme e competência genética (Ahn & Burne, 2006).

Vários TSC parecem influenciar características fenotípicas comuns com o sistema *vicRK* e, também, entre si (Tabela 1). Esse fato leva a concluir que há uma rede aparentemente complexa de controle das funções celulares como, por exemplo, intercomunicação entre dois TCS, ou mesmo a expressão dos genes codificadores de um TCS sob controle de um outro TCS (Tremblay *et al.*, 2009).

Pretendemos contribuir para a elucidação dos mecanismos regulatórios envolvidos na biologia de *S. mutans* através de estudos aprofundados que definam o regulon e os genes sob controle direto de VicRK e CovR.

2.4.2 REGULADOR COVR

O TCS *covRS* é um sistema bem caracterizado em algumas espécies de estreptococos, como *S. pyogenes* (GAS) e *S. agalactiae* (GBS). O sistema também é conhecido pela designação *csrRS* (de *capsule synthesis regulator*), devido a sua participação no controle da síntese de cápsula de ácido hialurônico em GAS. Nessas espécies, é composto por dois cístrons: *covR*, codificador do regulador de resposta CovR, membro da família OmpR de reguladores de

resposta, e *covS*, codificador da proteína sensora CovS, que contém uma alça larga e flexível, compatível com quinases que possuem tanto a função de fosforilar, como de fosfatases (revisado em Churchward, 2007). Em contraste com a maioria dos sistemas TCS, CovR atua primariamente como repressor de transcrição dos genes diretamente por ele regulados.

Diferente das espécies anteriores, o gene que codifica a proteína sensora CovS não foi identificado em *S. mutans*, sendo CovR considerado um regulador órfão. Nessa espécie, esse regulador foi primariamente localizado através de técnica de mutagênese randômica frente a fenótipos específicos. Devido a CovR regular a expressão de *gbpC*, foi designado como *gcrR* (de *gbpC* *regulator*) (Sato *et al.*, 2000) e *tarC* (de *tenacious adherence regulator*) (Idone *et al.*, 2003).

Embora *S. mutans* não apresente a histidina quinase *covS* cognata (Chong *et al.*, 2008b), ele expressa CovR, que é funcional e tem sua importância para a virulência dessa espécie, pois regula negativamente a expressão de genes *gbpC*, *gtfD* (Sato *et al.*, 2000; Idone *et al.*, 2003) e *gtfB/C* (Biswas & Biswas, 2006; Biswas *et al.*, 2007).

Assim como em GAS, a expressão de *covR* é dependente da fase de crescimento, com maior expressão durante a fase de crescimento exponencial (Stipp *et al.*, 2008, Chong *et al.*, 2008b). Mudanças na temperatura de crescimento não parecem influenciar a expressão de *covR*; entretanto, tanto o aumento do pH como da concentração de Mg^{2+} no meio externo levam a uma maior expressão de *covR* (Chong *et al.*, 2008b).

CovR também é capaz de auto regular sua expressão, através da sua ligação direta à sua região promotora, com ou sem fosforilação *in vitro* (Chong *et al.*, 2008b). Em *S. mutans* o agente fosforilante de CovR e o nível de CovR fosforilados *in vivo* ainda não foram determinados; entretanto, podem haver fenômenos de oligomerização ou diferenças do grau de afinidade à regiões promotoras, que acabem por determinar como esse regulador orchestra a expressão dos genes sob seu controle (Miller *et al.*, 2001).

2.5 SÍNTESE DE PAREDE E DE ENVELOPE CELULAR.

A parede celular bacteriana é uma estrutura rígida, porém dinâmica, que recobre a membrana citoplasmática e confere forma às bactérias. Embora possua composição variável de acordo com a espécie, contém peptídeoglicano (mureína) como seu componente principal. Sua síntese e remodelação envolvem processos complexos que ocorrem tanto dentro, como fora do citoplasma bacteriano (Madigan *et al.*, 2004).

No genoma da cepa UA159 foram identificados pelo menos 60 genes envolvidos na divisão e síntese de parede celular (Ajdic *et al.*, 2002). Cepas de *S. mutans* apresentam enorme variabilidade no comprimento da cadeia celular, o que sugere atuação de hidrolases de peptídeoglicano (autolisinas) e que as mesmas são passíveis de serem reguladas (Ajdic *et al.*, 2002). Pelo menos seis potenciais autolisinas foram identificadas no genoma de *S. mutans* UA159. Essas enzimas são responsáveis pela remoção seletiva do peptídeoglicano formado, possuindo função biológica na regulação do crescimento da parede celular, na reciclagem de peptídeoglicano e na separação das células filhas durante a fissão binária (revisado por Vollmer *et al.*, 2008).

Embora a função primária das enzimas envolvidas na divisão e síntese de parede celular seja a propriamente dita, atualmente um grande número delas vem sendo identificadas como necessárias para virulência em estreptococos e em outros patógenos bacterianos. Por exemplo, a proteína ligadora de penicilina 1A (*pbp1a*) é importante para o desenvolvimento de bacteremia em modelo animal tanto em *S. pneumoniae* como em *S. agalactiae*, e em infecções do trato urinário por *Proteus mirabilis* (revisado em Boneca, 2005). Diversas proteínas que configuram a superfície da parede celular podem ainda ser importantes para as capacidades de adesão e crescimento bacteriano durante a formação de biofilmes. Algumas autolisinas têm sido identificadas como importantes para o crescimento em biofilmes e para a virulência (Dubrac *et al.*, 2007).

Trabalhamos com a hipótese de que proteínas de superfície envolvidas na biogênese de parede celular possam participar da interação de *S. mutans* com a matriz extracelular de glucano e virulência, assim como parece ocorrer com GbpB (Duque *et al.* 2009).

2.6 CEPAS CLÍNICAS.

A comparação entre estudos realizados com diferentes cepas pode ser problemática, principalmente se estes sistemas apresentarem funções variáveis entre genótipos da mesma espécie. Estudos em genótipos de *Streptococcus pneumoniae* demonstraram que a inativação do regulador de resposta *rr09*, do sistema regulatório *rk09*, promoveu fenótipos bem distintos dependendo da cepa utilizada (Blue *et al.*, 2003). Enquanto a cepa D39 *rr09* apresentou perda total de virulência pelas vias de infecção intraperitoneal, intranasal e intravenosa em modelo murino, a cepa 0100993 *rr09* apresentava-se ainda virulenta pelas vias intraperitoneal e intravenosa. O *background* genético em cepas distintas da mesma espécie pode ditar a função de sistemas regulatórios (Blue *et al.*, 2003).

Assim, experimentos realizados com uma única cepa podem não fornecer resultados extrapoláveis para toda uma espécie bacteriana, devido à própria variabilidade genética existente nestes microrganismos. A análise comparativa do seqüenciamento dos genomas de oito cepas da espécie *Streptococcus agalactiae* ilustram bem esta problemática, revelando que os diferentes genótipos compartilham entre si apenas 80% do genoma, sendo que a maioria dos traços genéticos ligados à virulência, ao sorotipo capsular, à adaptação e à resistência a antibióticos pertence ao genoma dispensável (Tettelin *et al.*, 2005). Neste estudo incluímos genótipos clínicos distintos conhecidos (Mattos-Graner *et al.*, 2000; 2001; 2004; Stipp *et al.*, 2008) nos experimentos possíveis.

3. PROPOSIÇÃO.

O objetivo deste trabalho foi descobrir novas funções dos sistemas CovR e VicRK, através de análises comparativas entre cepas *S. mutans* mutantes *knockout* dos genes *covR* ou *vick* e respectivas cepas selvagens, em diversas características celulares e genéticas, como: crescimento planctônico e em biofilmes, morfologia, hidrofobicidade celular, susceptibilidade à autólise e caracterização do regulon, com a definição dos genes diretamente regulados. Assim, os objetivos específicos deste projeto foram:

- 1) Construir mutantes *knockout* dos genes *covR* e *vick* a partir das cepas UA159, 20A3 e 5ST1.
- 2) Avaliar o crescimento das cepas mutantes e selvagens (WT) em fase planctônica e em biofilmes.
- 3) Caracterizar os transcriptomas dos mutantes *covR*- e *vick*- frente respectiva cepa WT em ensaios de *microarray*, confirmando os resultados significantes através de RT-PCR e ensaios de retardamento da mobilidade eletroforética (EMSA).
- 4) Analisar características fenotípicas possivelmente relacionadas aos novos genes identificados como diretamente regulados por CovR e/ou VicR.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. CEPAS DE *S. MUTANS* SELECIONADAS PARA O ESTUDO.

Para o estudo foi utilizada a cepa referencial UA159 (Ajdic *et al.*, 2002) e dois genótipos isolados clínicos (20A3 e 5ST1) de *S. mutans*. Os genótipos clínicos pertencem ao banco de cepas da Área de Microbiologia e Imunologia, FOP/UNICAMP, e foram isolados da cavidade bucal de crianças jovens em estudos anteriores (Mattos-Graner *et al.*, 2000) e caracterizados quanto à produção de GbpB (Mattos-Graner *et al.*, 2001), GtfB, GtfC e GtfD (Mattos-Graner *et al.*, 2004). Recentemente, um total de 11 cepas, incluindo as selecionadas para este estudo, foram caracterizadas quanto ao padrão de expressão de *gtfB*, *gtfC* e outros genes (Stipp *et al.*, 2008).

Embora o foco do estudo seja definir o regulon de *covR* e *vicRK* na cepa de referência UA159, utilizamos outras duas cepas para avaliar o efeito da mutação nesses TCS, nas metodologias possíveis. Devido ao fato de *gtfB* e *gtfC* serem ativados e reprimidos fortemente por, pelo menos, *vicRK* e *covR* (Senadheera *et al.*, 2005; Biswas & Biswas, 2006) formulamos a hipótese de que a expressão não coordenada de *gtfB* e *gtfC* poderia indicar regulação distinta entre genótipos e, logo, papéis distintos destes TCS na expressão destes genes.

Assim, além da cepa referencial UA159, selecionamos a cepa 20A3, que apresenta curva de expressão *gtfB/gtfC* coordenada (Stipp *et al.*, 2008) (Tabela 2). A cepa 5ST1, embora apresente curva de expressão não coordenada, possui provável(is) polimorfismo(s) no gene *gtfB* (Stipp *et al.*, 2008) e características de alta virulência (Mattos-Graner *et al.*, 2001;2004).

Tabela 2: Relação das cepas selvagens utilizadas neste estudo e suas características de expressão de *gtfB* e *gtfC* em duas fases de crescimento.

Cepa	Expressão coordenada de <i>gtfB-gtfC</i>		Origem da cepa
	Fase logarítmica	Fase estacionária	
5ST1	NÃO	NÃO	Mattos-Graner <i>et al.</i> , 2000
20A3	SIM	SIM	Mattos-Graner <i>et al.</i> , 2000
UA159	NÃO	NÃO	ATCC 700610

4.2 CRESCIMENTO DE ROTINA.

S. mutans selvagens (WT) foram cultivados a partir dos estoques congelados a -20°C , em meio *skim-milk* (Difco Labs, EUA), dos quais foram removidos 10 μl de suspensão com alça de platina calibrada estéril, estriados em agar *Brain Heart Infusion* (BHA) (Merck Labs, Alemanha) ou MSA (Gold *et al.*, 1973) e incubados a 37°C , sob atmosfera de 10%CO₂ (Water-Jacked CO₂ Incubators/Cole Parmer Instruments, EUA) durante 24h. Após crescimento, cinco colônias isoladas foram inoculadas em 5ml de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (Merck Labs), incubadas sob as mesmas condições durante 18h e usadas como inóculo *starter*. As leituras de absorbância foram realizadas no comprimento de onda de 550 nanômetros ($A_{550\text{nm}}$) em espectrofotômetro *Genesys 2* (Spectronic Unicam, EUA).

Cepas de *Escherichia coli* DH5 α e BL21 foram cultivadas em Luria Bertani (LB caldo ou agar) (Difco Labs, EUA), acrescido ou não de 100 $\mu\text{g/ml}$ de eritromicina ou ampicilina quando necessário, durante 18 horas ou menos, à 37°C , em aerobiose com ou sem agitação.

4.3 EXTRAÇÃO DE DNA CROMOSSOMAL (GDNA) E DNA PLASMIDIAL E PCR.

O gDNA de cada cepa foi extraído a partir de 1,5ml de culturas em BHI (18h) com o *kit MasterPure* (Epicentre Technologies, EUA), seguindo-se as recomendações do fabricante.

O DNA plasmidial (pDNA) foi purificado de culturas de *E. coli* por extração alcalina (Birnboim & Doly, 1979). Resumidamente, a cepa de *E. coli* contendo o plasmídeo pVA838 foi reativada em meio de cultura Luria Bertani (LB) agar com 100µg/ml de eritromicina. Colônias isoladas foram transferidas para tubos de ensaio contendo caldo LB com 100µg/ml de eritromicina, agitadas e mantidas a 37°C por 18h em aerobiose, com agitação constante. As células obtidas de 3ml de cultura foram centrifugadas, lavadas com 1ml de salina, lisadas pela adição de lisozima 2mg/ml e o pDNA separado através da precipitação do gDNA sob alto pH (pH 12-12.5) e alta concentração de sais (Acetato de Sódio 3.0 molar). A seguir, o sobrenadante contendo pDNA foi purificado através de tratamento com fenol-clorofórmio e a remoção de sais através de lavagem com etanol. O pDNA foi ressuscitado em 50µl de solução TE estéril contendo RNase A (Invitrogen) na concentração final de 50µg/ml. Os pDNAs foram estocados a -20°C para posterior utilização.

A qualidade do DNA extraído foi avaliada pela razão das absorbâncias (A_{260nm}/A_{260nm}) e a integridade das amostras de DNA comprovada em gel de agarose a 1%, corado com 0,15µl/ml de brometo de etídio, sob luz UV. Os DNAs foram estocados a -20°C para posterior utilização.

Para as reações de PCR rotineiras, foram utilizados: 37,25µl de H₂O milli-Q, 5µl de Tampão PCR 10X, 1µl de dNTPs Mix 10mM, 2,5µl de MgCl₂ 50mM, 1,5µl de *Primer Forward* 10µM, 1,5µl de *Primer Reverse* 10µM, 0,25µl de Taq DNA Polimerase Recombinante Brasil 5U/µl (Invitrogen) e 1µl de DNA genômico (aproximadamente 30-100ng/µl). A ciclagem térmica foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante, sendo a temperatura de anelamento de acordo com o par de *primers* utilizados. Para a análise da integridade e especificidade das reações, 10µl dos produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose (1,4 a 2%), corado com brometo de etídio, sob luz UV.

4.4 DELINEAMENTO DE *PRIMERS* ESPECÍFICOS.

Os pares de *primers* específicos utilizados neste estudo foram delineados com auxílio do programa *Primer 3* (<http://frodo.wi.mit.edu>). A especificidade dos pares de *primers* para *S. mutans* foi confirmada através da análise de BLAST. Quando necessário, a manipulação de seqüências ocorreu utilizando-se a suíte de ferramentas *BioEdit 7* (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/>). As seqüências dos pares de *primers* utilizados neste estudo encontram-se no Anexo 1.

4.5 ESTRATÉGIAS MOLECULARES DE MUTAGÊNESE.

4.5.1 CONSTRUÇÃO DOS MUTANTES *KNOCKOUT* DOS GENES *COVR* OU *VICK*.

A inativação dos genes *covR* ou *vick* foi realizada através de recombinação homóloga com alelos contendo o gene alvo e o cassete de resistência à eritromicina, os quais foram construídos através da estratégia de mutagênese por PCR e ligação (*PCR ligation mutagenesis*) (Lau *et al.*, 2002), como ilustrado na Figura 5.

Os *primers* P2 e E1 contêm nas suas extremidades 5' as seqüências do sítio de restrição da endonuclease *Ascl* (5'-GG[^]CGCGCC-3'). Os *primers* P3 e E2 contêm o sítio reconhecido pela endonuclease *XhoI* (5'-C[^]TCGAG-3').

O gene de resistência à eritromicina foi amplificado do plasmídeo pVA838 (gi:13442777) através dos pares de *primers* E1/E2. A partir do DNA genômico extraído da cepa selvagem, as regiões flanqueando o gene alvo foram amplificadas com pares de *primers* específicos (P1/P2 e P3/P4). Para as reações de PCR de construção, utilizamos Taq DNA polimerase de alta fidelidade com atividade *proof reading* (Taq DNA Polymerase High Fidelity, Invitrogen). Para isto, as reações de PCR para os pares de *primers* E1/E2, P1/P2 e P3/P4 foram compostas por: 38,8µl de H₂O ultra pura, 5µl de Tampão PCR 10X, 1µl de dNTPs Mix 10mM, 2µl de MgSO₄ 50mM, 1µl de *Primer Forward* 10µM, 1µl de *Primer Reverse* 10µM, 0,2µl de Taq DNA Polimerase HF e 1µl de DNA molde (DNA ou

pDNA). Cada ciclo térmico de amplificação consistiu de desnaturação inicial a 95°C por 60s, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30s, anelamento a 57°C por 30s e extensão a 68°C por 60s. Para a análise da integridade e especificidade das reações, 10µl dos produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 1,5%, corado com 0,15µl/ml de brometo de etídio, sob luz UV, como exemplificado na Figura 6, alelos para construção do mutante *covR*-.

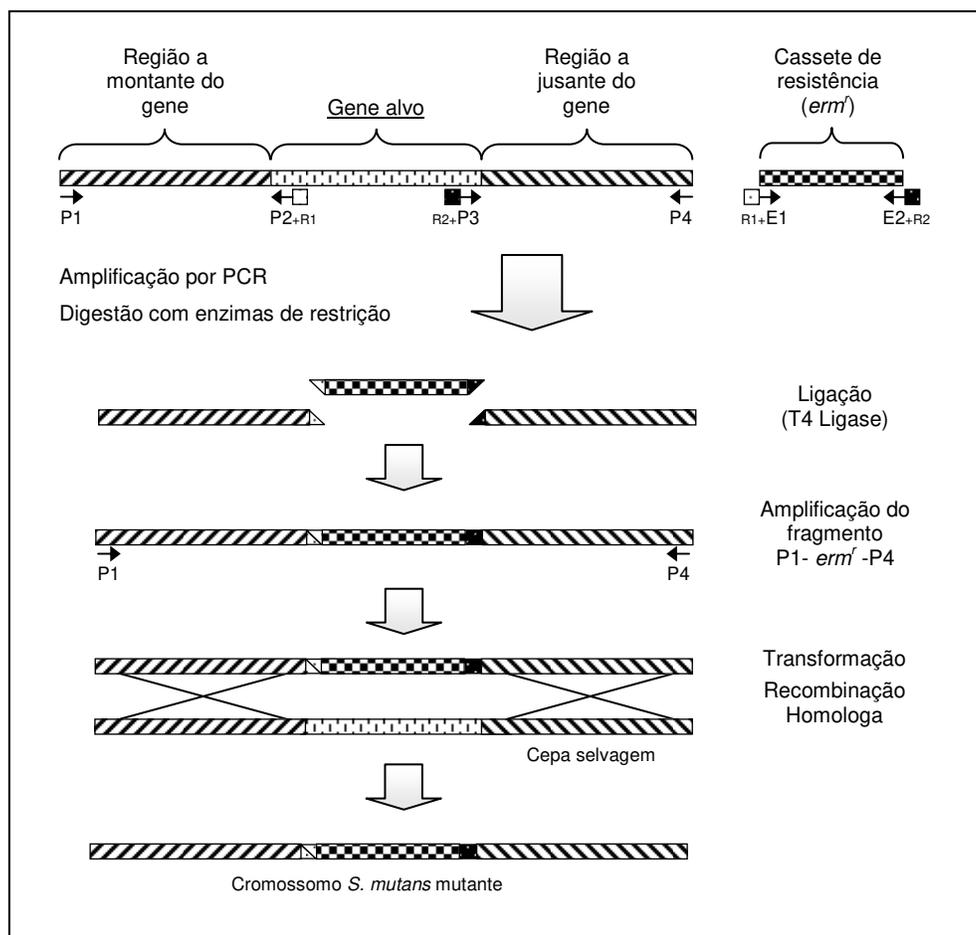


Figura 5: Estratégia de inativação gênica utilizando-se a técnica de mutagênese por PCR e ligação. Adaptado de Lau *et al.* (2002).

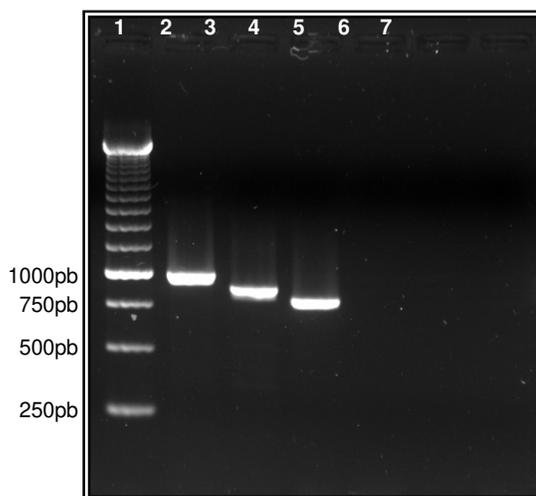


Figura 6: Gel de agarose (1,5%) contendo 10µl de produtos de PCR utilizados para construção do mutante *covR*. Canaleta 1: 0,9µg de padrão molecular 250pb (Invitrogen). Canaleta 2: produto obtido com E1/E2 a partir do pVA838. Canaletas 3 e 4: produtos obtidos com P3/P4 e P1/P2 a partir de DNA genômico da cepa selvagem, respectivamente. Canaletas de 5 a 7, controles negativos das reações de PCR: reação dos *primers* E1/E2, P3/P4 e P1/P2 na ausência de DNA molde, respectivamente.

Após a análise da integridade e especificidade das reações, os produtos foram purificados utilizando-se o sistema *StrataPrep PCR Purification Kit* (Stratagene, EUA), segundo recomendações do fabricante. Os produtos purificados de E1/E2 e P1/P2 foram então individualmente digeridos com a endonuclease *AscI* (New England BioLabs, EUA) e os produtos purificados E1/E2 e P3/P4 foram digeridos com a endonuclease *XhoI* (Invitrogen). Para as reações de digestão foram utilizados 8µl de produto purificado, 9µl de H₂O ultra pura, 2µl de tampão de reação 10x e 1µl de enzima. As amostras de digestão foram incubadas a 37°C durante 16h e as reações paralisadas através de incubação por 20min a 65°C. Os produtos digeridos foram purificados utilizando-se o sistema *StrataPrep PCR Purification Kit* e submetidos à reação de ligação com DNA ligase T4 (Invitrogen). A reação de ligação consistiu de 9,2µl de H₂O ultra pura, 4,8µl de tampão 5X, 2µl de enzima T4 ligase. Como DNA molde, foram utilizados 4µl de

E1/E2 e 4µl de P1/P2, ambos digeridos por *AscI* (Ligação A) ou 4µl de E1/E2 e 4µl de P3/P4, ambos digeridos por *XhoI* (Ligação B).

As ligações A e B foram então individualmente amplificadas com os *primers* distais. Para a ligação A, foram utilizados os *primers* P1/E2, enquanto que para a ligação B foram utilizados os *primers* E1/P4. As reações de PCR foram compostas por: 37,25µl de H₂O ultra pura, 5µl de Tampão PCR 10X, 1µl de dNTPs Mix 10mM, 2,5µl de MgSO₄ 50mM, 1,5µl de *Primer Forward* 10µM, 1,5µl de *Primer Reverse* 10µM, 0,25µl de Taq DNA Polimerase HF e 1µl de DNA molde (reação de ligação). Cada ciclo térmico de amplificação consistiu de desnaturação inicial a 95°C por 60s, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30s, anelamento a 57°C por 30s e extensão a 68°C por 60s. Para a análise da integridade e especificidade das reações, 4µl dos produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 1,5%, corado com 0,15µl/ml de brometo de etídio, sob luz UV (Figura 7).

Após a análise da integridade e especificidade das reações, os produtos foram purificados utilizando-se o sistema *StrataPrep PCR Purification Kit* (Stratagene, EUA) e submetidos a nova amplificação, com *primers* P1/P4, forçando a interação entre E1/P4 e P1/E2 através da região homóloga presente em ambos os produtos (gene *erm^r*), o que gerou grandes quantidades de fragmentos recombinantes P1-*erm^r*-P4. A reação de PCR foi composta por: 37,25µl de H₂O ultra pura, 5µl de Tampão PCR 10X, 1µl de dNTPs Mix 10mM, 2,5µl de MgSO₄ 50mM, 1,5µl de *Primer Forward* 10µM, 1,5µl de *Primer Reverse* 10µM, 0,25µl de Taq DNA Polimerase HF e 1µl de DNA molde (0,5µl de E1/P4 purificado e 0,5µl de P1/E2 purificado). Como controle positivo da reação de PCR, foi utilizado o DNA da cepa selvagem. Cada ciclo térmico de amplificação consistiu de desnaturação inicial a 95°C por 60s, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30s, anelamento a 57°C por 30s e extensão a 68°C por 120s. Para a análise da integridade e especificidade das reações, os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 1,5%, corado com 0,15µl/ml de brometo de etídio, sob luz UV (Figura 8).

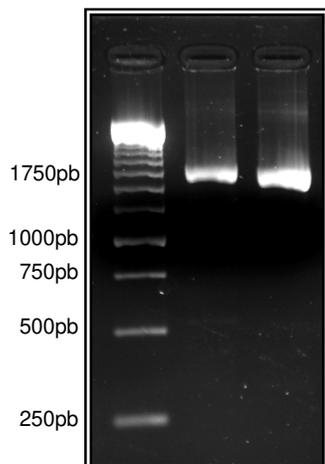


Figura 7: Gel de agarose (1,5%) contendo 4µl de produtos de PCR, utilizados na construção do inserto para *knockout* de *covR*. Canaleta 1: 0,9µg de Padrão molecular 250pb (Invitrogen). Canaletas 2 e 3: produtos de PCR obtidos com pares de *primers* E1/P4 (aprox. 1866pb) e P1/E2 (aprox. 1798pb), respectivamente.

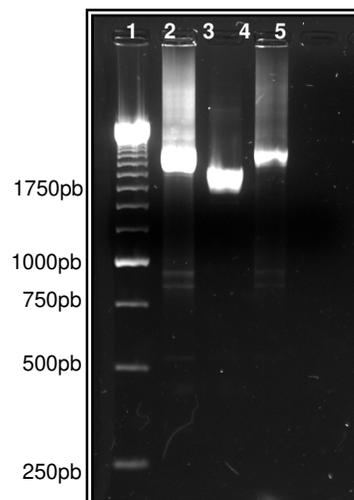


Figura 8: Gel de agarose (1,5%) contendo de produtos de PCR, utilizados na construção do inserto para *knockout* de *covR*. Canaleta 1: 0,9µg de Padrão molecular 250pb (Invitrogen). Canaleta 2: 10µl de produto de PCR obtidos com P1/P4 (aprox. 2669pb). Canaleta 3: controle positivo, 10µl de produto de PCR obtidos com DNA de UA159 (aprox. 2108pb). Canaleta 4: 4µl de produto de PCR obtidos com P1/P4 (aprox. 2669pb). Canaleta 5: controle negativo da reação de PCR.

O produto P1-*erm^f*-P4 foi purificado, a concentração de DNA determinada em espectrofotômetro (A_{260nm}), e a seguir utilizado para transformar as cepas de *S. mutans* (Item 4.6).

4.5.2 CONSTRUÇÃO PARA COMPLEMENTAÇÃO DOS GENES *COVR* OU *VICK*.

Para restaurar o fenótipo selvagem nas cepas onde o gene *covR* ou *vicK* foi inativado, re-inserimos o gene em elemento de DNA extra-cromossomal. O gene *covR* e sua região promotora, ou *vicK* e sua respectiva região promotora, foram amplificados com *primers* C1/C2 (Anexo 1) contendo em suas extremidades 5' seqüências do sítio de restrição da endonuclease EcoRI. Os produtos específicos de PCR purificados foram submetidos à digestão com EcoRI,

novamente purificados e reservados. O plasmídeo de baixo número de cópias pDL278, replicável em estreptococos, que confere resistência à espectinomicina (Dunny *et al.*, 1991), foi purificado como descrito no item 4.3 e submetido a digestão com EcoRI, para corte único. A clonagem do inserto da região gênica de *covR* ou *vick* no plasmídeo ocorreram pela reação de ligação com a enzima T4, em presença de excesso de inserto. O produto da reação foi utilizado para transformar (similar ao item 4.6) diretamente as cepas mutantes *covR*- ou *vick*-, sendo os transformantes selecionados em BHI agar contendo 300ug/ml de espectinomicina e 10ug/ml de eritomicina. Os transformantes foram rastreados por PCR com combinações de *primers* internos (Anexo1, *primers* qRT-PCR) e externos C1/C2.

4.6. TRANSFORMAÇÃO DE *S. MUTANS* E RASTREAMENTO DE MUTANTES.

Um total de 10µg dos fragmentos recombinantes (P1-*erm*^r-P4) foi utilizado para a transformação natural dos genótipos de *S. mutans*, segundo o método descrito por Perry & Kuramitsu, (1981). Resumidamente, 150µl de soro de cavalo inativado pelo calor foi adicionado a 2ml de THB. O meio de cultura foi aquecido a 37°C e acrescido de 50µl de células de *S. mutans* em cultura de 18h em TBH fresco. Após 4h de incubação a 37°C ($A_{550nm} \approx 0,2$), foram removidos 500µl desta cultura e transferidos a 500µl de meio de cultura THB fresco pré-aquecido a 37°C. O DNA recombinante foi imediatamente inserido e frascos foram incubados por 90min a 37°C. A seguir, o caldo foi diluído serialmente e plaqueado em agar BHI contendo 10µg/ml de eritromicina. As placas foram incubadas a 37°C, por 48h, em atmosfera de 10% de CO₂. Os mutantes recuperados foram cultivados rotineiramente em meios de cultura acrescidos de 10µg/ml de eritromicina e estocados a -20°C em meio *skim-milk* (Difco Labs, EUA).

Para rastreamento inicial dos transformantes recuperados em meio agar BHI com 10ug/ml de eritromicina, foram realizadas reações de PCR com *primers* E1/E2, utilizando-se como DNA molde as colônias de cada clone rastreado (*colony-PCR*). Os transformantes contendo o cassete de resistência

tiveram os DNA genômicos purificados e a confirmação da inserção correta se deu por reações de PCR (Lau *et al.*, 2002) nas quais foram utilizadas diferentes combinações de *primers* (P1/E2, E1/P4, P1/P4, P1/P2 e P3/P4).

4.7. COMPARAÇÕES DAS CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO PLANCTÔNICO DOS MUTANTES E RESPECTIVAS CEPAS SELVAGENS.

Os ensaios de crescimento foram realizados em tubos de polietileno com tampa rosqueável de capacidade de 50ml (Corning, EUA) contendo o total de 25ml de caldo BHI. A partir da cultura *starter* (seção 4.2), 500µl de inóculos (normalizados pela A_{550nm}) foram transferidos para tubos contendo 24,5ml de meio fresco pré-aquecido e incubados de zero a doze horas (37°C;10%CO₂), sendo retirados de uma em uma hora, para determinação das curvas de crescimento (A_{550nm} versus Tempo).

4.8. CONDIÇÕES DE COLETA DAS AMOSTRAS.

Para experimentos de comparação via *western-blot*, expressão gênica e *microarray*, as células foram crescidas em culturas planctônicas como descrito no item 4.7, até a A_{550nm} de 0,300 ($\pm 0,010$). Os tubos foram centrifugados (4min, 2°C, $\approx 3000g$) e o meio de cultura descartado.

Para a coleta, foi adicionado 1ml de solução salina (NaCl 0.9%) gelada ao *pellet*, que foi re-suspendido e as células transferidas a microtubos de 2ml com tampa de rosca e *o-ring* (Axigen, EUA). Os tubos foram centrifugados (1min, 2°C, $\approx 9000g$) e a solução salina descartada. Um total de 220µl de solução TE foi adicionada ao *pellet* celular, que foi imediatamente armazenado a -80°C até a purificação de RNA ou extração de proteínas.

4.9. PURIFICAÇÃO DO RNA TOTAL E EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL.

Para a extração de RNA total, a quebra das células congeladas ocorreu na presença de $\approx 0,16g$ de *beads* de zircônia 0.1mm de diâmetro (Biospec, EUA) em aparelho de *Mini-beadbeater* (Biospec) em força máxima (3 ciclos de 30sec

com 1 min de descanso em gelo). Para a purificação do RNA total, usamos o kit *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Alemanha) seguindo o protocolo do fabricante. Antes do uso, o RNA foi tratado com 10U de *Turbo DNase* (Ambion, EUA), seguindo o protocolo do fabricante.

A determinação da concentração e pureza das amostras de RNA foi realizada através da leitura em espectrofotômetro. O material foi considerado puro quando a razão entre as leituras $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ foi igual ou superior a 1,8.

A integridade das amostras de RNA foi determinada através da separação eletroforética de 8 μ l de cada amostra em géis desnaturantes de agarose a 1,2% (com 1,8% de formaldeído) contendo 0,15 μ l/ml de brometo de etídio, em tampão de corrida (20mM MOPS, 5mM acetato de sódio e 1 mM EDTA). As imagens digitais dos géis foram obtidas sob luz UV. A presença das duas bandas definidas, correspondentes aos RNAs ribossômicos (23S e 16S) indicou integridade das amostras.

Para a extração de proteínas totais, acrescentou-se 350 μ l de água ultra pura e \approx 0,16g de *beads* de zircônia 0.1mm de diâmetro (Biospec, EUA). Os microtubos foram levados em aparelho de *Mini-beadbeater* (Biospec) em força máxima (3 ciclos de 60sec com 1 min de descanso em gelo). O sobrenadante livre de *beads* foi transferido a outro microtubo, vortexado (30s) e teve a concentração protéica dosada pelo reagente de Bradford (Sigma, EUA). Foi adicionado tampão Laemmli (Bio-Rad, EUA) na proporção 1:1 e as amostras conservadas a -20°C até o uso. A qualidade e integridade das amostras foram avaliadas pela separação de 8 μ g separadas em géis de SDS-PAGE a 8%, com auxílio de sistema Mini-Protean III (Bio-Rad, EUA), em tampão de corrida (TBS -100mM de tampão Tris-HCl, 200mM de Tris, 1,37M de NaCl), a 26-36mA, durante 2h. Géis de qualidade corados por azul de Coomassie foram confeccionados para todos os extratos protéicos.

4.10. COMPARAÇÃO DO PERFIL DE TRANSCRIÇÃO BASEADO EM *MICROARRAY*.

Para os ensaios de *microarray* utilizamos lâminas cedidas pelo departamento *Comprehensive Microbial Resource* do Instituto J. Craig Venter (JVC)(EUA). Cada lâmina contém, em quadruplicata, seqüências controle internas e seqüências específicas de ≈ 70 pb de cada uma das 1960 fases abertas de leitura do genoma de *S. mutans* UA159, correspondendo a uma abrangência de 100% dos prováveis genes do genoma. O ensaio baseia-se na hibridização competitiva de cDNAs de duas origens, diferentemente marcados, frente aos pontos (*spots*) contendo seqüências impressas na lâmina.

Os experimentos foram executados de acordo com os protocolos M007 revisão 2.0 (Anexo 2) e M008 revisão 2.1 (Anexo 3), fornecidos pelo JVC. Brevemente, o cDNA foi gerado a partir de 2 μ g de RNA total com *primers* randômicos e conjugados com corantes *Cy3* ou *Cy5*. As lâminas foram hibridizadas, lavadas, secas e lidas em *scanner* Genepix 4000B (Axon Molecular Devices, EUA). A intensidade das fluorescências foram quantificadas usando o programa GenePix Pro 6.0 (Axon Molecular Devices). Os resultados foram analisados usando o algoritmo de análise estatística LIMMA, com documentação e uso disponíveis em www.brop.org. O valor de corte para os genes positivamente ou negativamente regulados foi correspondente a $p \leq 0.001$, o que em prática significa uma expressão diferencial aproximada maior que 2,5 vezes, na maioria dos casos. Os ensaios foram feitos em quadruplicata (réplicas técnicas, invertendo-se os corantes – *dye swap and dye switch*), que continham pelo menos três extrações independentes de RNA (réplicas biológicas).

As listagens completas dos dados obtidos com *microarray* serão disponibilizados de acordo com o padrão MIAME (Brazma *et al.*, 2001), quando da publicação dos resultados em revista científica internacional, segundo normas JCV (Anexo 4).

Nas análises de bioinformática referentes às buscas de provável função, de domínios principais, de classificação, e de similaridades inter-espécies,

foram utilizados primariamente os bancos de dados BLAST, BRENDA, KEGG e UNIPROT, além da literatura indexada disponível.

4.11. TRANSCRIÇÃO REVERSA RNA → cDNA.

Variações de expressão identificadas nos ensaios de *microarray* foram validadas através da transcrição reversa de RNA e quantificação específica por qPCR a partir do *pool* de cDNAs. Para maior confiabilidade, nos experimentos de qRT-PCR foram utilizadas extrações de RNA independentes daquelas utilizadas para *microarray*.

Para obtenção do *pool* de cDNA, 1µg de RNAm total livre de DNA foi misturado 1µl da mistura dos *primers* arbitrários (Ea1/Ea7/Es1/Es3/Es8, concentração final de 2µM para cada oligo) (Chia *et al.*, 2001), 1µl de 10mM dNTP mix e H₂O DEPC qsp 10µl. Cada mistura inicial foi aquecida a 65°C por 5min, e resfriada por 1min a 0°C. Um segundo microtubo, contendo 2µl de tampão RT 10X, 4µl de 20mM MgCl₂, 2µl de 0.1M DDT, 1µl de RNase OUT (40U/µl) e 1µl de SuperScript III (Invitrogen, 200U/µl) por amostra, foi preparado como solução *mastermix*, sendo desta transferidas 10µl para cada tubo resfriado. As reações de RT ocorreram com incubação a 25°C durante 10min, a 50°C por 120min e foi finalizada a 85°C por 5min em termociclador (Thermoblock T1, Biometra, Alemanha). Após a reação, água ultra pura foi adicionada para ajustar a concentração do produto para 10ng/µl. Os cDNAs obtidos foram estocados a -20°C, para posterior utilização nas reações de qPCR. Os ensaios foram feitos com RNA de pelo menos 3 culturas independentes.

Como controle negativo, para assegurar a ausência de DNA contaminante nas amostras, foram conduzidos em paralelo ensaios para cada amostra de RNA tratado, sob as mesmas condições, substituindo-se 1µl de SuperScript III (200U/µl) por 1µl de H₂O DEPC. Estas amostras foram incluídas nas reações de PCR, onde a ausência de produto de PCR visível em gel demonstrou a ausência de DNA genômico contaminante na amostra de RNA tratado.

4.12. PCR QUANTITATIVO (qPCR).

Para máxima eficiência, os pares de *primers* para qPCR foram delineados (Item 4.4) para gerar produtos de tamanho de 140 a 200 pares de base. A reação de 25µl foi composta por cDNA (30ng), 30µM de cada *primer* e 1× *SYBR-Green mix* (Bio-Rad, EUA). Usando o sistema *iCycler* (Bio-Rad), cada ciclo térmico de amplificação consistiu de desnaturação inicial a 95°C por 3min, seguido por 45 ciclos de desnaturação a 94°C por 15s, anelamento por 15s e extensão a 72°C por 30s.

A expressão dos genes foi normalizada pelos valores de expressão do gene 16S rRNA (Stipp *et al.*, 2008) que mostrou-se não flutuante nas condições utilizadas. Os ensaios de qPCR foram feitos em duplicata, a partir de cada um dos três cDNAs independentes (Item 4.11). Como um dos controles negativos da reação, misturas sem cDNA foram incluídas para assegurar a ausência de DNA contaminante nos reagentes, além de monitorar possível formação de dímeros de *primers*. Em cada corrida realizou-se, em duplicata, uma curva de amplificação de gDNA em quantidades decrescentes: 300ng, 30ng, 3ng, 0.3ng, 0.03ng por poço.

4.13. PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES E ANTICORPOS POLICLONAIS.

Para gerar as proteínas CovR e VicR recombinantes (r-CovR e r-VicR, respectivamente) fusionadas com cauda 6-HIS (His•Tag, Novagen, EUA), as seqüências gênicas foram amplificadas com os *primers* de construção covRHisF e covRHisR ou vicRHisF e vicRHisR. Os produtos de PCR foram digeridos com endonucleases NcoI e XhoI (New England Biolabs, EUA), purificados e ligados em vetor pET-22b(+)(Novagen), que foi previamente digerido, com as mesmas enzimas e purificado. O produto da ligação foi transformado em *E. coli* DH5α e os transformantes selecionados em meio LA agar contendo ampicilina a 100ug/ml. Colônias passaram pela triagem por PCR, para verificar a correta inserção do fragmento, utilizando-se a combinação de *primers* de construção His e *primers* T7

(Novagen). Colônias que continham o inserto corretamente inserido no plasmídeo foram crescidas em meio líquido e os plasmídeos extraídos.

Os plasmídeos clonados e purificados, pET-covR ou pET-vicR foram então transformados em *E.coli* BL22. A triagem foi composta por PCR, como anteriormente, e SDS-PAGE, a partir de culturas em LB induzidas com 1mM IPTG.

As proteínas foram produzidas em larga escala em 1 litro de cultura ($A_{550nm} \approx 0.8$) depois de 3 horas de indução com 1mM de IPTG. Para purificação, as células foram lisadas e o conteúdo protéico submetido à cromatografia de afinidade em agarose Ni^{2+} (NTA agarose, Qiagen), de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante. As proteínas eluídas foram então dializadas por 18 horas em PBS, a 4°C, sob leve agitação. Alíquotas das proteínas purificadas foram armazenadas em -20°C e sua pureza/integridade visualizada por SDS-PAGE.

Anticorpos policlonais contra r-CovR e r-VicR foram produzidos em coelhos, utilizando-se o protocolo *77 Days Rabbit Protocol* (Covance, EUA) (Anexo 5). A especificidade contra as proteínas recombinantes foram avaliadas em ensaios de *western blot* e ELISA.

4.14. QUANTIFICAÇÃO ESPECÍFICA DE PROTEÍNAS POR *WESTERN BLOT*.

A GbpB é uma proteína que pode ser encontrada tanto secretada no meio de cultura como associada à célula (Mattos-Graner *et al.*, 2006). Para avaliar proteínas secretadas em meio de cultura, sobrenadantes das culturas de BHI das cepas (Item 4.8) foram centrifugados (3000xg/2°C/5m in) e os sobrenadantes transferidos para novos tubos. Este procedimento foi realizado duas vezes. Alíquotas de 1ml foram transferidas para microtubos, acrescidas de 1µl de inibidor de protease 10mM PMSF (Sigma) e 500µl de tampão Laemmli 3× (Bio-Rad) e estocados a -20°C.

Um total de 0.5µg do extrato total de proteínas (Item 4.8) ou 15µl de sobrenadante foram resolvidos em géis de SDS-PAGE a 10%, com auxílio de sistema Mini-Protean III (Bio-Rad, EUA), em tampão de corrida (100mM Tris, 100mM HEPES, 3mM SDS), a 26-36mA, durante 2h. As proteínas foram eletro-

transferidas para membranas de PVDF (Millipore, EUA) utilizando-se o aparato de transferência semi-seca Trans-Blot SD (Bio-Rad, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A membrana contendo os antígenos foi bloqueada através de incubação *overnight* a 4°C, com tampão de bloqueio PBS com 5% de leite desnatado.

A seguir, a membrana foi incubada à temperatura ambiente sob leve agitação durante 1h com o soro anti GbpB específico (Smith *et al.*, 1994) diluído 1:1000 em tampão de bloqueio. Como controle negativo, membranas com os mesmos antígenos testados foram incubadas apenas com tampão de bloqueio e soro de rato não imunizado com GbpB (*sham*). Depois da incubação, realizaram-se lavagens (5×) com PBS (5min e 20ml cada) sob agitação. As membranas foram então incubadas por mais 1h com anticorpo secundário IgG de cabra anti-IgG de rato conjugado com peroxidase (Pierce, EUA). Realizaram-se lavagens (5×) com PBS (5min e 20ml cada) sob agitação leve. As reações foram detectadas através do sistema ECL (Pierce ECL Substrate, Pierce) de acordo com as recomendações do fabricante, sendo o último passo a exposição da membrana a filme radiográfico *Ultraspeed* (Kodak, EUA) em períodos de tempo controlados e condições não saturadas. Após revelação e secagem, os filmes foram digitalizados através de *scanner* (Bio-Rad) e as intensidades das bandas quantificadas através do programa *Molecular Analyst 1.5* (Bio Rad). Em todos os ensaios utilizou-se como controle positivo uma amostra de proteína preparada a partir da cepa UA159, como referência.

Os ensaios envolvendo reconhecimento de CovR e VicR em extratos protéicos totais foram realizados de forma similar, com o uso de anticorpo secundário IgG de cabra anti-IgG de coelho.

4.15. ENSAIOS DE RETARDAMENTO DA MOBILIDADE ELETROFORÉTICA (EMSA).

Pares de *primers* foram delineados (Item 4.4) para incluir as prováveis regiões promotoras dos genes selecionados. Os produtos de PCR (~300pb) foram purificados, marcados com cauda de digoxigenina e armazenados a -20°C, de

acordo com as instruções e reagentes do kit DIG Gel Shift Kit (Roche, EUA). Para fosforilação de r-CovR ou r-VicR, as proteínas passaram por incubação com 50mM acetil fosfato por 45min a 25°C (Biswas & Biswas, 2006).

Os ensaios de EMSA ocorreram em reações de 25ul, contendo tampão de ligação 1×, concentrações crescentes de r-CovR (0.25 a 1µmoles) ou r-VicR (1 a 4µmoles) fosforilados ou não, quantidades fixas de produto de PCR marcado (0.6pmole) (Biswas & Biswas, 2006). As misturas foram incubadas por 60min a 25°C controlados. Os complexos proteína-DNA foram resolvidos em gel de poliacrilamida a 6% em condições não desnaturantes (Novex DNA Retardation Gels, Invitrogen) a 70V por 3h. Os fragmentos foram transferidos para membrana de *nylon* positivamente carregada (Amersham GE Healthcare, EUA) utilizando-se o aparato de transferência semi-seca Trans-Blot SD (Bio-Rad, EUA). Após transferência, a membrana foi exposta a luz UV por 2 minutos para fixação dos fragmentos. As membranas foram utilizadas imediatamente ou reservadas a 4°C.

As reações foram detectadas e reveladas usando o kit DIG Wash & Block (Roche), de acordo com as instruções do fabricante, sendo o último passo a exposição da membrana a filme radiográfico comum. Os filmes foram secos e digitalizados através de *scanner*. A especificidade foi confirmada com a adição de excesso de 120 ou 200 vezes de fragmentos de DNA não marcados.

4.16. ANÁLISES FENOTÍPICAS.

Uma vez que os regulons de CovR e VicKR compartilham diversos genes provavelmente envolvidos na biogênese de parede celular, os mutantes *covR* e *vicK* foram caracterizados fenotipicamente em algumas características relacionadas, incluindo análises da morfologia por microscopia eletrônica de varredura (MEV), hidrofobicidade de parede e susceptibilidade à autólise. O acúmulo na forma de biofilmes foi quantificado e teve sua morfologia inicial avaliada por MEV. Para todos estes ensaios, três repetições foram realizadas em três experimentos independentes.

4.16.1 FORMAÇÃO DE BIOFILME.

A caracterização da capacidade de crescimento em biofilme das cepas selvagens e mutantes foi realizada como descrito anteriormente (Mattos-Graner *et al.*, 2001), com pequenas modificações. Um total de 500µl de cultura crescida ($A_{550nm}=0.3$, Item 4.8) em BHI foi transferido para 4,5ml de BHI estéril acrescido de sacarose (concentração final 0.1%). Alíquotas de 250µl foram transferidas em triplicata para placas de poliestireno de 96 poços, não tratadas, fundo em U (catálogo #351177, BD Biosciences, EUA). As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera de anaerobiose ou 10%CO₂ por 12, 18, ou 24h. Após incubação, as culturas líquidas das placas de microtitulação foram removidas e os biofilmes submetidos a três lavagens com tampão fosfato pH 6.8 (PBS), para remoção das células fracamente aderidas. Os biofilmes formados nas paredes dos poços foram corados com solução aquosa de cristal violeta a 1%, novamente lavados por 3 vezes e, a seguir, secos. O corante dos biofilmes foi solubilizado pela incubação com etanol 99% durante 30 minutos em temperatura ambiente. Volumes de 150µl da solução foram transferidos para nova placa com fundo chato e as absorbâncias (A_{575nm}) medidas em leitor de ELISA (VersaMAX, Molecular Devices, EUA).

4.16.2 HIDROFOBICIDADE CELULAR.

As análises de hidrofobicidade da parede celular foram realizadas como descrito por Gibbons e Etherden (1983), com algumas modificações. As células obtidas como descrito no item 4.8 ($A_{550nm}=0.3$) foram centrifugadas, lavadas em solução NaCl 0.9% e novamente centrifugadas. O *pellet* celular foi re-suspendido em tampão PU (22,2g K₂HPO₄·3H₂O; 7,26g KH₂PO₄; 1,8g de uréia e 0,2g de MgSO₄·7H₂O por litro, pH 7,1) até uma absorbância (A_{550nm}) de 0,900 (±0.010).

Amostras de 3ml das suspensões foram transferidas para tubos de ensaio de vidro e acrescidas ou não de 400µl de hexadecano (Sigma). As suspensões foram então incubadas a 30°C e a seguir agitadas em vórtex durante dois períodos de 30s com intervalos de 5s. Nos tubos incubados com hexadecano

(H), a fase inferior, correspondente à fase aquosa (hidrofílica), foi cuidadosamente removida com auxílio de micropipeta para determinação da leitura a A_{550nm} . Os tubos não incubados com hexadecano (C) serviram como controle da A_{550nm} durante o tratamento.

A fase hidrofóbica foi estimada subtraindo-se o valor de do tubo (C) menos tubo (H). A porcentagem de células hidrofóbicas foi calculada dividindo-se o valor da fase hidrofóbica estimada pelo valor do tubo (C).

4.16.3 SUSCEPTIBILIDADE À AUTÓLISE.

As análises da susceptibilidade à autólise foram realizadas como descrito por Ahn & Burne (2007), com algumas modificações. As células obtidas como descrito no item 4.8 ($A_{550nm}=0.3$) foram centrifugadas, lavadas em solução NaCl 0.9% e novamente centrifugadas. O *pellet* celular foi re-suspendido em tampão AT (1M KCl; 1mM $CaCl_2$; 1mM $MgCl_2$ e 0,4% de azida sódica, pH 6,5) até uma absorvância (A_{550nm}) de 0,900 (± 0.010). Estas suspensões foram então incubadas a 44°C e o processo de autólise monitorado com auxílio de espectrofotômetro durante 24, 48 e 72h.

4.16.4 ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR POR MEV.

Para os ensaios de análise da morfologia celular por MEV, as células provenientes de uma cultura a $A_{550nm}=0.3$ (500 μ l) foram coletadas por centrifugação, lavadas em salina e re-suspendidas em tampão PBS-paraformaldeído a 2,5%. As células foram então depositadas sobre lamínula de vidro para fixação. Após 30min, a amostra recebeu banhos com concentrações crescentes de etanol (50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100%) por 20min cada, para desidratação. A seguir, os espécimes foram secos, metalizados e armazenados em dessecador para subsequente observação em microscópio eletrônico de varredura (JEOL, JSM 5600LV, Japão).

4.16.5 ANÁLISE DA FORMAÇÃO INICIAL DE BIOFILME POR MEV.

Para os ensaios de análise da formação inicial de biofilme por MEV, lamínulas circulares de 13mm de diâmetro (Glastec, Brasil) foram esterilizadas e depositadas no fundo de microplacas de 24 poços (Corning, EUA). Um total de 500µl de cultura crescida ($A_{550nm}=0.3$, Item 4.8) foi transferido para 4,5ml de BHI estéril acrescido de sacarose (concentração final 0.1%) pré-aquecido. Alíquotas de 1ml foram transferidas para cada poço e a placa incubada por 2 ou 4 horas (37°C;10%CO₂). Após a incubação, o meio de cultura foi removido, os poços lavados com solução salina por três vezes. O biofilme foi fixado em tampão PBS-paraformaldeído a 2,5% por 30min e, a seguir, desidratado em concentrações crescentes de etanol (50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100%) por 20min cada. Os espécimes foram secos, metalizados e armazenados em dessecador para subsequente observação em microscópio eletrônico de varredura (JEOL, JSM 5600LV, Japão).

5. RESULTADOS

5.1. CRESCIMENTO PLANCTÔNICO E CARACTERÍSTICAS DOS MUTANTES *covR*- E *vick*-.

Como esperado, a construção dos mutantes *covR*- ou *vick*- foi possível em todas as cepas testadas. Colônias puderam ser facilmente recuperadas após a mutação, indicando que estes genes não são essenciais à viabilidade celular nas cepas testadas.

Análises de *Western blot* mostraram ausência de proteína CovR em todos os mutantes *covR*-, como exemplificado na Figura 9. Já os mutantes *vick*- apresentaram uma redução de cerca de 90% nos níveis de VicR (Figura 9).

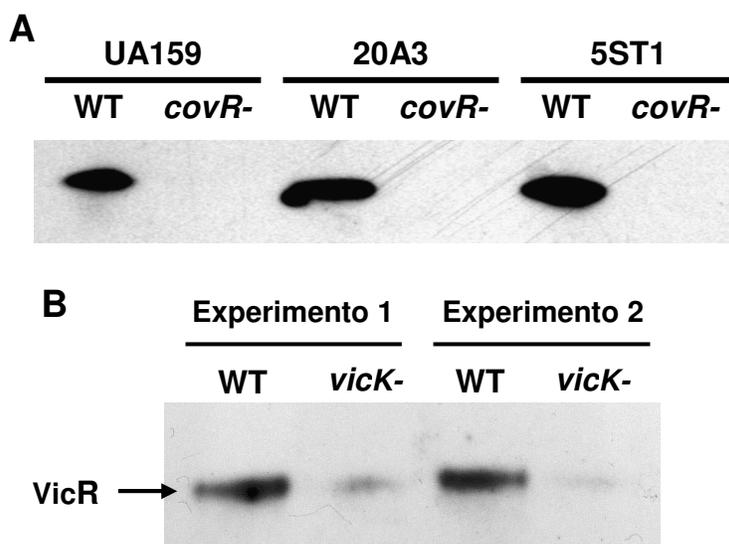


Figura 9 - Proteínas totais de cepas selvagens e mutantes submetidas a ensaios de *Western blot*. Em A, 1µg de extrato protéico total das cepas WT e respectivos mutantes *covR*- frente a anticorpo policlonal específico anti r-CovR. Em B, 1µg de extrato protéico total da cepa UA159 e respectivo mutante *vick*- frente a anticorpo policlonal específico anti r-VicR, em duas coletas independentes.

As cepas selvagens e respectivos mutantes possuem taxas de crescimento similares durante o início e meio da fase logarítmica de crescimento, até pelo menos a densidade óptica de $A_{550nm}=0,300$ (Figura 10).

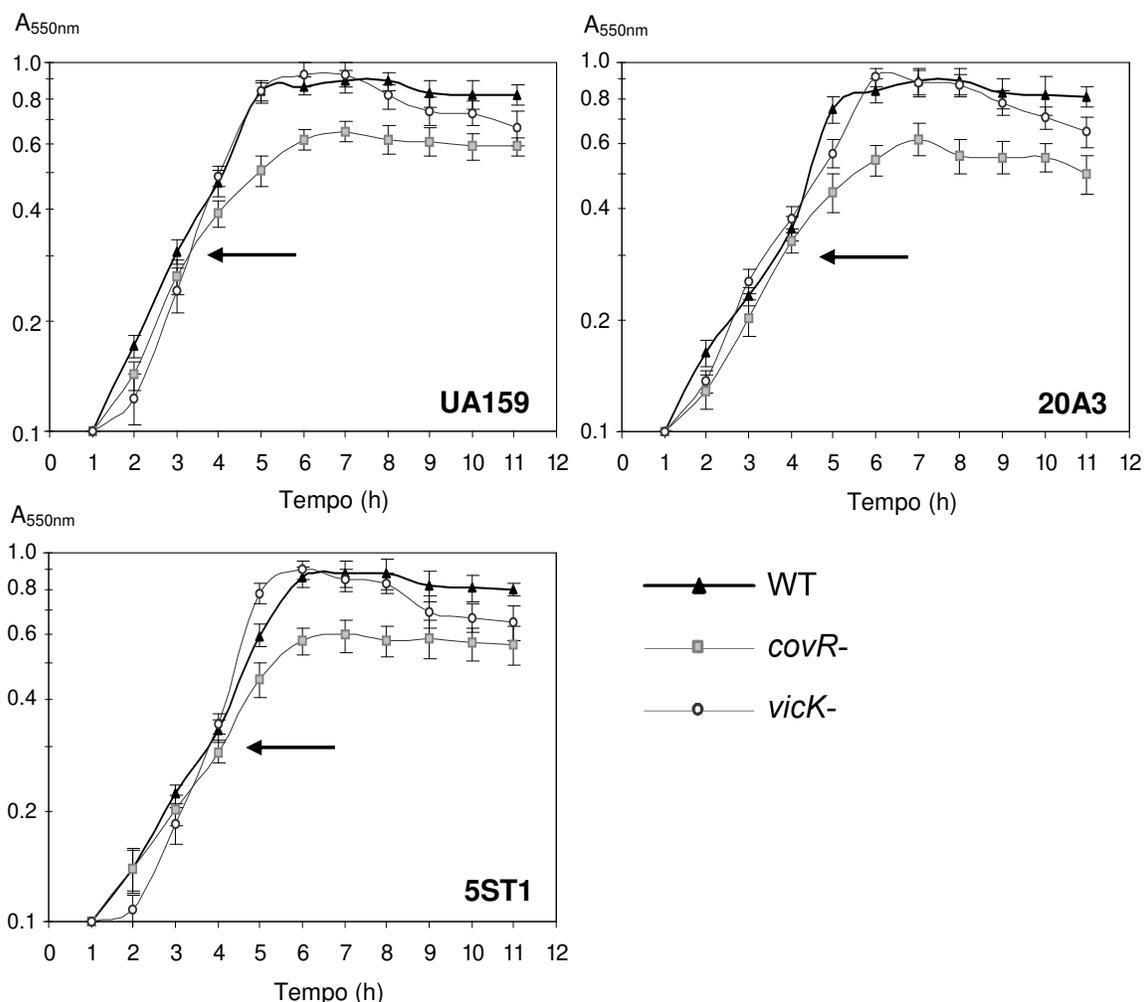


Figura 10: Curvas de crescimento das cepas UA159, 20A3 e 5ST1 selvagens (WT) e mutantes para *covR*- e *vick*- em meio BHI. O ponto de coleta de amostras ($A_{550nm}=0,300$) está indicado pela seta.

Nas condições utilizadas neste estudo, os mutantes *vick*⁻ não apresentaram alteração significativa na velocidade de crescimento ou crescimento planctônico total quando comparado com as cepas selvagens. Já a deleção de *covR*, embora não tenha causado diminuição na velocidade de crescimento, limitou o crescimento planctônico total dos mutantes para valor máximo de $A_{550nm}=0,650(\pm 0,060)$, correspondendo a um crescimento de aproximadamente 30% menor que as cepas selvagens ($A_{550nm}=0,900\pm 0,068$) ($p < 0.05$, ANOVA) (Figura 10).

Devido a esses fatores e devido a trabalhos prévios que demonstram que a expressão gênica pode ser dependente da fase de crescimento (Stipp *et al.*, 2008), definimos o ponto de coleta das amostras $A_{550nm}=0,300$, até onde todas as amostras apresentam mesma velocidade de crescimento e estão sob a mesma densidade óptica num determinado momento, visando minimizar os efeitos da fase de crescimento e tempo de cultivo nas comparações.

As comparações entre culturas planctônicas em BHI demonstraram que, enquanto as cepas selvagens cresciam de forma relativamente homogênea e em suspensão, as cepas mutantes *vicK*- concentravam-se na base dos tubos (Figura 11). Resultados iguais utilizando a cepa UA159 foram previamente descritos por Senadheera *et al.* (2005). Todos os mutantes *vicK*- obtidos apresentaram estas mesmas características em cultura saturada.

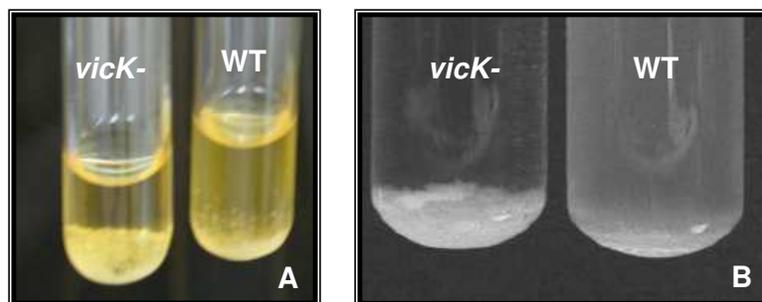


Figura 11: Em A, aspecto representativo da primeira passagem das culturas das cepas 20A3 selvagem (WT) e 20A3 mutante para *vicK*- em 3ml de meio BHI (18hrs, 37°C, 10%CO₂). Em B, resultados obtidos por Senadheera *et al.* (2005) com a cepa UA159.

5.2. A FORMAÇÃO DE BIOFILME EM *S. MUTANS* É CONTROLADA POR *COVR* E *VICRK*.

O efeito das deleções de *covR* e *vicK* na capacidade de formação de biofilme por *S. mutans* foi avaliado em diferentes tempos. Como a técnica baseia-se em medir a quantidade de células aderidas indiretamente pela intensidade do corante cristal violeta, é necessário ter uma quantidade mínima de biofilme formado, ao mesmo tempo em que os biofilmes formados não podem estar em quantidades muito elevadas, pois há saturação da capacidade de leitura. Assim,

foram realizados biofilmes com crescimento em 12, 18 e 24 horas para assegurar o melhor intervalo para leitura das nossas amostras. Em 12 horas, há pouca formação de biofilme e as leituras ficam próximas de zero. Em 18 horas, há um crescimento adequado para quantificação (Figura 12), enquanto em 24 horas as diferenças se achatam, revelando saturação no ensaio.

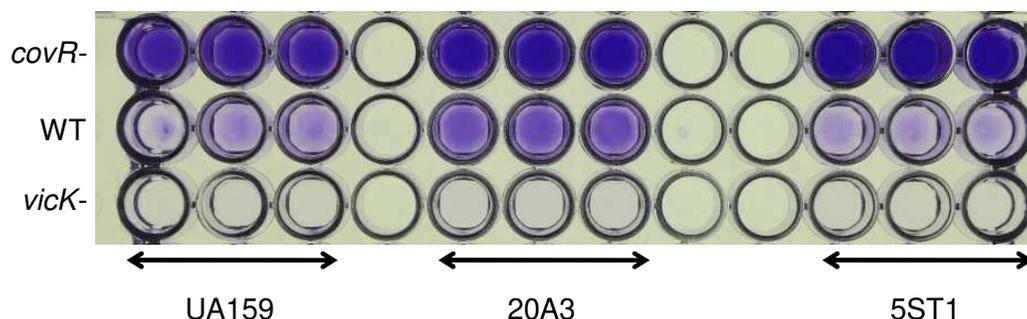


Figura 12: Biofilme de 18h em 10%CO₂ formado pelas cepas UA159, 20A3 e 5ST1 e respectivas cepas mutantes, após remoção do sobrenadante, lavagem e coloração com cristal violeta 1%. Cada poço representa o biofilme formado por uma cultura independente.

Após leitura dos resultados e normalização em função dos valores obtidos para as cepas selvagens, os mutantes *covR*- demonstraram aumento variável, formando cerca de 3 a 17 vezes mais biofilmes *in vitro* quando comparados com as respectivas cepas selvagens ($p < 0.01$, ANOVA) (Figura 13).

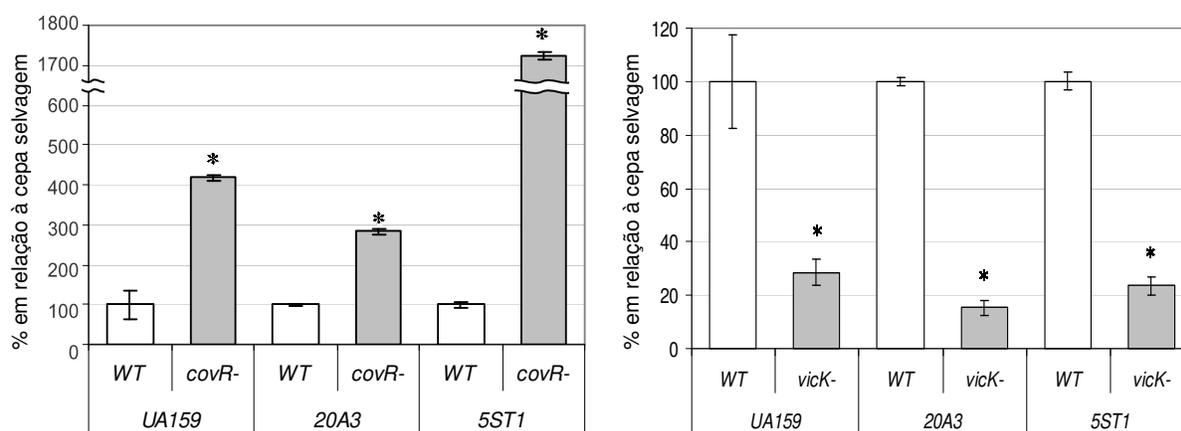


Figura 13: Quantificação dos biofilmes formados pelas cepas UA159, 20A3 e 5ST1 e respectivas cepas mutantes. Os valores das leituras obtidos nas cepas selvagens foram definidos como 100% e valores proporcionais nas cepas mutantes. Difere da cepa selvagem * ($p < 0.01$, ANOVA).

Já os mutantes *vick*- demonstraram redução de 3,5 a 5,5 vezes em relação às respectivas cepas selvagens ($p < 0.01$, ANOVA) (Figura 13). Independentemente do *background* genético, a presença de CovR reprimiu a formação de biofilme, enquanto que o sistema VicRK funcional estimulou a formação de biofilme por *S. mutans*. Isso demonstra que genótipos distintos de *S. mutans* compartilham, pelo menos, alguns mecanismos similares de regulação de fatores de virulência.

Em cada amostra, a maior quantidade de biofilme formado está relacionada com um decréscimo no número de células planctônicas (Figura 14). Isso indica que o número total de células dentro de cada poço do ensaio foram próximos e, portanto, os resultados não refletem um crescimento diferente de determinada amostra.

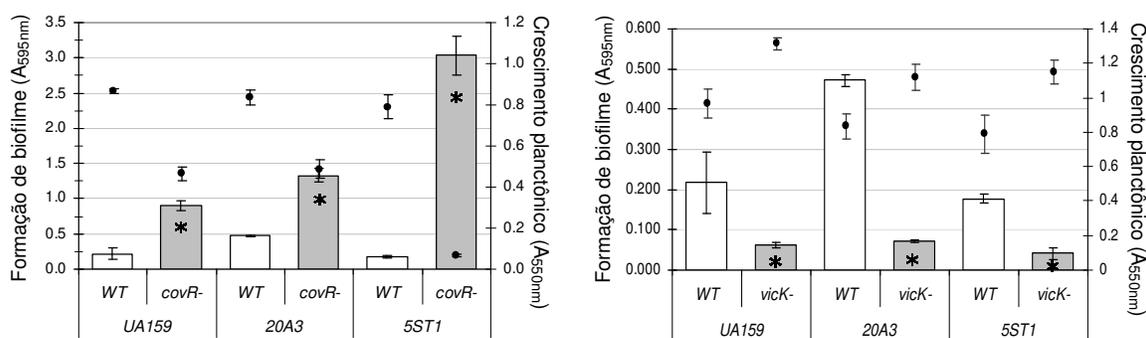


Figura 14: Dados brutos da quantificação dos biofilmes formados pelas cepas UA159, 20A3 e 5ST1 e respectivas cepas mutantes. Os valores das leituras obtidos na formação de biofilme estão representados por barras, e os valores das leituras obtidas no crescimento planctônico estão representados pelos círculos preenchidos. * ($p < 0.01$, ANOVA).

5.3. OS SISTEMAS COVR E VICRK CONTROLAM A EXPRESSÃO DOS GENES *GBP*B, *GTF*B, *GTF*C E *GTF*D.

O sistema VicRK induz a expressão de *gtfB/C/D* e *gbpB* (Senadheera *et al.*, 2005) enquanto que CovR reprime a expressão de, pelo menos, *gtfB/C/D* e *gbpC* (Sato *et al.*, 2000; Idone *et al.*, 2003; Biswas & Biswas 2006). Nas três cepas mutantes *covR*-, a expressão de *gtfB* foi altamente afetada, elevando-se a valores

de 15 a 17 vezes mais que na cepa selvagem. Nos mesmos mutantes, a expressão de *gtfC* foi de 2,5 a 4,5 vezes maior e de *gtfD*, 2 a 4 vezes maior (Figura 15). Em adição, obtivemos dados inéditos de que a inativação de *covR* promove um aumento significativo na expressão de *gpbB* na cepa UA159. Este achado foi confirmado em outros isolados clínicos de *S. mutans* (20A2 e 5ST1), revelando um aumento de 1,5 a 2,6 vezes dependendo do genótipo (Figura 15).

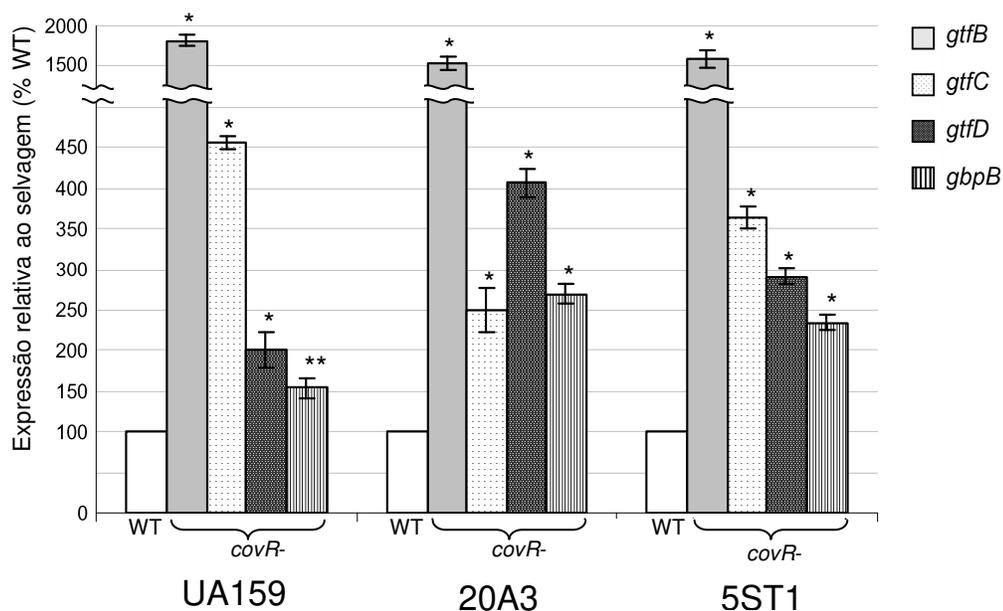


Figura 15: Expressão gênica nas cepas selvagens e mutantes *covR*⁻. Os níveis de transcritos foram avaliados por RT-PCR quantitativo. O valor de expressão de cada um dos genes das cepas selvagens foi definido como 100%, e os níveis de expressão nos respectivos mutantes *covR*⁻ em função desse valor. Utilizando o teste ANOVA nos dados absolutos, diferem da cepa selvagem em ** $p < 0.05$ ou * $p < 0.01$.

A análise dos resultados da alta formação de biofilme pela cepa 5ST1 *covR*⁻ com os níveis de expressão gênica dessa cepa, quando equiparadas com os demais resultados de outros mutantes *covR*⁻, não forneceram correlação de aumento de expressão gênica que justificasse o aumento excessivo na formação de biofilme por essa cepa, indicando que outros mecanismos além dos propostos à análise podem ter contribuído para esse fenótipo.

A complementação das cepas com os genes *covR* e *vick* *in trans* restaurou o nível de expressão gênica nas cepas estudadas. Utilizando a cepa UA159 como exemplo, a expressão de *gtfB* no mutante *covR*⁻, 17 vezes mais expressa, retornou a níveis próximos a expressão da cepa selvagem (Figura 16). Foi notado que, de forma geral, quanto maior a diferença de expressão entre cepa WT e mutante, maior o desvio padrão, como, por exemplo, a expressão de *gtfB* em *covR*⁺ ou a expressão de *gtfD* em *vick*⁺ (Figura 16). Isto foi uma variação considerada normal, que é provavelmente devido ao número de cópias do plasmídeo.

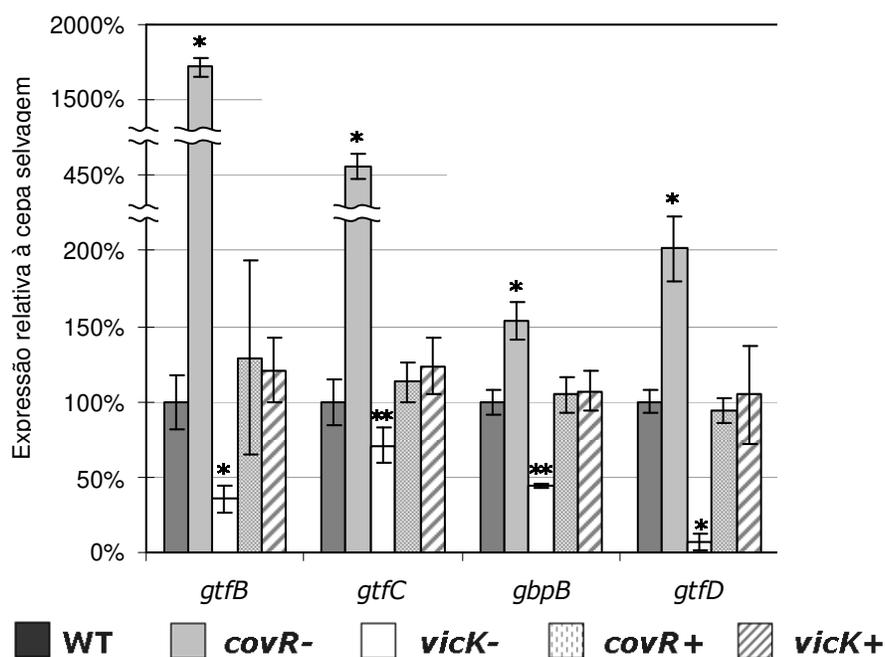


Figura 16: Expressão gênica na cepa UA159. Amostras selvagem (WT), mutantes (-) e mutantes complementados (+). O valor de expressão de cada um dos genes na cepa WT foi definido como 100%, e os níveis de expressão das demais amostras em função desse valor. Utilizando o teste ANOVA nos dados absolutos, diferem da cepa selvagem em ** $p < 0.05$ ou * $p < 0.01$.

Em complementação aos resultados dos ensaios de expressão gênica, quantificamos a tradução de GbpB nas cepas selvagens e mutantes. Devido ao

fato da GbpB ser uma proteína encontrada na forma secretada e associada a célula (Mattos-Graner *et al.*, 2006), as análises de *western blot* foram realizadas tanto no extrato protéico total, como no sobrenadante das culturas.

A cepa UA159 na ausência de CovR produziu 3.5 vezes mais GbpB, tanto no extrato protéico total, como no sobrenadante de cultura. Já a cepa 20A3 *covR*- demonstrou aumento de 3.5 vezes apenas no extrato protéico total, enquanto que no sobrenadante as quantidades permaneciam similares com as da respectiva cepa WT. No genótipo 5ST1 *covR*-, um leve aumento de 1,5 vezes na quantidade de GbpB foi observado tanto no extrato protéico total como no sobrenadante (Figura 17). De forma geral, o extrato protéico celular total mostrou-se mais discriminatório nesses ensaios.

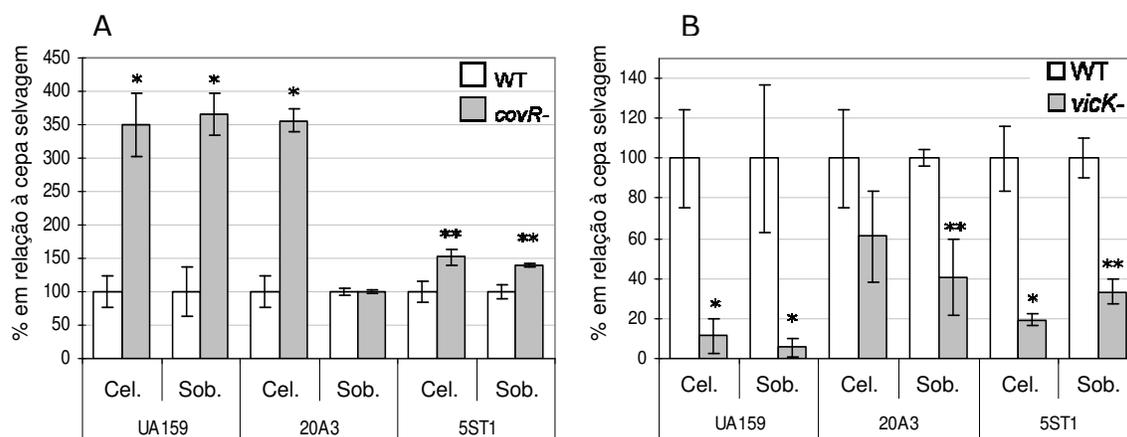


Figura 17: Produção de GbpB nas cepas selvagens e *covR*- (A) e *vicK*- (B). O valor de densitometria de GbpB obtido para a cepa WT foi definido como 100%, e os níveis das demais amostras em função desse valor. Extrato protéico celular total (Cel.) e Sobrenadante de cultura (Sob.). Utilizando o teste ANOVA nos dados absolutos, diferem da cepa selvagem em ** $p < 0.05$ ou * $p < 0.01$.

Já a ausência de Vick na cepa UA159 reduziu em 8.3 vezes a quantidade de GbpB no extrato protéico total e 17 vezes no sobrenadante de cultura. Em 20A3 *vicK*- não houve diferença de quantidades de GbpB no extrato protéico celular, entretanto, foi encontrada uma diminuição de 60% da quantidade

de GbpB no sobrenadante de cultura, em comparação com a respectiva cepa WT. No genótipo 5ST1 *vicK*⁻, houve queda de cerca de 5 e 3 vezes na quantidade de GbpB, no extrato protéico total e sobrenadante, respectivamente (Figura 17).

A complementação das cepas com os genes *covR* e *vicK in trans* restaurou o nível de GbpB alterado, tanto no sobrenadante, como no extrato protéico celular total (Figura 18). Na Figura 18, quadro C, é apresentado o SDS-PAGE das proteínas totais, mostrando a igualdade entre as cargas protéicas utilizadas nos experimentos.

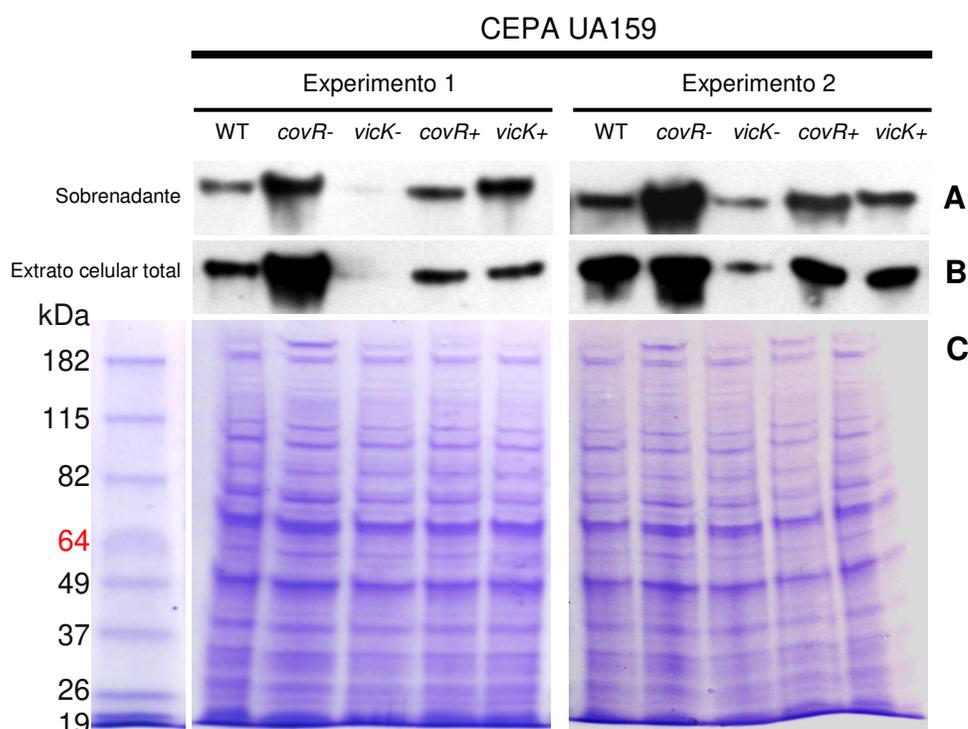


Figura 18: *Western blot* representativo dos experimentos de quantificação de GbpB na cepa UA159 e amostras derivadas. Em A, GbpB presente no sobrenadante de cultura. Em B, GbpB presente no extrato protéico celular total. Em C, SDS-PAGE das respectivas amostras (5ug do extrato protéico celular total, por canaleta) corado com Coomassie.

A GbpB também é regulada pelo sistema *VicKR*, como demonstrado em estudos anteriores na cepa UA159 e confirmado neste projeto com as cepas

5ST1 e 20A2. Nesse estudo demonstramos um novo mecanismo regulador de GbpB na espécie *S. mutans*, por CovR. Estes dados sugerem que ambos os TCS compartilham pelo menos alguns genes de virulência em *S. mutans*.

A despeito destes achados, a grande quantidade de possíveis genes regulados por esses sistemas nos motivou a uma colaboração com a Dra. Margaret J. Duncan do Departamento de Genética Molecular do *The Forsyth Institute, Boston, MA, EUA*, para caracterizar os regulons de CovR e VicKR na espécie *S. mutans*, utilizando ensaios *microarray* para rastreamento dos genes alvos.

5.4. COMPARAÇÃO DO PERFIL DE TRANSCRIÇÃO BASEADO EM *MICROARRAY*.

Para caracterizar os regulons de CovR e VicKR, as comparações de transcriptomas foram realizadas em quadruplicata com a cepa UA159 e mutantes *covR*- e *vick*-, totalizando 16 valores de leitura por gene.

5.4.1 MUTANTE *COVR*.

Utilizando os critérios de corte conservador propostos, um total de 23 genes foram super expressos na ausência de CovR, incluindo os já conhecidamente controlados por esse regulador. Os dados obtidos via *microarray* foram confirmados via qPCR em ensaios independentes. A Tabela 3 resume os dados obtidos nos experimentos, sendo os genes designados pelo número de anotação NCBI.

A expressão gênica aumentada no mutante *covR*- implica que CovR atua *in vivo* como repressor da transcrição. Diversos genes codificadores de proteínas e enzimas associadas com a estrutura e biogênese de parede celular foram super expressos no mutante *covR*-.

Tabela 3: Seleção dos genes modulados por CovR identificados pela comparação do perfil de transcrição baseado em *microarray*.

Gene (Número do GenBank)	Função provável [nome do gene]	Varição em vezes (<i>microarray</i>)	Varição em vezes por RT-PCR ±DP	Valor de p (RT-PCR quantitativo)
SMU.22	Glucan binding protein B [<i>gbpB</i>]	NS	1.54 ±0.12	<0.05
SMU.575c	Putative membrane protein	7.19	4.56 ±3.15	<0.05
SMU.1091	Possible cell wall protein [<i>wapE</i>]	2.60	1.8 ±0.11	<0.05
SMU.1395c	Hypothetical protein, between <i>lepA</i> cell division and <i>gbpC</i>	20.65	2.98 ±0.32	<0.01
SMU.1434c	Putative glycosyltransferase	4.31	2.90 ±0.39	<0.01
SMU.1437c	Putative UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase [<i>yvyH</i>]	3.49	2.54 ±0.32	<0.01
SMU.1599	Putative transcriptional regulator	125.30	3.82 ±2.51	<0.05
SMU.1918c	Putative membrane-associated protein [<i>dedA</i>]	4.91	1.87 ±0.35	<0.01
SMU.1988c	Putative DNA binding protein	2.66	1.51 ±0.43	<0.05
SMU.2147c	Cell wall protein with <i>lysM</i> domain	2.59	1.8 ±0.09	<0.01
Genes já conhecidos sob controle de CovR				
SMU.910	Glucosyltransferase D [<i>gtfD</i>]	1.77	2.01 ±0.21	<0.01
SMU.1004	Glucosyltransferase B [<i>gtfB</i>]	22.03	17.22 ± 3.00	<0.01
SMU.1005	Glucosyltransferase D [<i>gtfC</i>]	2.50	4.56 ±0.89	<0.01
SMU.1396	Glucan binding protein C [<i>gbpC</i>]	12.42	ND	ND
SMU.1924	Response regulator [<i>covR</i>]	NA	NA	ND

NA: sem amplicon detectado; ND: não determinado; NS: não estatístico; DP: desvio padrão.

GbpB possui similaridade à hidrolases de peptídeoglicano e, interessante, a proteína codificada pelo gene SMU.575c é anotada como reguladora de hidrolases de peptidoglicano. A provável proteína de parede WapE (SMU.1091) possui significativa similaridade a proteínas de superfície de outros estreptococos e lactobacilos. O gene SMU.1395c é uma pequena fase aberta de leitura de 129 pares de base, localizada após *gbpC* e antes de *lepA*, ambos genes

codificantes de proteínas que podem estar envolvidas em processos associados a parede celular; entretanto, a proteína codificada por SMU.1395c não possui identidade com outras presentes no banco de dados.

CovR também controla a expressão do provável operon SMU.1434c/SMU.1435c/SMU.1436c/SMU.1437c. Os genes SMU.1434c e SMU.1437c codificam, respectivamente, uma provável glicosiltransferase e uma UDP-N-acetilglicosamina 2-epimerase, que podem estar envolvidas na síntese de parede celular. A proteína codificada pelo gene SMU.2147c possui dois domínios, um domínio LysM, envolvido na ligação de peptídeoglicano e sua degradação, e outro domínio transglicosilase, que pode hidrolisar pontes entre unidades de açúcar.

5.4.2 MUTANTE *vick*.

Utilizando os critérios de corte conservador propostos, um total de 30 genes foram reprimidos na ausência de VicK, incluindo os já conhecidos controlados por esse TCS. Os dados obtidos via microarray foram confirmados via qPCR em ensaios independentes. A Tabela 4 resume os dados obtidos nos experimentos, sendo os genes designados pelo número de anotação NCBI.

A expressão gênica diminuída no mutante *vick*⁻ implica que sistema atua *in vivo* como ativador da transcrição. A análise do transcriptoma da cepa mutante *vick*⁻ demonstrou que muitos genes reprimidos possuem funções prováveis na biogênese de parede celular. O nível de transcritos para o gene *vick* foi zero (nível de fundo), uma vez que este gene foi removido por mutagênese; já o regulador de resposta cognato *vicR*, demonstrou estar reprimido duas vezes.

Tabela 4: Seleção dos genes modulados pelo sistema VicRK identificados pela comparação do perfil de transcrição baseado em *microarray*.

Gene (Número do GenBank)	Função provável [nome do gene]	Variação em vezes (<i>microarray</i>)	Variação em vezes por RT-PCR ±DP	Valor de p (RT-PCR quantitativo)
SMU.22	Glucan binding protein B [<i>gbpB</i>]	-3.45	-2.24 ±0.38	<0.01
SMU.367	Glucan binding protein [<i>gbp</i>]	-2.17	-1.45 ±0.10	<0.05
SMU.609	putative 40kDa cell wall protein precursor	+16.13	+13.67 ±4.77	<0.01
SMU.772	Glucan binding protein D [<i>gbpD</i>]	-2.17	-1.85 ±0.44	<0.05
SMU.910	Glucosyltransferase D [<i>gtfD</i>]	-6.25	-14.08 ±5.07	<0.01
SMU.1003	Glucose-inhibited division protein [<i>gidA</i>]	-1.33	-1.42 ±0.16	<0.05
SMU.1091	Cell wall protein [<i>wapE</i>]	-2.78	-1.69 ±0.40	<0.05
SMU.1516	Sensor kinase [<i>vick</i>]	NA	NA	ND
SMU.1517	Response regulator [<i>vicR</i>]	-1.72	-2.12 ±0.23	<0.01
SMU.2146c	Immunodominant antigen	-14.29	-15.20 ±3.04	<0.01
SMU.2147c	Cell wall protein with <i>lysM</i> domain	-3.45	-3.51 ±0.54	<0.01

NA: sem amplicon detectado; ND: não determinado; DP: desvio padrão.

A regulação da expressão de *gbpB* (SMU.22) por VicR já foi previamente determinada. A partir das nossas análises de *microarray*, dois outros genes responsáveis por codificar proteínas ligadoras de glucano também estavam com sua expressão reprimida; um codifica a proteína ligadora de glucano D (SMU.772, *gbpD*), que possui atividade de ligadora confirmada (Shah & Russell, 2004) e outro (SMU.367), codificante de uma proteína com similaridade a outras proteínas ligadoras de glucano, porém sem atividade experimentalmente confirmada. A proteína codificada por SMU.367 possui ainda dois domínios, LysM e CHAP, conforme resultados de BLAST.

Ao contrário dos demais genes, a expressão de SMU.609 foi significativamente aumentada na ausência de VicK. Embora este gene esteja anotado como codificador de uma proteína 40kDa precursora de parede celular, a fase aberta de leitura codifica uma proteína de 67kDa, na seqüência da qual são

encontrados domínios repetidos associados com a função de hidrolase de mureína. Estes domínios, se removidos, afetam a capacidade hidrolítica de mureína (Catt & Gregory, 2005).

A expressão do gene *wapE* (SMU.1091) foi reprimida no mutante *vick-*, em oposição ao encontrado no mutante *covR-*. O gene SMU.1003 foi anotado como codificador de proteína de divisão inibida pela glicose (GidA). Em *E coli*, mutantes do gene *gidA* possuem divisão celular afetada quando crescidos em glicose (von Meyenberg *et al.*, 1982). Em *S. mutans*, o gene possui similaridade a tRNA metilases, e não é demonstrado experimentalmente sua participação na biogênese de parede celular.

O gene SMU.2146c é responsável por codificar um provável antígeno imunodominante que possivelmente contém domínio com ancoragem na parede celular. No genoma, apresenta-se contíguo com o gene SMU.2147c, que teve sua expressão afetada tanto pela mutação de *covR-*, como pela de *vick-*. Entretanto, não parecem formar operon entre si, por terem cada um seu suposto promotor na região 5', mas outros estudos são necessários para responder essa questão.

5.5. CovR e VicR regulam diretamente genes provavelmente envolvidos na biogênese de parede celular.

Os reguladores r-CovR ou r-VicR foram submetidos a ensaios de EMSA com as seqüências reguladoras dos genes identificados por *microarray*, para confirmar ou não a interação direta. Seqüências em torno de 300pb foram geradas por PCR, marcadas e incubadas com as proteínas regulatórias recombinantes, previamente tratadas em condição fosforilantes ou não. Entretanto, as condições de fosforilação não foram necessárias para as reações de ligação *in vitro*, tanto para r-CovR, como para r-VicR, como previamente descrito (Senadheera *et al.*, 2005; Biswas & Biswas, 2006).

Para o ensaio de EMSA com r-CovR, utilizamos a região do promotor de *covR* como controle positivo, devido a sua auto regulação estabelecida (Chong *et al.*, 2008b) e a seleção de genes da Tabela 3.

Além dos alvos de CovR previamente identificados *gtfB*, *gtfC*, *covR*, CovR também foi capaz de ligar-se a quatro novas regiões promotoras SMU.22 (*gbpB*), SMU.1091 (*wapE*), SMU.1437 (*yvyH*) e SMU.2147 (*lysM*) (Figura 19). Isso demonstra um novo aspecto no regulon de CovR, que é a regulação de genes com possíveis funções na biogênese de parede celular. Entretanto, CovR não foi capaz de se ligar aos promotores de *gtfD* (SMU.910), SMU.1434c, SMU.575c e SMU.1395c, que também podem ter possível função na biogênese de parede celular e/ou virulência.

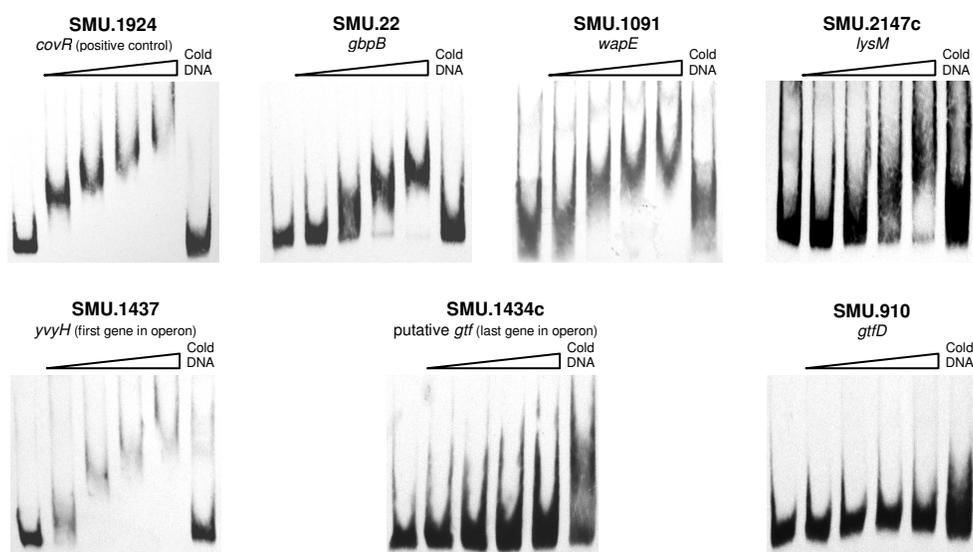


Figura 19: Experimentos de EMSA com as seqüências reguladoras dos genes indicados em presença de concentrações crescentes de r-CovR (0, 0.25, 0.5, 0.75, e 1 μmoles). Na última canaleta, repetição da concentração mais alta de r-CovR (1 μmoles) na presença de DNA "frio" (não marcado) em excesso de 120 vezes. A ligação de r-CovR no DNA não marcado em excesso e, conseqüentemente, liberação do DNA marcado, atesta a especificidade da reação.

Para o ensaio de EMSA com r-VicR, utilizamos a região do promotor de *gtfC* como controle positivo, devido a sua regulação já estabelecida (Senadheera *et al.*, 2005) e uma seleção dos genes da Tabela 4.

Além dos alvos de VicR previamente identificados em *gtfB*, *gtfC*, *gtfD* e *gbpB*, o regulador VicR também foi capaz de ligar-se a cinco novas regiões promotoras, dos genes codificantes das possíveis proteínas: ligadora de glucano SMU.367 (*gbp*), precursora de parede celular SMU.609, de divisão inibida pela

glicose SMU.1003 (*gidA*), de parede celular WapE SMU.1091 (*wapE*) e de parede celular LysM SMU.2147c (*lysM*) (Figura 20). Todas estas regiões pertencem a genes supostamente envolvidos na biogênese de parede celular. Como controle negativo das reações, foi utilizada a seqüência promotora do gene *covR*.

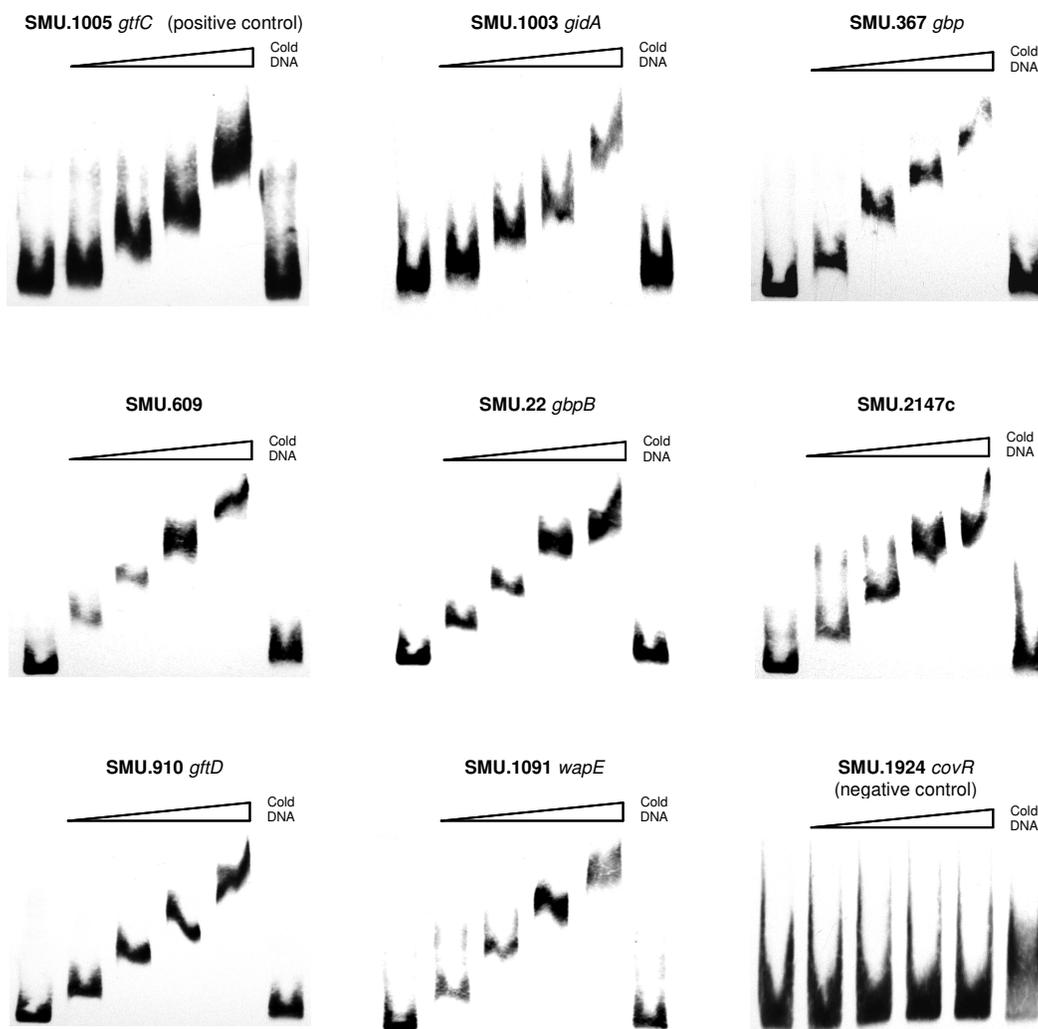


Figura 20: Experimentos de EMSA com as seqüências reguladoras dos genes indicados em presença de concentrações crescentes de r-VicR (0, 1, 2, 3, e 4 μ moles). Na última canaleta, repetição da concentração mais alta de r-VicR (4 μ moles) na presença de DNA "frio" (não marcado) em excesso de 200 vezes. A ligação de r-VicR no DNA não marcado em excesso e, conseqüentemente, liberação do DNA marcado, atesta a especificidade da reação.

5.6. CO-LIGAÇÃO DE COVR E VICR A PROMOTORES ESPECÍFICOS.

Como os reguladores de resposta VicR e CovR compartilharam alguns genes em seu regulon e, utilizando-se de *gtfC* como controle positivo, submetemos os genes *lysM* e *gbpB* em ensaios de EMSA para demonstrar se a ligação na região operadora é provavelmente competitiva pelo mesmo sítio ou independente, em sítios diferentes (Figura 21).

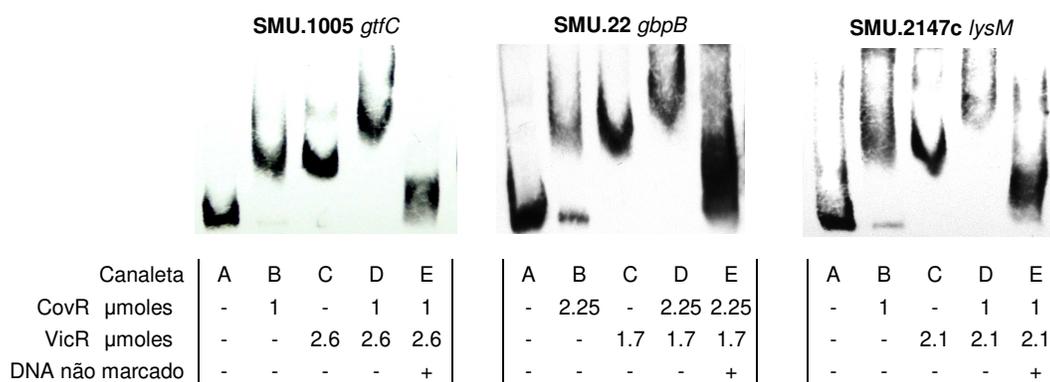


Figura 21: Experimentos de EMSA com as seqüências reguladoras dos genes indicados na presença de r-CovR e r-VicR. Em A, apenas DNA marcado e componentes do tampão de ligação. As quantidades de r-CovR ou r-VicR foram definidas empiricamente para o complexo proteína-DNA marcado migrar equivalentemente na mesma corrida (canaleta B e C). Em D, incubação de ambos reguladores e a formação do super-deslocamento (*super-shift*) demonstrando a co-ligação nos fragmentos. Em E, adição de DNA não marcado em excesso de 200 vezes e conseqüente a não ligação das proteínas no DNA marcado.

Conforme esperado, VicR ou CovR foram capazes de se ligar às regiões promotoras destes genes, resultando em retardamento da mobilidade eletroforética (Figura 21, B/C). Quando ambos os reguladores de resposta foram inseridos na mesma reação, observou-se um super deslocamento no fragmento de DNA. Isto demonstra a capacidade de ambos se ligarem mutuamente nas regiões controladoras dos genes testados, sugerindo, pela primeira vez, que estes sistemas podem *in vivo* compartilhar na função de regular a expressão gênica.

5.7. A REMOÇÃO DOS GENES *COVR* E *VICK* INFLUENCIAM CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS.

Realizamos análises fenotípicas simples que, de uma maneira ou outra, envolvem análises de características de parede celular e que, por esse motivo, poderiam estar alteradas nas cepas mutantes em relação às selvagens, dando algum suporte aos achados moleculares e encaminhar estudos futuros.

5.7.1 HIDROFOBICIDADE CELULAR.

A Figura 22 ilustra o ensaio de hidrofobicidade celular, como proposto por Gibbons e Etherden (1983). Suspensões celulares de mesmo valor de absorbância foram reagidas com hexadecano, agitadas e deixadas em repouso para separação das duas fases. A fase superior corresponde ao hexadecano (fase "hidrofóbica") e a fase inferior, ao tampão PU (fase "hidrofílica") (Figura 22). Observamos dados inéditos de que a fase "hidrofóbica" reteve alta quantidade de células, em todos os mutantes *vick*⁻, quando comparados com células das cepas selvagens, que ficaram retidas em altas quantidades na fase "hidrofílica".

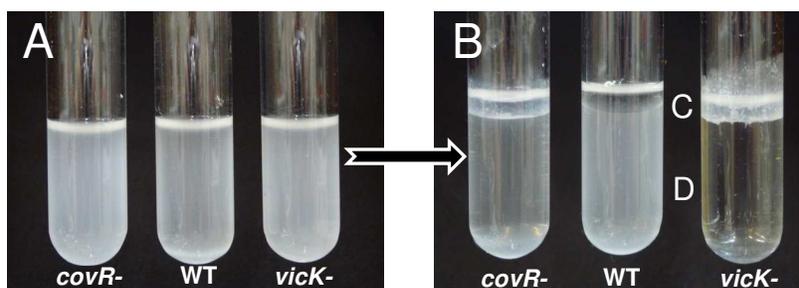


Figura 22: Imagem representativa dos ensaios de hidrofobicidade dos mutantes *covR*⁻ e *vick*⁻ e respectiva cepa selvagem UA159. Em A), Células em tampão PU $A_{550nm}=0,900$. Em B), Após realização do ensaio. Em C), Fase de hexadecano contendo células (fase "hidrofóbica"). Em D), Parte mensurável do ensaio, com células remanescentes em tampão PU (fase "hidrofílica").

A Figura 23 ilustra a porcentagem de células dos mutantes *covR*- e *vicK*- e respectivas cepas selvagens (WT) retidas na fase hidrofílica após tratamento com hexadecano. Os mutantes *vicK*- tiveram aumento de 10 vezes na hidrofobicidade quando comparados a cepa WT, tornando-se altamente hidrofóbicos, provavelmente em decorrência das alterações na superfície da parede celular, foco de estudos futuros.

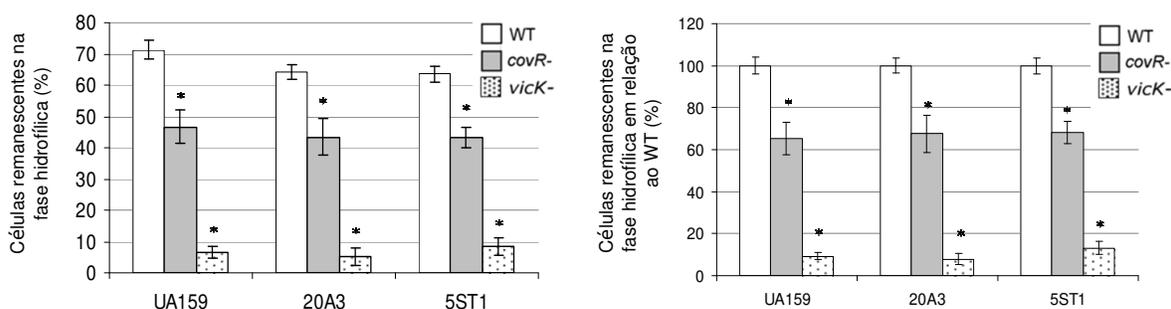


Figura 23: Resultados após ensaio de hidrofobicidade. Em A), Porcentagem de células dos mutantes *covR*- e *vicK*- e respectivas cepas selvagens (WT) retidas na fase hidrofílica após tratamento com hexadecano. Em B), mesmos resultados normalizados em função dos valores obtidos para cada um das cepas selvagens, definido como 100% e, os valores das demais amostras, em função desse valor. Utilizando o teste ANOVA nos dados absolutos, diferem do selvagem em * $p < 0.01$.

A inativação de *covR* também promoveu aumento da hidrofobicidade, mas de forma menos acentuada em comparação com a inativação de *vicK*. Tal aumento na hidrofobicidade foi de cerca de 35% quando comparados às cepas selvagens. Por este ensaio, os *backgrounds* genéticos não influenciaram a hidrofobicidade celular, sendo todas as cepas selvagens semelhantes entre si, todas as mutantes de *covR* semelhantes entre si e todas as mutantes de *vicK* semelhantes entre si.

5.7.2 SUSCEPTIBILIDADE À AUTÓLISE.

A Figura 24 ilustra o ensaio de autólise em seu último período de leitura (72h). Visualmente observam-se características de maior lise celular nas cepas selvagens. A inativação de *vicK* promoveu resistência ao processo de autólise.

Reduções significativas do processo de autólise, mas de menor magnitude em comparação aos mutantes *vicK*-, foram observadas com a inativação de *covR*.

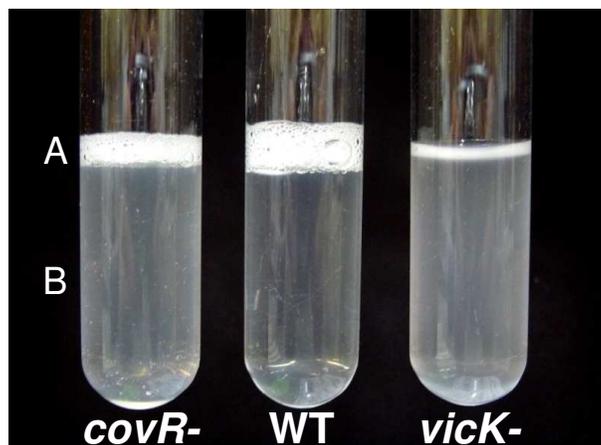


Figura 24: Imagem representativa dos ensaios de autólise dos mutantes *covR*- e *vicR*- e respectiva cepa selvagem UA159 após 72 horas de incubação. Em A), formação de bolhas de ar em superfície após agitação de 60 segundos em vórtex, de presença e de quantidade ligada ao aumento (visual) da viscosidade da solução. Em B), células remanescentes em tampão AT, parte mensurável do ensaio.

A Figura 25 ilustra a dinâmica de autólise das cepas selvagens (WT) UA159, 20A3 e 5ST1 e respectivos mutantes *covR*- e *vicK*- durante os períodos analisados. Obtivemos dados inéditos de que os mutantes *covR*- foram até 30% mais resistente a autólise que as cepas WT, descrevendo pela primeira vez a participação ou influência, ainda que por mecanismo desconhecido, de CovR no controle do processo de autólise celular. Já os mutantes *vicK*- possuem aproximadamente o dobro de resistência quando submetidos à autólise, corroborando os dados da participação desses sistemas no metabolismo de parede celular.

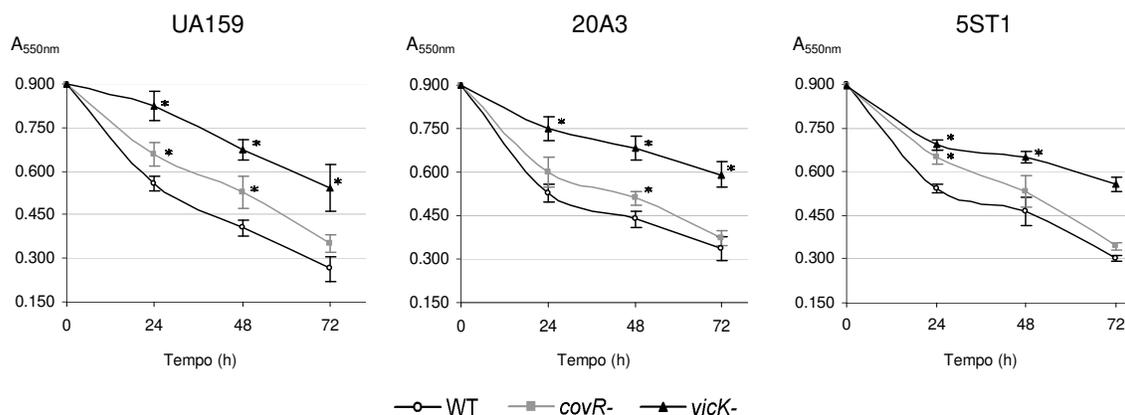


Figura 25: Padrões de autólise dos mutantes *covR*⁻, *vicR*⁻ e respectivas cepas selagens (WT, indicadas acima). As reduções na absorbância das suspensões bacterianas (A_{550nm} inicial=0,900) foram determinadas após 24, 48 e 72 horas de incubação a 44°C. Utilizando o teste ANOVA nos dados absolutos, diferem do selvagem no mesmo tempo de análise em * $p < 0.01$.

5.8. A AUSÊNCIA DE COVR OU VICRK PARECE INFLUENCIAR A MORFOLOGIA MICROSCÓPICA DE *S. MUTANS*.

A espécie *S. mutans* tem como característica morfológica celular típica a forma ovocócóide (termo revisado em Zapun *et al.* 2008), que seria, a grosso modo, um formato intermediário entre a forma de cocos e bacilos. Na Figura 26, em A e B, são mostradas células de *S. mutans* selvagem com sua morfologia típica. Em C e D, cepa *knockout* do gene *covR*, onde observam-se algumas células de tamanho e forma similar ao selvagem; entretanto, também são encontradas células alongadas, com morfologia alterada (setas). Em E e F, cepa *knockout* do gene *vicK*, mostrando clara alteração na morfologia celular em 100% das células, caracteristicamente mais esféricas e com cadeias muito extensas. Os resultados sugerem participação desses sistemas no metabolismo de parede celular.

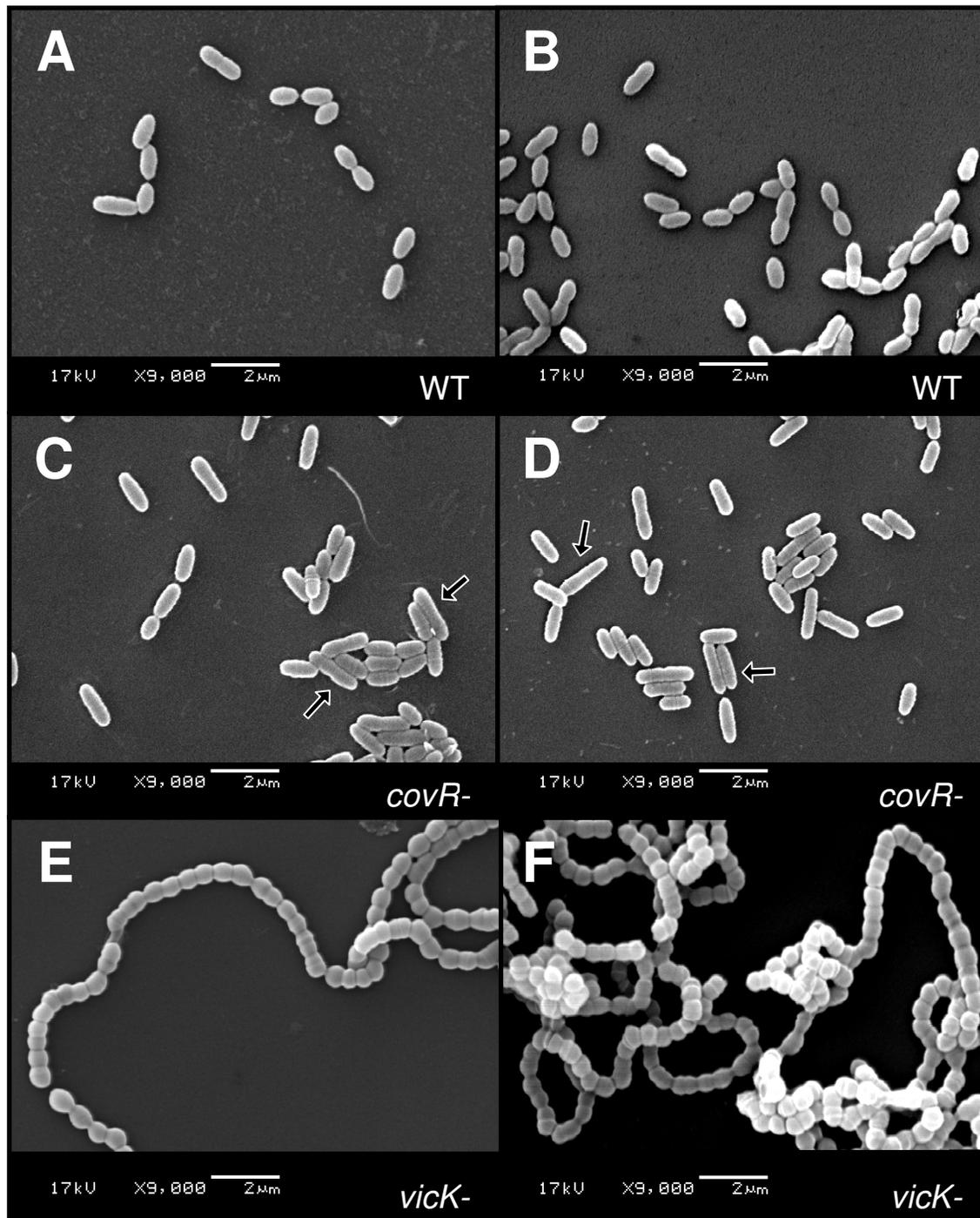


Figura 26: Dois experimentos de MEV das amostras cultivadas em BHI líquido em aumento de 9000x. As células bacterianas foram coletadas no início da fase estacionária de crescimento, lavadas em PBS, depositadas sobre lamínulas de vidro e, então, processadas para MEV. Em A e B, amostras da cepa UA159 selvagem. Em C e D, amostras da cepa UA159 *knockout* de *covR*. Em E e F, amostras da cepa UA159 *knockout* de *vick*.

5.9. A ESTRUTURA DO BIOFILME INICIAL FORMADO POR *S. MUTANS* SOFREM INFLUÊNCIA DOS SISTEMAS COVR E VICRK.

Para as análises da formação de biofilme inicial por *S. mutans*, os biofilmes foram analisados após 2 ou 4 horas de crescimento. Em A e B, biofilme formado pela cepa UA159 selvagem demonstrando um padrão homogêneo na superfície, com formação de microcolônias mais presente em 4 horas de cultivo (B, setas) com alguma matriz extracelular observável. Em C e D, cepa *knockout* do gene *covR*, onde observa-se alteração no padrão do biofilme formado, com formação de microcolônias maiores (em 2 e 4h). Em 4 horas, observa-se um aumento da complexidade das microcolonias formadas, com a presença de estruturas que se assemelham com "canais maiores" (setas) e/ou menores. Observa-se também extensa formação de matriz extracelular, o que dificulta, mesmo em maiores aumentos, a identificação da morfologia celular pela técnica. Em E e F, cepa *knockout* do gene *vicK*, mostrando pouca formação de biofilme e microcolônias esparsas, com quase nenhuma matriz extracelular.

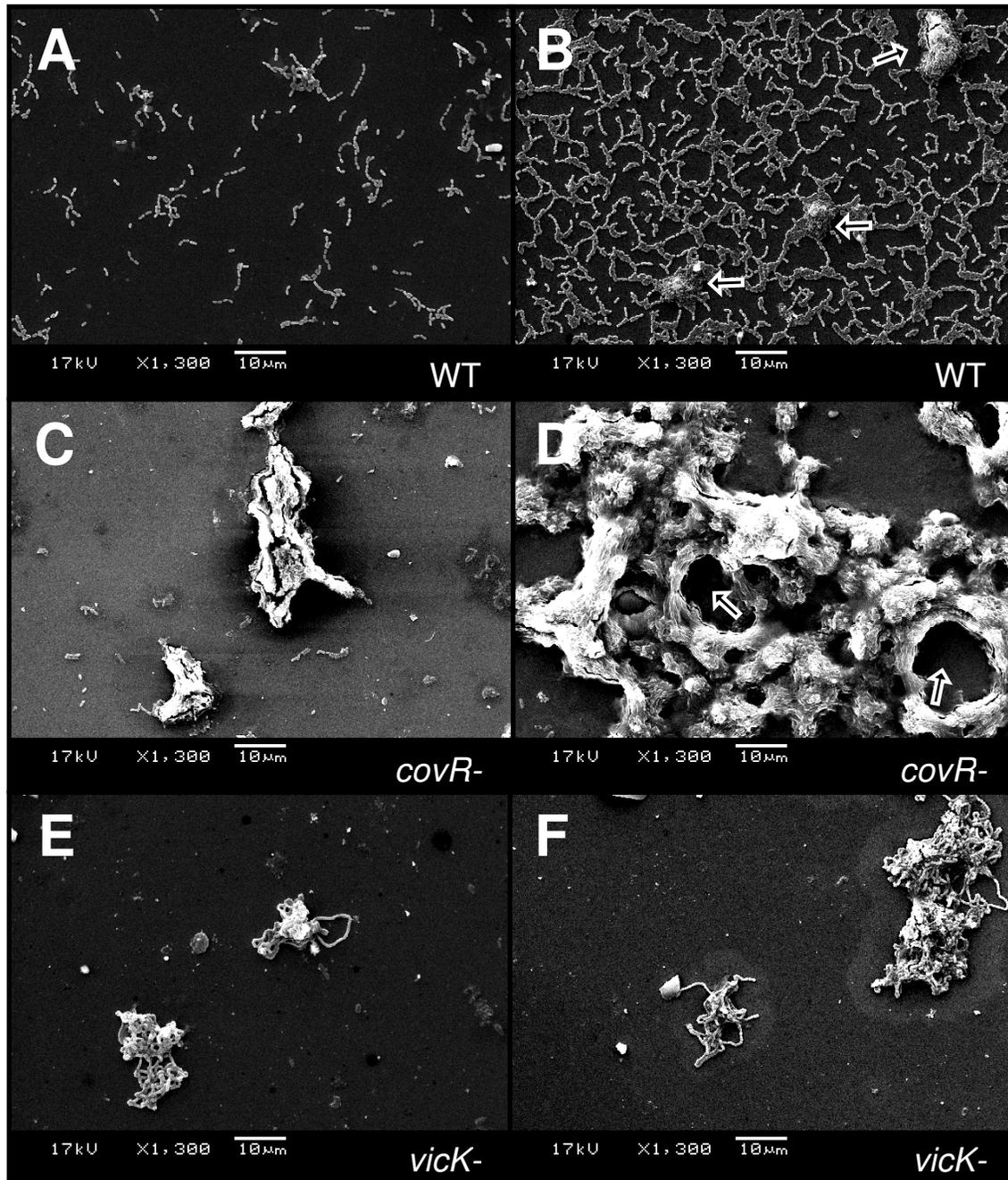


Figura 27: MEV dos biofilmes iniciais de 2 (A,C e E) e 4 horas (B, D F) em aumento fixo de 1300x. Em A e B, biofilme formado pela cepa UA159 selvagem mostrando o padrão homogêneo na superfície, com formação de microcolônias mais presente em 4 horas de cultivo (B, setas) com alguma matriz extracelular observável. Em C e D, cepa *knockout* do gene *covR*, observa-se alteração no padrão do biofilme formado, com formação de microcolônias maiores (em 2 e 4h). Em 4 horas, observa-se mais claramente a formação de estruturas de biofilme contendo algo que se assemelha com "canais maiores" (setas) e menores. Observa-se também extensa formação de matriz extracelular, o que dificulta, mesmo em maiores aumentos, a identificação da morfologia celular. Em E e F, cepa *knockout* do gene *vick*, mostrando pouca formação de biofilme e microcolônias com quase nenhuma matriz extracelular.

6. DISCUSSÃO

As análises dos mecanismos de atuação global na regulação da expressão de genes de virulência de *S. mutans* são crescentes, e muitos esforços vem sendo realizados para o melhor entendimento destes sistemas. Neste estudo inativamos os genes *covR* e *vick* (chamados pela anotação do GenBank, de SMU.1924 e SMU.1516, respectivamente) nas cepas de *S. mutans* UA159, 20A3 e 5ST1. Diversas abordagens foram realizadas com intuito de obter publicações importantes para a compreensão dos mecanismos reguladores de fatores de virulência, formação de biofilme e biogênese de parede celular na espécie *S. mutans*.

Através deste projeto aumentamos bastante o alcance de nossas pesquisas nesta área, além da grande experiência adquirida pelo nosso grupo em estudos genético-moleculares de regulação gênica bacteriana. Novas técnicas, não desenvolvidas anteriormente em nosso laboratório, agora são realizadas com relativa facilidade e serão importantes para os próximos projetos. Diversos resultados obtidos neste projeto também foram divulgados pelo autor em três congressos internacionais, através de duas apresentações orais (IADR) e uma em pôster (ASM) e em dois congressos nacionais (SBPqO e SBM).

A discussão do trabalho foi agrupada em temas, os quais não necessariamente correspondem em número, ordem e/ou título com as seções dos capítulos 4 e 5.

6.1. OS SISTEMAS COVR E VICRK CONTROLAM A EXPRESSÃO DE GENES IMPORTANTES PARA A COLONIZAÇÃO DE *S. MUTANS*

O interesse nos processos que controlam o desenvolvimento de biofilmes é constante na área de microbiologia. Inúmeras patologias são biofilme-dependentes, resultado da habilidade de organismos específicos em se acumular sobre superfícies relativamente rígidas e desenvolver características competitivas.

Neste estudo, confirmamos a importância do TCS VicRK para a formação de biofilme em genótipos de *S. mutans*, indicando que este mecanismo pode ser compartilhado intra-espécie. Também estabelecemos o regulador *covR* como fundamental no controle da formação de biofilme em três genótipos distintos de *S. mutans*.

Ambos TCS controlam diretamente genes que codificam proteínas importantes para a colonização de *S. mutans*. As análises e busca de diferenças entre mutantes e cepas selvagens foram realizadas após definida a curva de crescimento bacteriano em sistema fechado, onde os microrganismos atingem uma fase de multiplicação por fissão binária (crescimento exponencial), na qual as divisões ocorrem em intervalos regulares de tempo (tempo de geração). As análises nestas culturas são úteis para estudos comparativos entre mutantes de genes específicos e a cepa selvagem ou entre cepas distintas, uma vez que populações bacterianas com características fisiológicas relativamente homogêneas são obtidas (Madigan *et al.*, 2004).

A ligação entre a ausência de regulador *covR* e a maior expressão gênica de glicosiltransferases já era conhecida (Idone *et al.*, 2003; Biswas & Biswas, 2006). Entretanto, em ambos os estudos anteriores não foram encontradas diferenças na formação de biofilme quando comparado o mutante de *covR*- e cepa WT, o que parece contraditório de acordo com as funções das proteínas Gtfs e sua expressão aumentada (Banas & Vickerman, 2003).

No primeiro estudo, *covR* foi detectado apenas como controlador de *gtfD* e *gbpC* e a metodologia de quantificação da formação de biofilme utilizada foi em tubos de boro-silicato (Idone *et al.*, 2003). Embora os resultados aparentemente apontem uma tendência de maior formação de biofilme por *covR*-, não houve diferença estatística, o que pode ter ocorrido devido a grande variação intra experimento obtida naquele estudo, observável pelo tamanho do desvio padrão indicado no gráfico (Idone *et al.*, 2003). De qualquer forma, os autores discutiram que a alteração na proporção de Gtfs e, especificamente, a maior produção de GtfD, poderia levar a uma aderência dependente de glucanos

solúveis e, assim, um biofilme não aderido. A proporção ótima para a aderência de *S. mutans* parece ser de 20:1:4 de *gtfB/gtfC/gtfD* (Ooshima *et al.*, 2001). Embora os métodos de obtenção destes dados e da real necessidade de exatidão dessa proporção para a aderência sejam questionáveis, CovR também controla *gtfB/C* (Biswas & Biswas, 2006), além de outros fatores também envolvidos, como *gbpB/C*. Considerando que mutantes *covR*- terão não apenas mais expressão de *gtfD*, e sim de *gtfB/C/D* e *gbpB/C*, questionamos que a justificativa não suporta o experimento com sua variação, e que melhorias na metodologia poderiam revelar a maior produção de biofilmes por mutantes *covR*-.

Em outro estudo por Biswas e Biswas (2006), a quantificação do biofilme ocorreu através de ensaios similares ao utilizado nesta pesquisa (item 5.2). Entretanto, as condições de 1% de sacarose e tempos de 20 a 48 horas utilizadas naquele estudo levaram a condições saturadas de crescimento. Por esse motivo, não houve sensibilidade suficiente para diferir as amostras na quantificação da formação de biofilme entre WT e cepa *covR*-. Ensaios com nossas amostras em condições similares às descritas por Biswas e Biswas (2006), indicaram saturação no ensaio e conseqüente perda de sensibilidade (dados não mostrados).

A super expressão de *gtfB*, *gtfC*, *gtfD*, *gbpB* (Figura 15) em todos os mutantes *covR*- provavelmente foi a responsável pela alta formação de biofilme (Figura 12 e 13) nas amostras *covR*-. Em suporte aos ensaios quantitativos de formação de biofilme, foram realizadas imagens em MEV dos biofilmes em sua fase inicial formados por esses mutantes (Figura 27). Estudos anteriores realizaram MEV de biofilmes formados por mutante *covR*- (Idone *et al.*, 2003, Biswas & Biswas 2006), entretanto em condições de formação tardia. Diferenças mais claras puderam ser observadas entre mutante *covR*- e cepa selvagem analisando-se estes estágios iniciais (Figura 27).

Estes dados abrem espaço para discussão se CovR pode ser importante apenas no início da formação do biofilme, controlando uma formação de biofilme mais "lenta" e, talvez, ordenada (Figura 27 A,B), em cepas selvagens,

ou se sua participação é simplesmente reprimida em biofilmes "maduros", motivo pelo qual cepas selvagens igualariam as quantidades de biofilmes produzidos após longo períodos de incubação. Para responder essas questões são necessários estudos que envolvam dinâmica de formação de biofilme em reatores/quimiostatos ou outras metodologias.

Dentro do objetivo do estudo e dos ensaios realizados, não observamos grandes diferenças entre expressão gênica de *gtfs* e *gbpB* que expliquem a formação exacerbada de biofilme pelo mutante 5ST1 *covR*- (Figura 13). Outros estudos que avaliem a expressão gênica, quantidade de proteínas Gtfs/Gbps presentes e atividade destas podem elucidar a questão. Temos indícios que 5ST1 possui provável(is) polimorfismo(s) na GtfB produzida (Stipp *et al.*, 2008), porém, o mecanismo exato e, se esse polimorfismo na ausência de CovR é responsável por esse fenótipo exacerbado, ainda é desconhecido. Em adição, em todas as cepas de *S. mutans* analisadas até o momento, a proteína *covS*, sensora cognata de *covR*, não foi identificada (Chong *et al.*, 2008b). Há a possibilidade de que outras histidinas quinases possam ativar, direta ou indiretamente, o regulador CovR. Ainda assim, diferentes genótipos de *S. mutans* diferem a respeito do seu número de TCS presentes no genoma (Biswas *et al.*, 2008). Como e quando essa diversidade genética influencia a resposta bacteriana aos estímulos ambientais ainda necessita investigação.

As áreas contendo os possíveis promotores e operadores dos genes *gtfB*, *gtfC*, *gtfD*, *gbpB* foram submetidas à ensaios de EMSA com a proteína r-CovR. CovR demonstrou ser capaz de ligar-se diretamente à *gtfB*, *gtfC* (Biswas & Biswas, 2006) e *gbpB*, mas não à *gtfD*, revelando um mecanismo indireto de influência em *gtfD*, não explicável pelas análises feitas neste estudo. Entretanto, esse fenômeno foi conservado entre diferentes genótipos.

A ligação de CovR à área promotora ou operadora de *gbpB* demonstrou o controle direto da expressão deste gene por CovR (Figura 19). Os dados de expressão gênica foram assegurados pela quantificação de GbpB presente nas células e no meio de cultura bacteriano. Foi detectada uma diferença

maior entre cepa selvagem e cepa mutante no nível de proteínas (Figura 17), do que quando avaliado o nível de transcritos (Figuras 15 e 16), embora em ambos os ensaios haja concordância sobre o qualitativo da remoção de *covR*. É importante ressaltar que a comparação direta entre quantidade de proteína pode não ser linear com a expressão gênica, pois o nível de proteína sofre influência de vários fatores. Como exemplo desses fatores, há ação de proteases que influenciam a estabilidade das proteínas secretadas e mecanismos de regulação pós-transcricional que podem atuar na estabilidade dos transcritos e/ou na velocidade ou eficiência da tradução dos mesmos. Há também o envolvimento de metodologias diferentes na amplificação do sinal para serem realizadas as quantificações (*western blot* versus qPCR), que também em condições particulares poderiam ocasionar a não linearidade.

O controle da expressão gênica de glicosiltransferases e *gbpB* e formação de biofilme pelo sistema VicRK já era conhecida, através principalmente de análises com o mutante Smuvic+, uma variante genética construída que possui constante elevada expressão do sistema VicRK (Senadheera *et al.*, 2005). Neste trabalho, confirmarmos os dados em mais dois genótipos de *S. mutans* com o mutante *vick*-. A menor formação de biofilme foi semelhante em todos os *backgrounds* genéticos (Figura 12 e 13), e corrobora os achados moleculares que indicam menor expressão de *gtfB/C/D* e *gbpB* nesses mutantes, com atuação direta de VicR nas prováveis regiões promotoras/operadoras destes genes, como revelado por ensaios de EMSA.

As análises de MEV dos biofilmes iniciais do mutante *vick*- demonstraram pouca formação de microcolônias por este mutante (Figura 27), implicando que a presença do TCS VicRK funcional é necessária para, pelo menos, a correta aderência e início da formação de biofilme por *S. mutans* em superfícies rígidas. Ainda nessas amostras, é notável a ausência de material extracelular em torno das células que compõe as microcolônias (Figura 27), provavelmente devido a menor expressão de *gtfB/C/D* e *gbpB* (Figura 16).

6.2. OS SISTEMAS COVR E VICRK CONTROLAM A EXPRESSÃO DE GENES POSSIVELMENTE ENVOLVIDOS COM A BIOSÍNTESE DE PAREDE CELULAR.

Em biologia, o termo regulon define a coleção de genes ou operons que possuem expressão sob controle da mesma proteína regulatória. Esse termo geralmente é utilizado para sistemas procarióticos, onde a ativação para o desencadeamento do controle geralmente são fatores ou estímulos externos (Stock *et al.*, 2000). Neste trabalho, chamaremos de **regulon direto** a coleção de genes ou operons que possuam interação com proteína regulatória em sua área promotora e/ou operadora, e de **regulon indireto**, aqueles genes os quais mostram-se alterados na ausência do TCS ou da proteína regulatória, porém, a proteína regulatória não tem capacidade de interação com as áreas promotora e/ou operadora detectável.

CovR, também conhecido como CsrR, é um dos reguladores mais bem estudados em GAS e GBS. Foi primeiramente identificado como regulador negativo da síntese de cápsula extracelular em GAS (Levin & Wessels, 1998) e, após, estabelecido como regulador de diversos outros genes de virulência (Federle *et al.*, 1999). Estima-se que o regulon de CovR abranja cerca de 15% dos genes de GAS (Graham *et al.*, 2002). Em GBS, CovR pode atuar tanto como regulador positivo, como negativo, de genes associados à virulência (revisado em Churchward, 2007).

Em *S. mutans*, este é o primeiro trabalho a avaliar o regulon estendido de CovR. A expressão gênica aumentada no mutante *covR*⁻ implica que CovR atua *in vivo* como repressor da transcrição. Diversos genes codificadores de proteínas e enzimas associadas com a estrutura e biogênese de parede celular foram super expressos no mutante *covR*⁻ (Item 5.4.1). Em adição àqueles já discutidos (Item 6.1), os alvos de CovR incluem o gene *wapE*, que codifica uma proteína hipotética que contém em sua parte c-terminal o domínio LPXTG, de função de ancoragem protéica em paredes celulares Gram-positivas, enquanto não possui outro domínio conservado identificável. O gene *wapE* está a montante e na mesma orientação do gene SMU.1093, codificante de um provável sistema

ABC-transportador/permease da família FtsX, e do gene SMU.1094, codificante de um provável sistema ABC-transportador da família FtsE. As proteínas FtsX/E ligadoras de ATP estão envolvidas diretamente na divisão celular (Corbin *et al.*, 2007). O genoma de *S. mutans* contem um segundo par de genes, SMU.1324c e 1325c, anotados como *ftsXE*, embora atualmente, a similaridade com outras espécies seja bem menor do que os valores conseguidos para SMU.1093 e SMU.1094.

Outros genes sob controle de CovR fazem parte de um operon de quatro cístrons. SMU.1437 (*yvyH*) é o primeiro gene desse provável operon que inclui mais dois genes que codificam duas proteínas hipotéticas e uma possível glicosiltransferase (SMU.1434c). A proteína codificada pelo gene SMU.1434c pode estar envolvida na transferência de unidades de açúcar de UDP-glicose, UDP-N-acetil-galactosamina para formação de ácidos teicóicos. O gene SMU.1437, codifica uma proteína anotada como UDP-N-acetilglicosamina 2-epimerase, que catalisa a inter-conversão de UDP-N-acetilglicosamina e UDP-N-acetilmanosamina (UDP-ManNAc) (Yokoyama *et al.*, 1989). UDP-ManNAc é requerida para a fixação de ácidos teicóicos na parede celular (Campbell *et al.*, 2000).

Outro gene também regulado por CovR é SMU.2147c, que possui dois domínios, um LysM, envolvido na ligação de peptídeoglicano e sua degradação, e outro domínio transglicosilase, que pode hidrolisar pontes entre unidades de açúcar. Tais domínios são comuns em autolisinas (Layec *et al.*, 2008).

Genes que foram super expressos na ausência de *covR* incluem SMU.575c, SMU.1395c, SMU.1918c, SMU.1599 e SMU.1988c, entretanto, estes não são diretamente regulados por CovR, conforme resultados de EMSA, sendo aqui considerados como parte do *regulon indireto* de CovR. Exceto por SMU.1599 e SMU.1988c, anotados como codificante de um fator de transcrição e proteína ligadora de DNA respectivamente, os demais codificam proteínas com possíveis funções na biogênese de parede celular, de acordo com buscas de similaridade via BLAST.

O gene SMU.575c codifica uma proteína hipotética de membrana da superfamília LrgA. Em *S. aureus*, *IrgA* forma um operon com *IrgB*, e suas atividades inibem hidrolases de mureína e aumentam a tolerância à antibióticos. Ambos são regulados pelo TCS LytSR (Groicher *et al.*, 2000). Interessantemente, no genoma de *S. mutans*, *IrgA* está adjacente de *IrgB* (SMU.575c e SMU.574c, respectivamente) e *lytRS* (SMU.576c e SMU.577c). O gene SMU.1395c é uma pequena fase aberta de leitura de 129 pares de base, localizada após *gpbC* e antes de *lepA*, ambos genes codificantes de prováveis proteínas que podem estar envolvidas em processos associados a parede celular; entretanto, a proteína codificada por SMU.1395c não possui identidade com outras presentes no banco de dados (acesso até 15-JAN-2010). O gene SMU.1918c codifica uma provável proteína de membrana da família DedA, identificada na maioria dos genomas bacterianos, entretanto, de função ainda não estabelecida. Recentemente, mutantes de dois genes da família DedA em *E. coli* mostraram níveis de fosfolipídios alterados e inabilidade de completar a divisão celular (Thompkins *et al.*, 2008).

Para os genes do regulon indireto, nos quais CovR não interage com suas regiões promotora e/ou operadora, o aumento de expressão pode ser explicado pela interação direta ou indireta com outros reguladores e/ou produtos gênicos, não identificados, que interfiram ou influenciem a expressão gênica.

Para definir o regulon de VicRK, construímos um mutante *knockout* de *vick*, que é viável (Senadheera *et al.*, 2005). Embora essa deleção leve a uma redução na expressão de VicR (Figura 9), a viabilidade do mutante implica que há alguma funcionalidade de VicR, possivelmente pela fosforilação por outras histidinas quinase ou pequenos grupos doadores de fosfato, como sugerido por Winkler e Hoch (2008). Há também a proposição de que o TCS LiaFSR e VicRK podem se comunicar (Suntharalingam *et al.*, 2009; Tremblay *et al.*, 2009), e podem contribuir para alguma regulação indireta. Entretanto, essas fontes de fosforilação não garantem total atividade de VicR e asseguram a confiabilidade de análise por esse mutante, conforme demonstrado pela baixa expressão dos genes

controle (*gtfB/C/D* e *gbpB*) em comparação de *microarray* e qPCR (Figura 16, Tabela 4) e 90% da redução dos níveis de GbpB comparada com a cepa selvagem (Figura 17 e 18).

A comparação do perfil de transcrição do mutante *vick*- e cepa selvagem, além das análises de EMSA, revelaram novos genes no regulon de VicR que estão possivelmente associados com o metabolismo de parede celular. O regulon direto de VicR inclui os genes SMU.1091 (*wapE*) e SMU.2147c (*lysM*) (Figura 20), previamente discutidos, e SMU.367, SMU.1003 e SMU.609, abaixo descritos, além daqueles previamente descritos (Item 6.1).

O gene SMU.367 codifica uma proteína hipotética com similaridade a outras proteínas ligadoras de glucano (*gbp*), porém sem atividade experimentalmente confirmada. Em sua seqüência há dois domínios conservados, um de repetição que confere ligação a peptídeoglicano, similar a LysM, e um domínio de peptidase catabólico. Em *S.gordonii* e *S.sanguinis*, os ortólogos de SMU.367 são SGO_0212 e SSA_0304, respectivamente. Ambos estão anotados como hidrolases de peptídeoglicano e parecem estar envolvidos em processos catabólicos de macromoléculas da parede celular ([KEGG](#)).

O gene SMU.1003 codifica uma provável proteína funcionalmente classificada como tRNA-(uracil-5-)-metiltransferase-A ([KEGG](#) Orthology: K04094), que por definição catalisa a reação S-adenosil-L-metionina + tRNA \Rightarrow S-adenosil-L-homocisteína + tRNA contendo metil, de acordo com busca em [BRENDA](#). A participação da proteína codificada por SMU.1003 na biogênese de parede celular de *S. mutans* ainda não foi confirmada experimentalmente, entretanto, possui similaridades com GidA (proteína de divisão inibida pela glicose) a qual, quando ausente em *E coli*, afeta a divisão celular na presença de glicose (von Meyenberg *et al.*, 1982). Há indícios de super expressão de SMU.1003 durante a adaptação ácida de *S. mutans*, possivelmente devido a modificações estruturais na parede e membrana celular (Gong *et al.*, 2009).

Ao contrário dos demais genes, a expressão de SMU.609 foi significativamente aumentada na ausência de VicK. A fase aberta de leitura

codifica uma possível proteína de 67kDa, na seqüência da qual são encontrados domínios repetidos associados com a função de hidrolase de mureína. Estes domínios, se removidos, afetam a capacidade hidrolítica de mureína (Catt & Gregory, 2005). Em *S.gordonii* e *S.sanguinis*, os ortólogos de SMU.609 são anotados como N-acetilmuramidases. Essa classe de enzimas pertence à família de hidrolases, agindo de forma catabólica sobre ligações entre carbono e nitrogênio. Em *Enterococcus faecalis*, os genes responsáveis pela codificação de duas N-acetilmuramidases não são essenciais à viabilidade celular, porém parecem contribuir quase que totalmente para a digestão do septo e, na sua ausência, há formação de longas cadeias (Mesnage *et al.*, 2008).

6.3. A INATIVAÇÃO DE *COVR* OU *VICK* AFETA O FENÓTIPO DE *S. MUTANS*.

As alterações gênicas ocorridas no mutante *covR*- resultam em um menor crescimento destas cepas (Figura 10). Não encontramos diferenças entre as taxas de crescimento e crescimento total entre as cepas (UA159, 20A3 e 5ST1), originalmente sensíveis a eritromicina (*ermS*), e as mesmas cepas contendo o plasmídeo pVA838 (*ermR*) cultivadas na presença de eritromicina (10ug/ml) (dados não mostrados). Isso indica que o crescimento reduzido nos mutantes *covR*- foi conseqüência da inativação do gene *covR*, e não devido à presença do gene de resistência a eritromicina ou à presença de eritromicina no meio de cultivo. Em adição, os mutantes de *covR* ou *vick*, quando complementados com o gene em plasmídeo, tiveram seu crescimento igualados às cepas selvagens (dados não mostrados).

Nas condições utilizadas neste estudo, as taxas de crescimento medidas pela A_{550nm} dos mutantes de *vick*, e respectivas cepas selvagens, foram similares. Em contraste, há estudo que indique que o mutante de *vick* no *background* genético de UA159 tenha crescimento total maior do que a cepa selvagem durante o crescimento em anaerobiose em microplacas (Senadheera *et al.*, 2005). Entretanto, isso pode ser devido às condições distintas de crescimento que foram utilizadas naquele estudo, como, por exemplo, composição do meio de

cultura ou a simples precipitação celular, característica desses mutantes, no centro dos poços da microplaca. Pelo menos qualitativamente, o crescimento planctônico mostra-se alterado, pela evidente precipitação das células em cultura fechada (Figura 11).

A participação de CovR na regulação dos genes envolvidos na biogênese do envelope celular é consistente com os defeitos no crescimento (Figura 10) e na morfologia celular (Figura 26). Devido às alterações morfológicas nos mutantes *covR*- serem menos evidentes que nos mutantes *vick*- (Figura 26), serão realizadas análises futuras nas cepas *covR*- e WT para a medição do comprimento celular, através de imagens obtidas por MEV e *software*, objetivando a realização de análise estatística que fortaleça as observações visuais.

Em *S. pneumoniae*, o sistema VicRK regula a expressão de PcsB (de *protein required for cell separation*), que atua como hidrolase de peptidoglicano. A expressão de *pcsB* diminuída resulta em defeitos na separação e morfologia celulares (Reinscheid *et al.*, 2001; Ng *et al.*, 2005). Em *S. mutans*, o gene ortólogo de *pcsB* é *gbpB*, que também é regulado pelo sistema VicRK. Se *gbpB* possuir a mesma função de *pcsB*, a expressão de *gbpB* diminuída pode ter participação no fenótipo de cadeias longas observadas no mutante *vick*- (Figura 26).

Além da alteração no crescimento e morfologia celular, características de superfície e envelope celular como a hidrofobicidade celular e a susceptibilidade à autólise foram afetadas pela mutação de *covR* ou *vick*. A hidrofobicidade celular de uma cultura é medida através da capacidade das células se associarem ao n-hexadecano, um hidrocarbono hidrofóbico que possui ponto de fusão abaixo da temperatura ambiente e não causa lise à célula bacteriana (Gibbons & Etherden, 1983; Doyle, 2000).

Tipicamente, *S. mutans* possuem baixa hidrofobicidade quando comparados a outras espécies de estreptococos orais como, por exemplo, *S. sanguinis* ou *S. mitis* (Gibbons & Etherden, 1983). Uma significativa proporção das macromoléculas salivares contém regiões hidrofóbicas, as quais associam-se mais à adsorventes hidrofóbicos. Assim, cepas que se associam bem ao

hexadecano, como possivelmente os colonizadores primários da placa dental, se associam bem em superfícies com película de saliva (Gibbons & Etherden, 1983; Koga *et al.*, 1990).

Uma alta hidrofobicidade celular parece também facilitar a adesão microbiana em ambas as superfícies hidrofóbicas e hidrofílicas (Liu *et al.*, 2004). A extrema hidrofobicidade presente no mutante *vick*⁻ (Figura 22, 23) não foi suficiente para realizar a formação do biofilme por mutantes *vick*⁻ em níveis similares ao da cepa selvagem (Figura 12). Sugerimos que, embora a hidrofobicidade possa constituir um mecanismo importante na interação com superfícies e adesão, por si não garantem a fixação do microrganismo, o que pode ser justificado pela sua baixa força atrativa (Gibbons & Etherden, 1983; Liu *et al.*, 2004). Em mutantes *covR*⁻, os níveis de hidrofobicidade foram similares entre todas as cepas, indicando que 5ST1 não formou mais biofilme devido a alterações nessa característica.

Em *S. mutans*, diversas proteínas de superfície parecem computar para a hidrofobicidade (McBride *et al.*, 1984; Koga *et al.*, 1990; Terao *et al.*, 2009), embora a contribuição da maioria delas ainda não tenha sido caracterizada. A alta produção da proteína PAc torna nas células mais hidrofóbicas, enquanto que a sua ausência as torna hidrofílicas (Koga *et al.*, 1990). Não houve indícios de alteração dessa proteína nos mutantes *vick*⁻ ou *covR*⁻. A baixa produção de GtfB/C e aumento de produção de proteínas ligadoras de glucano parecem aumentar a hidrofobicidade celular (Terao *et al.*, 2009). Os mutantes *vick*⁻ apresentaram baixa expressão de *gtfB/C* e *gpbB* e apresentaram alta hidrofobicidade; em contra partida, mutantes *covR*⁻ apresentaram alta expressão de *gtfB/C* e *gpbB*, e também se tornaram pouco mais hidrofóbicos que as cepas selvagens. Por esses dados, entendemos que as quantidades de *gtfB/C* e *gpbB* por si não são fatores que exclusivamente contribuíram para a alteração da hidrofobicidade nos mutantes deste estudo, e que outra(s) proteína(s) de superfície ainda não caracterizada(s) esta(ão) contribuindo para esse fenótipo. Em

adição, a quantidade de ácido lipoteicóico parece não mudar entre paredes celulares hidrofílicas e hidrofóbicas (McBride *et al.*, 1984).

Além das características de hidrofobicidade, a capacidade de autólise também se encontrou alterada nos mutantes *covR*- e *vick*-. Obtivemos dados inéditos de que os mutantes *covR*- foram até 30% mais resistente a autólise que as cepas WT, descrevendo pela primeira vez a participação, ainda que por mecanismo desconhecido, de CovR no processo de autólise celular. O mutante *vick*- obtido a partir da cepa UA159 foi altamente resistente ao processo de autólise *in vitro* (Figura 24, 25), conforme previamente determinado (Ahn & Burne, 2007). Neste estudo confirmamos esses dados em outros dois genótipos (20A3 e 5ST1) (Figura 25). O fenótipo de resistência à autólise nesse mutante parece ser, em parte, devido a inibição da maturação da autolisina AtIA da sua forma nativa (107kDa) para a sua forma funcional (79kDa), por mecanismo ainda pouco compreendido (Ahn & Burne, 2007). Não foram observadas diferenças estatísticas na expressão do gene *altA* nos mutantes *covR*- e *vick*- versus cepa selvagem nos ensaios de *microarray*, indicando que outros mecanismos contribuíram para o fenótipo de resistência à autólise apresentados pelos mutantes. Similarmente, em *B. subtilis* e outras espécies, o sistema VicRK ativa a expressão de autolisinas e inibe genes que codificam proteínas que modulam a atividade destas. A falta de alguma dessas autolisinas como, por exemplo, YvcE e LytE, pode levar à diminuição da síntese de parede celular e defeitos na elongação celular em *B. subtilis* (Dubrac *et al.*, 2008).

Além dos genes já previamente demonstrados por outros trabalhos, sugerimos através deste estudo a participação direta de CovR e VicRK no controle da virulência e metabolismo de parede celular de *S. mutans*. Estudos recentes demonstram que genes de biogênese de parede celular predominam no regulon de VicRK (Dubrac *et al.*, 2008). Em *S. mutans* e em boa parte das espécies estudadas, VicR demonstrou-se essencial para a viabilidade celular, o que deveria ser incomum para um TCS, devido à natureza geralmente transitória dos sinais destes sistemas. Entretanto, conforme discutido, estudos demonstraram que além

de participar no controle da virulência, o sistema possui função crucial no controle do metabolismo da parede celular em algumas espécies, como *B. subtilis*, *S. aureus* e *S. pneumoniae* (revisado em Dubrac *et al.*, 2008). A natureza essencial do sistema VicRK provavelmente é poligênica, devido na sua ausência haver um provável desequilíbrio na síntese da parede celular e da sua remodelação, causado pelo desajuste da expressão de genes que codificam autolisinas e genes do metabolismo da parede celular, requeridos para o crescimento celular.

6.4. OS REGULADORES COVR E VICR POSSUEM GENES COMUNS EM SEU REGULON.

Como previamente descrito, a fosforilação de CovR ou VicR não aumentou a capacidade de ligação desses reguladores às seqüências alvo *in vitro* (Senadheera *et al.*, 2005; Biswas & Biswas, 2006). Uma possibilidade é das proteínas serem fosforiladas durante sua produção em *E. coli*, como descrito para r-Spo0A, de *Bacillus subtilis* (Ladds *et al.*, 2003), sendo redundante qualquer tratamento adicional com acetil-fosfato. Em contrapartida, em GAS o estado fosforilado afeta a função da ligação e repressão de 2 a 17 vezes dependendo do promotor utilizado, além de induzir sua dimerização em resíduos conservados (Churchward, 2007). Em adição, concentrações crescentes de proteínas podem causar, ou resultar, em polimerização no complexo com o DNA (Churchward, 2007). Em todos os EMSA positivos, o crescente retardamento da mobilidade foi observado, como previamente descrito (Miller *et al.*, 2001; Federle & Scott, 2002; Biswas & Biswas, 2006).

Embora o objetivo do ensaio tenha sido demonstrar a capacidade ou não de ligação de ambos reguladores, aparentemente parece haver um grau de afinidade variável de acordo com a seqüência de nucleotídeos. Por exemplo, em primeira análise, o regulador r-CovR parece ser mais "eficiente" que r-VicR (Figura 21, *gtfC*) por ser necessário apenas 1umole para efetuar um deslocamento onde com r-VicR seriam necessários 2.6umoles. Entretanto, na região operadora do gene *gpbB*, houve a necessidade de uma maior quantidade de r-CovR do que de

r-VicR, levando a crer que esses fatos não se devem a uma característica intrínseca da proteína e sim da região com qual ela se relaciona. Estudos futuros que visem definir as regiões de ligação, seqüências consenso de maior ou menor afinidade, bem como ensaios mais precisos para medição do deslocamento, podem auxiliar no entendimento quantitativo do controle por essas proteínas. A seqüência de ligação de VicR é sugerida (Senadheera *et al.*, 2005; Dubrac *et al.*, 2008) enquanto o consenso de CovR não é totalmente claro (Churchward, 2007).

Os dados reforçam o conceito de que os sistemas regulatórios estudados podem se relacionar e influenciar diretamente a regulação da expressão gênica.

6.5. ESTUDOS FUTUROS.

O trabalho realizado proporcionou várias descobertas inéditas sobre a biologia de *S. mutans*. Algumas questões devem ser finalizadas antes da submissão dos artigos científicos, como:

A) Medição e análise estatística no tamanho celular de mutantes *covR*-via MEV;

B) Análise da estabilidade de transcritos de *gbpB*, para esclarecer as variações entre dados obtidos na transcrição gênica e na produção protéica.

C) Obtenção de imagens de MEV do biofilme e da morfologia celular dos demais genótipos (20A3 e 5ST1) e respectivos mutantes.

6.6. PROJETOS FUTUROS.

A linha de pesquisa deverá seguir em cima dos resultados obtidos neste trabalho. Pretendemos construir mutantes dos genes SMU.1091, SMU.1437c e SMU.2147c e realizar análises fenotípicas pertinentes.

A localização das proteínas GbpB e Vick nas células de *S. mutans*, bem como das proteínas codificadas pelos genes acima também será considerada, de acordo com os recursos. Por exemplo, durante a fase ativa de

crescimento e divisão (fase log), VicK (Walk) parece estar mais localizado próximo ao divisoma de *B. subtilis* (Fukushima *et al.*, 2008).

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados neste trabalho podemos concluir que:

- 1) Os regulons direto e indireto de CovR e VicRK incluem diversos genes com provável função na biogênese de parede celular.
- 2) Os regulons direto e indireto de CovR e VicRK incluem *gpbB* e genes *gtfB/C/D*, envolvidos na biossíntese de matriz extracelular de glucanos de biofilmes.
- 3) CovR controla o crescimento em biofilmes e tem influência em características como hidrofobicidade e susceptibilidade à autólise.
- 4) VicRK tem influência na divisão celular, hidrofobicidade e susceptibilidade à autólise, além de participar na formação de biofilme por *S. mutans*.

REFERÊNCIAS *

01. Ahn SJ, Burne RA. Effects of oxygen on biofilm formation and the AtlA autolysin of *Streptococcus mutans*. J Bacteriol. 2007 Sep;189(17):6293-302.
02. Ahn SJ, Burne RA. The *atlA* operon of *Streptococcus mutans*: role in autolysin maturation and cell surface biogenesis. J Bacteriol. 2006 Oct;188(19):6877-88.
03. Ahn SJ, Wen ZT, Burne RA. Multilevel control of competence development and stress tolerance in *Streptococcus mutans* UA159. Infect Immun. 2006 Mar;74(3):1631-42.
04. Ajdic D, McShan WM, McLaughlin RE, Savic G, Chang J, Carson MB *et al.* Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. Proc Natl Acad Sci USA. 2002 Oct 29;99(22):14434-9.
05. Aoki H, Shiroza T, Hayakawa M, Sato S, Kuramitsu HK. Cloning of a *Streptococcus mutans* glucosyltransferase gene coding for insoluble glucan synthesis. Infect Immun 1986;53:587-594.
06. Banas JA, Vickerman MM. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. Crit Rev Oral Biol Med. 2003;14(2):89-99.
07. Banas JA. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. Front Biosci. 2004 May 1;9:1267-77. Review.
08. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 1979 Nov 24;7(6):1513-23.
09. Biswas I, Drake L, Biswas S. Regulation of *gbpC* expression in *Streptococcus mutans*. J Bacteriol. 2007 Sep;189(18):6521-31.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do *International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver*. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

10. Biswas I, Drake L, Erkina D, Biswas S. Involvement of sensor kinases in the stress tolerance response of *Streptococcus mutans*. J Bacteriol. 2008 Jan;190(1):68-77.
11. Biswas S, Biswas I. Regulation of the glucosyltransferase (*gtfBC*) operon by CovR in *Streptococcus mutans*. J Bacteriol. 2006 Feb;188(3):988-98.
12. BLAST. Basic Local Alignment Search Tool [acesso 2010 January 10]. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>
13. Blue CE, Mitchell TJ. Contribution of a response regulator to the virulence of *Streptococcus pneumoniae* is strain dependent. Infect Immun. 2003 Aug;71(8):4405-13.
14. Boneca IG. The role of peptidoglycan in pathogenesis. Curr Opin Microbiol. 2005 Feb;8(1):46-53.
15. Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoeckert C, et al. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. Nat Genet. 2001 Dec;29(4):365-71.
16. BRENDA. The Comprehensive Enzyme Information System [acesso 2010 January 10]. Disponível em <http://www.brenda-enzymes.org>
17. Campbell RE, Mosimann SC, Tanner ME, Strynadka NC. The structure of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase reveals homology to phosphoglycosyl transferases. Biochemistry. 2000 Dec 12;39(49):14993-5001.
18. Catt DM, Gregory RL. *Streptococcus mutans* murein hydrolase. J Bacteriol. 2005 Nov;187(22):7863-5.
19. Chen PM, Chen HC, Ho CT, Jung CJ, Lien HT, Chen JY et al. The two-component system ScnRK of *Streptococcus mutans* affects hydrogen peroxide resistance and murine macrophage killing. Microbes Infect. 2008 Mar;10(3):293-301.
20. Chia JS, Lee YY, Huang PT, Chen JY. Identification of stress-responsive genes in *Streptococcus mutans* by differential display reverse transcription-PCR. Infect Immun. 2001;69(4):2493-2501.

21. Childers NK, Tong G, Mitchell S, Kirk K, Russell MW, Michalek SM. A controlled clinical study of the effect of nasal immunization with a *Streptococcus mutans* antigen alone or incorporated into liposomes on induction of immune responses. *Infect Immun* 1999;67:618-623.
22. Chong P, Drake L, Biswas I. LiaS regulates virulence factor expression in *Streptococcus mutans*. *Infect Immun*. 2008 Jul;76(7):3093-9. (a)
23. Chong P, Drake L, Biswas I. Modulation of *covR* expression in *Streptococcus mutans* UA159. *J Bacteriol*. 2008 Jul;190(13):4478-88. (b)
24. Churchward G. The two faces of Janus: virulence gene regulation by CovR/S in group A streptococci. *Mol Microbiol*. 2007 Apr;64(1):34-41.
25. Corbin BD, Wang Y, Beuria TK, Margolin W. Interaction between cell division proteins FtsE and FtsZ. *J Bacteriol*. 2007 Apr;189(8):3026-35.
26. Doyle RJ. Contribution of the hydrophobic effect to microbial infection. *Microbes Infect*. 2000 Apr;2(4):391-400.
27. Dubrac S, Bisicchia P, Devine KM, Msadek T. A matter of life and death: cell wall homeostasis and the WalkR (YycGF) essential signal transduction pathway. *Mol Microbiol*. 2008 Dec;70(6):1307-22. Review
28. Dubrac S, Boneca IG, Poupel O, Msadek T. New insights into the Walk/WalR (YycG/YycF) essential signal transduction pathway reveal a major role in controlling cell wall metabolism and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2007 Nov;189(22):8257-69.
29. Dunny GM, Lee LN, LeBlanc DJ. Improved electroporation and cloning vector system for gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 1991 Apr;57(4):1194-201.
30. Duque C, Stipp RN, Sardi JCO, Hofling JF, Mattos-Graner RO Análise do efeito da exposição a níveis sub-letais de Penicilina G na expressão de GbpB em *Streptococcus mutans*. Painel PNa076, Braz Oral Res 2009;23 (Supl. 1):149-82 Proceedings of the 26th SBPqO 158 Annual Meeting.

31. Federle MJ, McIver KS, Scott JR. A response regulator that represses transcription of several virulence operons in the group A *Streptococcus*. J Bacteriol. 1999 Jun;181(12):3649-57.
32. Federle MJ, Scott JR. Identification of binding sites for the group A streptococcal global regulator CovR. Mol Microbiol. 2002 Mar;43(5):1161-72.
33. Fukushima T, Szurmant H, Kim EJ, Perego M, Hoch JA. A sensor histidine kinase co-ordinates cell wall architecture with cell division in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol. 2008 Aug;69(3):621-32.
34. Gibbons RJ, Etherden I. Comparative hydrophobicities of oral bacteria and their adherence to salivary pellicles. Infect Immun. 1983 Sep;41(3):1190-6.
35. Gilmour R, Foster JE, Sheng Q, McClain JR, Riley A, Sun PM, *et al.* New class of competitive inhibitor of bacterial histidine kinases. J Bacteriol. 2005 Dec;187(23):8196-200.
36. Gold OG, Jordan HV, Van Houte J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol. 1973 Nov;18(11):1357-64.
37. Gong Y, Tian XL, Sutherland T, Sisson G, Mai J, Ling J *et al.* Global transcriptional analysis of acid-inducible genes in *Streptococcus mutans*: multiple two-component systems involved in acid adaptation. Microbiology. 2009 Oct;155(Pt 10):3322-32.
38. Graham MR, Smoot LM, Migliaccio CA, Virtaneva K, Sturdevant DE, Porcella SF *et al.* Virulence control in group A *Streptococcus* by a two-component gene regulatory system. global expression profiling and *in vivo* infection modeling. Proc Natl Acad Sci USA. 2002 Oct 15;99(21):13855-60.
39. Groicher KH, Firek BA, Fujimoto DF, Bayles KW. The *Staphylococcus aureus* lrgAB operon modulates murein hydrolase activity and penicillin tolerance. J Bacteriol. 2000 Apr;182(7):1794-801.
40. Hamada S, Torii M, Kotani S, Tsuchitani Y. Adherence of *Streptococcus sanguis* clinical isolates to smooth surfaces and interactions of the isolates with *Streptococcus mutans* glucosyltransferase. Infect Immun 1981;32:364-372.

41. Hanada N, Kuramitsu HK. Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans gtfC* gene, coding for synthesis of both soluble and insoluble glucans. *Infect Immun* 1988;56:1999-2005.
42. Hanada N, Kuramitsu HK. Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans gtfD* gene, coding for primer-dependent soluble glucan synthesis. *Infect Immun* 1989;57:2079-2085.
43. Hirose H, Hirose K, Isogai E, Miura H, Ueda I. Close association between *Streptococcus sobrinus* in the saliva of young children and smooth-surface caries increment. *Caries Res.* 1993;27(4):292-7
44. Idone V, Brendtro S, Gillespie R, Kocaj S, Peterson E, Rendi M *et al.* Effect of an orphan response regulator on *Streptococcus mutans* sucrose-dependent adherence and cariogenesis. *Infect Immun.* 2003 Aug;71(8):4351-60.
45. Kato C, Kuramitsu HK. Carboxyl-terminal deletion analysis of the *Streptococcus mutans* glucosyltransferase-I enzyme. *FEMS Microbiol Lett.* 1990 Nov;60(3):299-302.
46. KEGG. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [acesso 2010 January 10]. Disponível em <http://www.genome.jp/kegg/>
47. Koga T, Okahashi N, Takahashi I, Kanamoto T, Asakawa H, Iwaki M. Surface hydrophobicity, adherence, and aggregation of cell surface protein antigen mutants of *Streptococcus mutans* serotype c. *Infect Immun.* 1990 Feb;58(2):289-96.
48. Ladds JC, Muchová K, Blaskovic D, Lewis RJ, Brannigan JA, Wilkinson AJ, Barák I. The response regulator Spo0A from *Bacillus subtilis* is efficiently phosphorylated in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 2003 Jun 27;223(2):153-7.
49. Lamy MC, Zouine M, Fert J, Vergassola M, Couve E, Pellegrini E *et al.* CovS/CovR of group B *Streptococcus*. a two-component global regulatory system involved in virulence. *Mol Microbiol.* 2004 Dec;54(5):1250-68.
50. Lau PC, Sung CK, Lee JH, Morrison DA, Cvitkovitch DG. PCR ligation mutagenesis in transformable streptococci: application and efficiency. *J Microbiol Methods.* 2002 Apr;49(2):193-205.

51. Layec S, Decaris B, Leblond-Bourget N. Characterization of proteins belonging to the CHAP-related superfamily within the Firmicutes. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2008;14(1-3):31-40.
52. Lee SF, Delaney GD, Elkhateeb M. A two-component covRS regulatory system regulates expression of fructosyltransferase and a novel extracellular carbohydrate in *Streptococcus mutans*. *Infect Immun*. 2004 Jul;72(7):3968-73.
53. Lévesque CM, Mair RW, Perry JA, Lau PC, Li YH, Cvitkovitch DG. Systemic inactivation and phenotypic characterization of two-component systems in expression of *Streptococcus mutans* virulence properties. *Lett Appl Microbiol*. 2007 Oct;45(4):398-404.
54. Levin JC, Wessels MR. Identification of *csrR/csrS*, a genetic locus that regulates hyaluronic acid capsule synthesis in group A *Streptococcus*. *Mol Microbiol*. 1998 Oct;30(1):209-19.
55. Li YH, Lau PC, Lee JH, Ellen RP, Cvitkovitch DG. Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms. *J Bacteriol*. 2001 Feb;183(3):897-908.
56. Li YH, Lau PC, Tang N, Svensater G, Ellen RP, Cvitkovitch DG. Novel two-component regulatory system involved in biofilm formation and acid resistance in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* 2002 Nov;184(22):6333-6342.
57. Liu Y, Yang SF, Li Y, Xu H, Qin L, Tay JH. The influence of cell and substratum surface hydrophobicities on microbial attachment. *J Biotechnol*. 2004 Jun 10;110(3):251-6.
58. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev*. 1986 Dec;50(4):353-80.
59. Macrina FL, Tobian JA, Jones KR, Evans RP, Clewell DB. A cloning vector able to replicate in *Escherichia coli* and *Streptococcus sanguis*. *Gene*. 1982 Oct;19(3):345-53.
60. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock biology of microorganisms. 10 ed. São Paulo. Pearson Education do Brasil & Prentice Hall; 2004.

61. Mattos-Graner RO, Jin S, King WF, Chen T, Smith DJ, Duncan MJ. Cloning of the *Streptococcus mutans* gene encoding glucan binding protein B and analysis of genetic diversity and protein production in clinical isolates. *Infect Immun* 2001;69:6931-6941.
62. Mattos-Graner RO, Napimoga MH, Fukushima K, Duncan MJ, Smith DJ. Comparative analysis of Gtf isozyme production and diversity in isolates of *Streptococcus mutans* with different biofilm growth phenotypes. *J Clin Microbiol* 2004;42:4586-4592.
63. Mattos-Graner RO, Porter KA, Smith DJ, Hosogi Y, Duncan MJ. Functional analysis of glucan binding protein B from *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* 2006;188(11):3813-25.
64. Mattos-Graner RO, Smith DJ, King WF, Mayer MP. Water-insoluble glucan synthesis by *mutans* streptococcal strains correlates with caries incidence in 12- to 30-month-old children. *J Dent Res* 2000;79:1371-1377.
65. McBride BC, Song M, Krasse B, Olsson J. Biochemical and immunological differences between hydrophobic and hydrophilic strains of *Streptococcus mutans*. *Infect Immun*. 1984 Apr;44(1):68-75.
66. Mesnage S, Chau F, Dubost L, Arthur M. Role of N-acetylglucosaminidase and N-acetylmuramidase activities in *Enterococcus faecalis* peptidoglycan metabolism. *J Biol Chem*. 2008 Jul 11;283(28):19845-53.
67. Miller AA, Engleberg NC, DiRita VJ. Repression of virulence genes by phosphorylation-dependent oligomerization of CsrR at target promoters in *S. pyogenes*. *Mol Microbiol*. 2001 May;40(4):976-90.
68. Mitchell TJ. The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. *Nat Rev Microbiol*. 2003 Dec;1(3):219-30. Review.
69. Monchois V, Willemot RM, Monsan P. Glucansucrases: mechanism of action and structure-function relationships. *FEMS Microbiol Rev*. 1999 Apr;23(2):131-51. Review.

70. Mooser G, Hefta SA, Paxton RJ, Shively JE, Lee TD. Isolation and sequence of an active-site peptide containing a catalytic aspartic acid from two *Streptococcus sobrinus* alpha-glucosyltransferases. *J Biol Chem*. 1991 May 15;266(14):8916-22.
71. Mooser G, Wong C. Isolation of a glucan-binding domain of glucosyltransferase (1,6-alpha-glucan synthase) from *Streptococcus sobrinus*. *Infect Immun*. 1988 Apr;56(4):880-4.
72. Ng WL, Tsui HC, Winkler ME. Regulation of the *pspA* virulence factor and essential *pcsB* murein biosynthetic genes by the phosphorylated VicR (YycF) response regulator in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol*. 2005 Nov;187(21):7444-59.
73. Ng WL, Winkler ME. Singular structures and operon organizations of essential two-component systems in species of *Streptococcus*. *Microbiology*. 2004 Oct;150(Pt 10):3096-8.
74. Nogueira RD, Alves AC, Napimoga MH, Smith DJ, Mattos-Graner RO. Characterization of salivary immunoglobulin A responses in children heavily exposed to the oral bacterium *Streptococcus mutans*: influence of specific antigen recognition in infection. *Infect Immun* 2005;73(9):5675-84.
75. Ooshima T, Matsumura M, Hoshino T, Kawabata S, Sobue S, Fujiwara T. Contributions of three glycosyltransferases to sucrose-dependent adherence of *Streptococcus mutans*. *J Dent Res*. 2001 Jul;80(7):1672-7.
76. Perry D, Kuramitsu HK. Genetic transformation of *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 1981;32(3):1295-7.
77. Qi F, Merritt J, Lux R, Shi W. Inactivation of the *ciaH* Gene in *Streptococcus mutans* diminishes mutacin production and competence development, alters sucrose-dependent biofilm formation, and reduces stress tolerance. *Infect Immun*. 2004 Aug;72(8):4895-9.
78. Quivey RG, Kuhnert WL, Hahn K. Genetics of acid adaptation in oral streptococci. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2001;12(4):301-14. Review.

79. Reinscheid DJ, Gottschalk B, Schubert A, Eikmanns BJ, Chhatwal GS. Identification and molecular analysis of PcsB, a protein required for cell wall separation of group B streptococcus. *J Bacteriol.* 2001 Feb;183(4):1175-83.
80. Rojo F. Repression of transcription initiation in bacteria. *J Bacteriol.* 1999 May;181(10):2987-91.
81. Russell RR. Glucan-binding proteins of *Streptococcus mutans* serotype c. *J Gen Microbiol.* 1979 May;112(1):197-201
82. Sato Y, Senpuku H, Okamoto K, Hanada N, Kizaki H. *Streptococcus mutans* binding to solid phase dextran mediated by the glucan-binding protein C. *Oral Microbiol Immunol.* 2002 Aug;17(4):252-6.
83. Sato Y, Yamamoto Y, Kizaki H. Cloning and sequence analysis of the *gbpC* gene encoding a novel glucan-binding protein of *Streptococcus mutans*. *Infect Immun.* 1997 Feb;65(2):668-75.
84. Sato Y, Yamamoto Y, Kizaki H. Construction of region-specific partial duplication mutants (merodiploid mutants) to identify the regulatory gene for the glucan-binding protein C gene in vivo in *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett.* 2000 May 15;186(2):187-91
85. Senadheera MD, Guggenheim B, Spatafora GA, Huang YC, Choi J, Hung DC *et al.* A VicRK signal transduction system in *Streptococcus mutans* affects *gtfBCD*, *gbpB*, and *ftf* expression, biofilm formation, and genetic competence development. *J Bacteriol* 2005;187:4064-4076.
86. Senadheera MD, Lee AW, Hung DC, Spatafora GA, Goodman SD, Cvitkovitch DG. The *Streptococcus mutans vicX* gene product modulates *gtfB/C* expression, biofilm formation, genetic competence, and oxidative stress tolerance. *J Bacteriol.* 2007;189:1451-8.
87. Shah DS, Russell RR. A novel glucan-binding protein with lipase activity from the oral pathogen *Streptococcus mutans*. *Microbiology.* 2004 Jun;150(Pt 6):1947-56.

88. Smith DJ, Akita H, King WF, Taubman MA. Purification and antigenicity of a novel glucan-binding protein of *Streptococcus mutans*. *Infect Immun*. 1994 Jun;62(6):2545-52.
89. Smith DJ, King WF, Akita H, Taubman MA. Association of salivary immunoglobulin A antibody and initial mutans streptococcal infection. *Oral Microbiol Immunol*. 1998 Oct;13(5):278-85.
90. Smith DJ, King WF, Godiska R. Passive transfer of immunoglobulin Y antibody to *Streptococcus mutans* glucan binding protein B can confer protection against experimental dental caries. *Infect Immun* 2001;69(5):3135-42
91. Smith DJ, Taubman MA, Holmberg CF, Eastcott J, King WF, Ali-Salaam P. Antigenicity and immunogenicity of a synthetic peptide derived from a glucan-binding domain of mutans streptococcal glucosyltransferase. *Infect Immun* 1993;61:2899-2905.
92. Smith TJ, Blackman SA, Foster SJ. Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzymes with multiple functions. *Microbiology*. 2000 Feb;146 (Pt 2):249-62.
93. Stipp RN, Gonçalves RB, Höfling JF, Smith DJ, Mattos-Graner RO. Transcriptional analysis of *gtfB*, *gtfC*, and *gpbB* and their putative response regulators in several isolates of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol*. 2008 Dec;23(6):466-73.
94. Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN. Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem*. 2000;69:183-215.
95. Stock JB, Ninfa AJ, Stock AM. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol Rev*. 1989 Dec;53(4):450-90.
96. Sun JH, Xu QA, Fan MW. A new strategy for the replacement therapy of dental caries. *Med Hypotheses*. 2009 Dec;73(6):1063-4.
97. Suntharalingam P, Senadheera MD, Mair RW, Lévesque CM, Cvitkovitch DG. The LiaFSR system regulates the cell envelope stress response in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol*. 2009 May;191(9):2973-84.

98. Taubman MA, Nash DA. The scientific and public-health imperative for a vaccine against dental caries. *Nat Rev Immunol*. 2006 Jul;6(7):555-63. Review.
99. Terao Y, Isoda R, Murakami J, Hamada S, Kawabata S. Molecular and biological characterization of *gtf* regulation-associated genes in *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol*. 2009 Jun;24(3):211-7.
100. Tettelin H, Massignani V, Cieslewicz MJ, Donati C, Medini D, Ward NL *et al*. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*. implications for the microbial "pan-genome". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Sep 27;102(39):13950-5.
101. Thompkins K, Chattopadhyay B, Xiao Y, Henk MC, Doerrler WT. Temperature sensitivity and cell division defects in an *Escherichia coli* strain with mutations in *yghB* and *yqjA*, encoding related and conserved inner membrane proteins. *J Bacteriol*. 2008 Jul;190(13):4489-500.
102. Tomita Y, Zhu X, Ochiai K, Namiki Y, Okada T, Ikemi T *et al*. Evaluation of three individual glucosyltransferases produced by *Streptococcus mutans* using monoclonal antibodies. *FEMS Microbiol Lett*. 1996 Dec 15;145(3):427-32.
103. Tremblay YD, Lo H, Li YH, Halperin SA, Lee SF. Expression of the *Streptococcus mutans* essential two-component regulatory system VicRK is pH and growth-phase dependent and controlled by the LiaFSR three-component regulatory system. *Microbiology*. 2009 Sep;155(Pt 9):2856-65.
104. Tsumori H, Kuramitsu H. The role of the *Streptococcus mutans* glucosyltransferases in the sucrose-dependent attachment to smooth surfaces: essential role of the GtfC enzyme. *Oral Microbiol Immunol* 1997;12:274-280.
105. UNIPROT. Universal Protein Resource [acesso 2010 January 10]. Disponível em <http://www.uniprot.org/>
106. Vollmer W, Joris B, Charlier P, Foster S. Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol Rev*. 2008 Mar;32(2):259-86.

107. von Meyenburg K, Jørgensen BB, Nielsen J, Hansen FG. Promoters of the atp operon coding for the membrane-bound ATP synthase of *Escherichia coli* mapped by Tn10 insertion mutations. *Mol Gen Genet.* 1982;188(2):240-8.
108. Winkler ME, Hoch JA. Essentiality, bypass, and targeting of the YycFG (VicRK) two-component regulatory system in gram-positive bacteria. *J Bacteriol.* 2008 Apr;190(8):2645-8.
109. Yokoyama K, Mizuguchi H, Araki Y, Kaya S, Ito E. Biosynthesis of linkage units for teichoic acids in gram-positive bacteria: distribution of related enzymes and their specificities for UDP-sugars and lipid-linked intermediates. *J Bacteriol.* 1989 Feb;171(2):940-6.
110. Zapun A, Vernet T, Pinho MG. The different shapes of cocci. *FEMS Microbiol Rev.* 2008 Mar;32(2):345-60.

ANEXO 1

Strains, plasmids and primers used in this study

Strains and plasmids	Relevant characteristics or purpose	Source
UA159	Erm ^s , spec ^s	ATCC
<i>covR</i> -	$\Delta covR::Erm^r$	This study
<i>vicK</i> -	$\Delta vicK::Erm^r$	This study
pVA838	(erm ^r) source	Macrina <i>et al.</i> , (1982)
pDL278	(spec ^r) cassette	Dunny <i>et al.</i> , (1991)
pET22B(+)	(amp ^r) Empty vector for construct and expression of His-Tag proteins	Novagen
<i>E. coli</i> DH5- α	General cloning and plasmid amplification	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21	Expression of pET22B(+>:: <i>covR</i> and pET22B(+>:: <i>vicR</i>	Novagen

Primers (constructions)	Sequence 5'-3' ^a (Forward/Reverse)	Product size, comment or purpose
E1- <i>AscI</i> E2- <i>XhoI</i>	TTGGCGCGCCTGGCGGAAACGTAAGAAG / TTCTCGAGGGCTCCTTGGAAAGCTGTCAGT	998 bp, amplicon containing the <i>erm</i> ^r gene from pVA838
<i>covP1</i> <i>covP2-AscI</i>	CCGTTCTATGAAACCTGTTGA / TTGGCGCGCCTAACGCCATCATATGTCACT	813 bp, from position 693 bp in <i>covR</i> to 109 bp upstream of <i>covR</i>
<i>covP3-XhoI</i> <i>covP4</i>	TTCTCGAGGCCCGTGTGTTGGAAGTATGAT / TCTGCCAACTCATCCATAACT	880 bp, from position 544 bp in <i>covR</i> to 722 bp downstream of <i>covR</i>
<i>covRHisF-NcoI</i> <i>covRHisR-XhoI</i>	AACCATGGCTAAGGACATTTTAATTATTGAA / TTCTCGAGATTATTTTCGCGAATGATATACCC	702 bp, <i>covR</i> ORF, His-Tag fusion construction
<i>covR-C1-EcoRI</i> <i>covR-C2-EcoRI</i>	TTGAATTCGATGTCCTCTACCCATTGAAAA / TTGAATTCGTGTTTACTCAAGCCATTCAGA	1092 bp, promoter & ORF & terminator, <i>covR</i> complementation
<i>vicKP1</i> <i>vicKP2-AscI</i>	TTACCAGATGCTTTTGTTGCT / TTGGCGCGCCTACAGACGGTTTTTCTCCTGTG	568 bp, from position 268 bp in <i>vicK</i> upstream to position 288 bp of <i>vicK</i>

Continua

ANEXO 1 - CONTINUAÇÃO

Strains, plasmids and primers used in this study

Primers (constructions)	Sequence 5'-3' ^a (Forward/Reverse)	Product size, comment or purpose
vicKP3- <i>Xho</i> I vicKP4	TTCTCGAGGTGACCGTTTTTATCGTGTTG/CTC TTGCCGTCTTTCATCAG	645 bp, from position 1156 bp in <i>vicK</i> to 421 bp downstream from <i>vicK</i>
vicRHisF- <i>Nco</i> I vicRHisR- <i>Xho</i> I	AACCATGGAGAAAATTCTAATCGTTGACGA/AA CTCGAGGTCATATGATTTTCATGTAATAAC	717bp, <i>vicR</i> ORF, HisTag fusion construction
vicK-C1-EcoRI vicK-C2-EcoRI	TTGAATTCACCTTAGCGACACACAGGTC/TTGAAT TCTTCGGTCTATTTCTGCCATTA	1705 bp, promoter & ORF & terminator, <i>vicK</i> complementation
Primers (qRT-PCR)	Sequence 5'-3' (Forward/Reverse)	Product size (source, if not this study)
16SRNA	CGGCAAGCTAATCTCTGAAA/GCCCCTAAAAGG TTACCTCA	190 bp (Stipp <i>et al.</i> , 2008)
SMU.22 (<i>gbpB</i>)	CAACAGAAGCACAACCATCA/TGTCCACCATTA CCCCAGT	151 bp (Stipp <i>et al.</i> , 2008)
SMU.112c	GATGTTACCGCCATAGAAGAAA/GGGTCAGTAT GTAATTCGCAGT	149 bp
SMU.124	CGTTTTGGATGTTCTTTATGCT/CACGTCTGTC ATCTGGATTTG	152 bp
SMU.367	CGAATGCCAATACTTATCCTGT/ATGTCCATAA CCACCATCTGTC	185 bp
SMU.498	CATGCCAATCCCTTAGTTGTT/TGGAAGATAGG TTTGCAGTGA	195 bp
SMU.575c	ATTTCCCTAGCAGCCAATTTA/AGCTATGAGCA GTCCATTTTTTC	175 bp
SMU.609	GGCACAAGGAACCTATCACTTT/GCTTTCCAAT AACACATAACGAC	191 bp
SMU.625	TGGGTCTGGGTGTTTATTTCT/CAGTTATTGTT GATTTGGCAGTC	150 bp
SMU.644	ATCGAAAAAGTCATACCAGAACC/GCCACAGTA CCTGATAACCATT	151 bp
SMU.772	TCAAAGCCATTTCACTTCTACAG/AGAGTCATA CCGCCACCATTA	198 bp

Continuação

ANEXO 1 - CONTINUAÇÃO

Strains, plasmids and primers used in this study

Primers (qRT-PCR)	Sequence 5'-3' (Forward/Reverse)	Product size (source, if not this study)
Smu.836	AGATGCTGACGGGAATACTTT/TCTTGACTTTC GTTTTAGGAATA	143 bp
SMU.910 (<i>gtfD</i>)	TGATTCGTGGTATCGTCCTAA/GTTGAGACTTT CTGGGCTGCT	199 bp
SMU.1003	TCGCAACTCTTACATTGACTCC/AAACGACGAA CAGCATTGATT	159bp
SMU.1004 (<i>gtfB</i>)	CGAAATCCCAAATTTCTAATGA/TGTTTCCCA ACAGTATAAGGA	197pb (Stipp <i>et al.</i> , 2008)
SMU.1005 (<i>gtfC</i>)	ACCAACCGCCACTGTTACT/AACGGTTTACCGC TTTTGAT	161bp (Stipp <i>et al.</i> , 2008)
SMU.1091	TATTCCTGTGCCTTCTGTTGA/GCCTTCTTGAC TTTTGGATTG	187bp
SMU.1395c	ATGACAGATCAAGAATTAGAACA/ATATTCAGG AAATGCTTCATC	114bp
SMU.1398	ACGACTGAGGATAAAGTTGCTG/CACCATAAAT CTGAATGTTTTCG	178bp
SMU.1434c	TTGGTCTATTTAAGCCAGGTGT/AGTAAGCCAA TAAGGCAATCC	189bp
SMU.1437c	GCAAATACAGAGCGTATCCATC/TAAAGTCCCT GCTGCTACTCC	189bp
SMU.1489	TCTTGAAAGGGCAGAAATACC/AAGGACTCTTA TTGGCTGTTGA	183bp
SMU.1516 (<i>vick</i>)	CGGCGTGATGAATATGATGAA/GAGGTTAATGG TGCCGCAGT	185bp
SMU.1517 (<i>vicR</i>)	AGTGGCTGAGGAAAATGCTT/CATCACCTGACC TGTGTGTG	163bp (Stipp <i>et al.</i> , 2008)
SMU.1599	CTATGGTAGTGCTCAAATGCTG/CTGTCAAGAA AACCGAACTG	194bp
SMU.1910c	AAGAGGACCAGTCGGTTAAAG/CGAACCAAGGA CTATTA AAAACA	173bp

Continuação

ANEXO 1 - CONTINUAÇÃO

Strains, plasmids and primers used in this study

Primers (qRT-PCR)	Sequence 5'-3' (Forward/Reverse)	Product size (source, if not this study)
SMU.1918c	TTGTAGCTGGCCTTAGTCAA/GCCAAGATAAT AGCAGAAAAATG	152bp
SMU.1988c	GTTATCAAAAAGAGTGGGCAAA/AGTTAAAAGC GCAAGAGAATGA	155bp
SMU.1924 (<i>covR</i>)	ACGAAATATGGCACGAACAC/CAGAGATGGACG GGTATGAA	185bp (Stipp <i>et al.</i> , 2008)
SMU.2060	TGAAAATGAGCATCGCTAACA/AGAAGCCACTG CAATAAAAGGT	146bp
SMU.2133c	CAAGTCCTGTCACTATCAAGCA/TCTATCCATT CTCGTAGGGTTTT	172bp
SMU.2146c	AATCTGTTCTTGCTCACACTGC/ACATTATCAG TTGGTTCAGTTGCT	145bp
SMU.2147c	TTATCAGAGATTGCTTCAACACA/CTGAGGTTT CTGCTTCATTTATC	175bp

Primers EMSA	Sequence 5'-3' (Forward/Reverse)	Product size and base pairs (Upstream/internal gene area)
SMU.22 (<i>gbpB</i>)	TTGACAGCTTATCCTTTAAATG/TTTACAGCTG ATAATGTTGTCG	300 (223/87)
SMU.367	CGTGGTCCTAGTCTTGTTATTTG/CTGCATCAG CCATTTTATTTT	328 (240/88)
SMU.498	GATCGTTTGATATCGCTGTTTT/TTCATTTGAT TTCGGTCAAG	322 (269/53)
SMU.548	GTTTTGCATTTACGAACGAGA/CTCCTAATTT GCCAAGAGAC	324 (227/97)
SMU.575c	CTTACTGGTGATGGTCAATGG/GGTGCTGATTT TGATTGTGTT	298 (257/41)
SMU.609	TGGAAGAGAAGATGTAACAATGA/ACACAGCCA ATTAAACAGATG	359 (270/89)

Continuação

ANEXO 1 - CONTINUAÇÃO

Strains, plasmids and primers used in this study

Primers EMSA	Sequence 5'-3' (Forward/Reverse)	Product size and base pairs (Upstream/internal gene area)
SMU.644	TTGTCATTCTTCCGCTGTTTA/CTTTTGTTCAGG AATACCATTTCAG	305 (240/65)
SMU.836	TGGGTAGGCACAGAGATTAAC/TGCTGCCGTAT AAGAACTAACA	300 (225/75)
SMU.910 (<i>gtfD</i>)	TCTCTCCTGACCACTCCCTTA/TACCCAGTGCT TTTTAACCTTG	324 (273/51)
SMU.1003	AAAAGGATCAACCTGTATTTCTG/GCCCCAACA ACATTAATATAAGA	338 (306/32)
SMU.1005 (<i>gtfC</i>)	GATGCTAACTCTGGAGAACGA/TCCTGAAAGAG AGGTCAAAGTC	330 (231/ 99)
SMU.1091	GCTTCCGAACATTGATCTTATT/GTCGTTAAAA TAGCTCCACAAAG	324 (256/68)
SMU.1395c	GACAGCAGAATTGAAATCAC/CTTTCAAGTTCA GTCACATCA	280 (233/47)
SMU.1434c	GTCTTGGCATCAGTCTCTTTTT/GTGCAATCAC AACATCTTCATT	298 (249/49)
SMU.1437c	TTGACATATACGAAACAGTCTCT/TTGTACCAA AGACAAGCATAA	311 (274/37)
SMU.1924 (<i>covR</i>)	AGATGTCCTCTACCCATTGAAAAATGG/AACCT CATATCCTTCATGTTGTAATTCTAAAG	356 (269/87) (Biswas & Biswas, 2006)
SMU.2147c	ACAGCTTGGCTATTGTTGGTA/TGCAATTCCTG CAAACTAAC	316 (250/66)

^a Underlined sequences indicate restriction enzyme linkers.

Conclusão

ANEXO 2

THE INSTITUTE FOR GENOMIC RESEARCH <i>Standard Operating Procedure</i>		
TITLE: MICROBIAL RNA AMINOALLYL LABELING FOR MICROARRAYS		PAGE: 1 of 7
SOP #: M007	REVISION LEVEL: 2.0	EFFECTIVE DATE: 09/06
AUTHOR: <i>Jeremy Hasseman, Jon Hnath, Kathy Ong, Eric Snesrud</i>		PRIMARY REVIEWERS: <i>Robin Cline, Marcus Jones, Tim Minogue</i>

1. PURPOSE

This protocol describes the production of labeled DNA from microbial RNA with aminoallyl-labeled nucleotides via first strand cDNA synthesis with aminoallyl-dUTP followed by a coupling of the aminoallyl groups to either Cyanine-3 or Cyanine-5 (Cy-3/Cy-5) fluorescent molecules.

2. SCOPE

This procedural format is utilized by the Pathogen Functional Genomics Resource Center and the Microbial Genomics Department at TIGR.

*This procedure is for a **single** Cy dye (3 or 5) incorporation. You will need both a Cy3 and Cy5 probe for the microarray slide hybridization protocol. This procedure must, therefore, be run twice – once for each labeled probe (Cy3 and Cy5).*

3. MATERIALS

The following raw materials are required:

- 3.1 Purified total RNA (Store at -80 °C)
- 3.2 5-(3-aminoallyl)-dUTP (Sigma; Cat # A0410) (Store at -20 °C)
- 3.3 100 mM dNTP Set PCR grade (Invitrogen; Cat # 10297-018) (Store at -20 °C)
- 3.4 Random Hexamer primers (3µg/µL) (Invitrogen; Cat # 48190-011) (Store at -20 °C)
- 3.5 PowerScript RT (100 rxns) (Clontech; Cat # 639501) (Store at -20 °C)
- 3.6 RNaseOUT Recom. Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen; Cat#10777-019) (Store at -20 °C)
- 3.7 Cy-3 mono-Reactive Dye Pack (Amersham Biosciences; Cat # PA23001) (Store at 4 °C)
- 3.8 Cy-5 mono-Reactive Dye Pack (Amersham Biosciences; Cat # PA25001) (Store at 4 °C)
- 3.9 MinElute PCR Purification Kit (Qiagen; Cat # 28004)
- 3.10 DEPC Water (Ambion; Cat # 9920)
- 3.11 Dimethyl Sulfoxide (Sigma; Cat # D-8418) (Store desiccated)
- 3.12 0.5 M EDTA (pH 8.0) (Ambion; Cat # 9260G)
- 3.13 1 M Tris pH 7.0 (Ambion; Cat # 9851)
- 3.14 * Autoclaved Deionized Water or Deionized MilliQ Water (UV and Carbon filtered) (NANOpure Infinity UV; Model D8971)
- 3.15 3 M Sodium Acetate (pH 5.5) (Ambion; Cat # 9740)
- 3.16 Potassium Phosphate Dibasic (K₂HPO₄) (Fisher; Cat # BP363-500)
- 3.17 Potassium Phosphate Monobasic (KH₂PO₄) (Fisher; Cat # BP362-500)
- 3.18 Hydrochloric Acid (Fisher; Cat # A508-500)
- 3.19 Sodium Carbonate (Na₂CO₃) (Fisher; Cat # BP357-1)

Continua

ANEXO 2 - CONTINUAÇÃO

THE INSTITUTE FOR GENOMIC RESEARCH		
TITLE: MICROBIAL RNA AMINOALLYL LABELING FOR MICROARRAYS		
SOP #: M007	REVISION LEVEL: 2.0	PAGE: 2 of 7

- 3.20 Sodium Hydroxide Pellets, Molecular Grade (Fisher; Cat # BP359-500)
 3.21 190 Proof Ethyl Alcohol, 95% (Pharmco; Cat # 111USP190CSGL)
 3.22 No-Stick RNase-Free 1.5 mL Microfuge Tubes (Ambion; Cat # 12450)
 3.23 Aluminum Foil

* UV and Carbon filtered MQ water (NANOpure Infinity UV; Model D8971) may be used as an alternative to DI water. However, water must be completely filtered to eliminate any residual free radicals. Free radicals compete with Cy dyes, drastically inhibiting efficient coupling and hybridization.

4. EQUIPMENT REQUIRED

4.1 You will need the following machinery for this procedure:

Speed Vac	42 °C Water bath
65 °C Heat block	Microtube Centrifuge
70 °C Heat block	UV Spectrophotometer

4.2 You will need to make the following buffers and reagents before beginning this procedure:

DAY 1 Reagents

1 M KPO₄, pH -8.5:

(95mL 1M K₂HPO₄ ; 5mL 1 M KH₂PO₄)

K ₂ HPO ₄	16.547 gm
KH ₂ PO ₄	0.680 gm
MilliQ/DI Water	100 mL
Total volume 100 mL	

25mM labeling mix. Store at -20°C: *

(2:1 aa-dUTP to dTTP)(RNase-Free tube)

dATP (100 mM)	28.5 µL
dCTP (100 mM)	28.5 µL
dGTP (100 mM)	28.5 µL
dTTP (100 mM)	9.5 µL
aa-dUTP (50 mM)	1 vial
0.1M KPO ₄	19.1 µL
Total volume 114.1 µL	

25mM labeling mix. Store at -20°C: *

(2:3 aa-dUTP to dTTP)(RNase-Free tube)

dATP (100 mM)	47.6 µL
dCTP (100 mM)	47.6 µL
dGTP (100 mM)	47.6 µL
dTTP (100 mM)	28.5 µL
aa-dUTP (50 mM)	1 vial
0.1M KPO ₄	19.1 µL
Total volume 190.4 µL	

Continuação

ANEXO 2 - CONTINUAÇÃO

THE INSTITUTE FOR GENOMIC RESEARCH		
TITLE: MICROBIAL RNA AMINOALLYL LABELING FOR MICROARRAYS		
SOP #: M007	REVISION LEVEL: 2.0	PAGE: 3 of 7

DAY 2 Reagents

<u>100 mM NaOAc pH 5.2</u>		
3 M NaOAc pH 5.5		1
mL		
<u>MilliQ/DI Water</u>	29 mL	
	Total Volume	30 mL

<u>1 M NaOH</u>		
NaOH pellets	2 gm	
<u>MilliQ/DI water</u>	50 mL	
	Total volume	50 mL

<u>Phosphate elution buffer*</u> :		
<i>(4 mM KPO₄ pH8.5)</i>		
1 M KPO ₄ pH 8.5	0.2 mL	
<u>MilliQ/DI water</u>	49.8	
mL		
	Total volume	50 mL

<u>Phosphate wash buffer*</u> :		
<i>(5 mM KPO₄ pH 8.0 80% EtOH)</i>		
1 M KPO ₄ pH 8.5	0.25 mL	
<u>MilliQ/DI water</u>	7.625 mL	
<u>95% ethanol</u>	42.125	
mL		
	Total volume	50 mL

<u>Cy 3/Cy 5 dyes. Store at -20°C. §</u>		
Cy Dye		1 vial
<u>DMSO</u>	73 µL	
	Total volume	73 µL

<u>0.1 M Sodium Carbonate Buffer pH 9.3*</u> :		
<i>(Make fresh if possible; store at -20°C)</i>		
Na ₂ CO ₃ powder	0.53 gm	
<u>MilliQ water</u>	50 mL	
<u>HCl</u>	lower pH to 9.3	
	Total volume	50 mL

* **Note:** The optimal ratio of aa-dUTP to dTTP varies depending on the GC content of the organism in question. The above was determined by experimentation and should work for a wide spectrum of bacterial genomes; however, the user may feel free to optimize the ratio as needed. Organisms with high GC content generally require a lower aa-dUTP to dTTP ratio than organisms with low GC content, which require a higher aa-dUTP to dTTP ratio.

§ **Note:** Currently (9/06) the desiccant packs for Amersham's Cy3/Cy5 dyes come in two colors: Purple and Yellow. Purple packs turn Pink when exposed to moisture. Yellow packs turn Green when exposed to moisture.

◆ **Note:** The freshness and pH of the buffers are crucial to the success of this protocol. Buffers should be tested after two weeks to ensure they are still at the required pH.

Continuação

ANEXO 2 - CONTINUAÇÃO

THE INSTITUTE FOR GENOMIC RESEARCH		
TITLE: MICROBIAL RNA AMINOALLYL LABELING FOR MICROARRAYS		
SOP #: M007	REVISION LEVEL: 2.0	PAGE: 4 of 7

5. PROCEDURE

5.1 cDNA Synthesis

5.1.1 Aminoallyl-labelled cDNA synthesis

- In an RNase-free tube, combine the following reagents:
 - Total RNA 2 µg
 - Random Hexamers (3mg/mL) 2 µl
 - RNaseOUT 1 µl
 - DEPC water bring to 18.5 µl
- Mix well and incubate at 70°C for 10 minutes.
- Snap-freeze samples on ice for 30 seconds. Centrifuge above 10,000 rpm briefly to bring down any condensation.
- Mix the RNA/primers with reverse transcriptase and buffers:

RNA/primer mix	18.5 µl
5x First Strand buffer	6 µl
0.1 M DTT	3 µl
25 mM dNTP/aa-UTP labeling mix	0.6 µl
PowerScript RT	2 µl
	30.1 µl

- Mix and incubate in a 42°C waterbath for 8-16 hours. (Overnight is recommended)

5.1.2 Stop the first strand synthesis reaction

- Hydrolyze the RNA in the cDNA/RNA mixture by adding:
 - 0.5 M EDTA 10 µL
 - 1 M NaOH 10 µL
- Mix and incubate at 65°C for 15 minutes.
- Centrifuge above 10,000 rpm briefly to bring down any condensation.
- Add 25 µL 1 M Tris (pH 7.0) to neutralize pH.

5.1.3 Removal of unincorporated aa-dUTP and free amines

Note: This purification protocol is modified from the Qiagen MinElute PCR purification kit protocol. The phosphate wash and elution buffers are substituted for the Qiagen supplied buffers to avoid contamination with free amines which compete with the aa-dUTP in the Cy-dye coupling reaction. It should also be noted that while this

Continuação

ANEXO 2 - CONTINUAÇÃO

THE INSTITUTE FOR GENOMIC RESEARCH		
TITLE: MICROBIAL RNA AMINOALLYL LABELING FOR MICROARRAYS		
SOP #: M007	REVISION LEVEL: 2.0	PAGE: 5 of 7

protocol has been optimized with the MinElute PCR purification kits, other clean-up kits (including Millipore's Montage kit) are available and could be used in place of the Qiagen kits.

- Vigorously mix cDNA reaction with 400 μ L (5X reaction volume) PB buffer (Qiagen supplied) before transferring to MinElute column.
- Centrifuge at 13,000 rpm for 1 minute. Empty flow through.
- To wash, add 750 μ L **phosphate wash buffer** to the column and centrifuge at 13,000 rpm for 1 minute.
- Empty the collection tube and centrifuge the column an additional 1 minute at ~13,000 rpm to remove residual wash buffer.
- Transfer column to a new 1.5 mL microfuge tube and carefully add 30 μ L **phosphate elution buffer** to the center of the column membrane.
- Let sit for ~1 minute at room temperature.
- Elute by centrifugation at 13,000 rpm for 1 minute.
- Elute a second time into the same tube by repeating with another 30 μ L of phosphate elution buffer, incubating an additional minute, and centrifuging sample.
- The final elution volume should be ~60 μ L.
- Take readings of undiluted samples at wavelength of 260 to determine cDNA concentration.
- Transfer the open tube to a speed vac and dry it down to completion (~30 minutes).

5.2 Coupling aminoallyl-labelled cDNA to Cy Dye Ester.

5.2.1 Cy dye labeling

- Resuspend aminoallyl-labeled cDNA in 4.5 μ L 0.1 M sodium carbonate buffer pH 9.3 by pipetting up and down for several minutes making sure that the pellet is thoroughly resuspended.
- Add 4.5 μ L of the appropriate resuspended Cy dye. Pipet up and down several times to thoroughly mix the sample.
- Incubate the reaction at room temperature for at least 1 hour.
- After coupling has finished, add 35 μ L 100 mM NaOAc pH 5.2.
- During the time that the DNA is coupling you may start to prepare prehybridization buffer and begin to prehybridize slides according to SOP M008 section 5.1.1 and 5.1.2 if the probes are going to be hybridized the same day.

Continuação

ANEXO 2 - CONTINUAÇÃO

THE INSTITUTE FOR GENOMIC RESEARCH		
TITLE: MICROBIAL RNA AMINOALLYL LABELING FOR MICROARRAYS		
SOP #: M007	REVISION LEVEL: 2.0	PAGE: 6 of 7

5.2.2 Removal of free dye by purification

Note: This purification protocol is modified from the Qiagen MinElute PCR purification kit protocol. It should also be noted that while this protocol has been optimized with the Qiagen MinElute PCR purification kits, other clean-up kits (including Millipore's Montage kit) are available and could be used in place of the Qiagen kits.

- Vigorously mix cDNA reaction with 250 μ L (5X reaction volume) PB buffer (Qiagen supplied) before transferring to MinElute column.
- Centrifuge at \sim 13,000 rpm for 1 minute. Empty flow through.
- To wash, add 750 μ L **PE Buffer** (Qiagen supplied) to the column and centrifuge at 13,000 rpm for 1 minute.
- Empty the collection tube and centrifuge the column an additional 1 minute at 13,000 rpm to remove residual PE buffer.
- Transfer column to a new 1.5 mL microfuge tube and carefully add 30 μ L EB buffer (Qiagen supplied) to the center of the column membrane.
- Let sit for \sim 1 minute at room temperature.
- Elute by centrifugation at 13,000 rpm for 1 minute.
- Elute a second time into the same tube by repeating with another 30 μ L of EB buffer, incubating an additional minute, and centrifuging sample..
- The final elution volume should be \sim 60 μ L.

5.3 Analysis of labeling reaction

5.3.1 Quantitation

- Take readings of the undiluted samples at the following wavelengths:
 - 260 nm for determination of cDNA concentration
 - 650 nm for determination of Cy5 incorporation
 - 550 nm for determination of Cy3 incorporation

Continuação

ANEXO 2 - CONTINUAÇÃO

THE INSTITUTE FOR GENOMIC RESEARCH		
TITLE: MICROBIAL RNA AMINOALLYL LABELING FOR MICROARRAYS		
SOP #: M007	REVISION LEVEL: 2.0	PAGE: 7 of 7

5.3.2 Analysis

* Note: The following absorbance calculations are derived for a 1 cm cuvette pathlength. Changes in pathlength will require the appropriate modifications to be applied.

- For each sample calculate the total picomoles of cDNA synthesized using:

$$\text{pmol nucleotides} = \frac{[\text{OD}_{260}] * \text{volume (in } \mu\text{L)} * (37 \text{ ng}/\mu\text{L}) * (1000 \text{ pg}/\text{ng})}{(324.5 \text{ pg}/\text{pmol})}$$

▫ Note: $([\text{OD}_{260}] * (37) * (\mu\text{L})) = \text{ng of cDNA produced}; 324.5 \text{ pg}/\text{pmol}$ average molecular weight of a dNTP

- For each sample calculate the total picomoles of dye incorporation (Cy3 or Cy5 accordingly) using:

$$\text{pmol Cy3} = \frac{\text{OD}_{425} * \text{volume (in } \mu\text{L)}}{0.15}$$

$$\text{pmol Cy5} = \frac{\text{OD}_{635} * \text{volume (in } \mu\text{L)}}{0.25}$$

- To calculate the incorporation ratio of cDNA to dye:

$$\# \text{ nucleotides/dye incorporated} = \frac{\text{pmol cDNA}}{\text{pmol Cy dye}}$$

- *>800 pmol of dye incorporation per sample and a #nucleotides/dye incorporation ratio of less than 20 is optimal for hybridizations*

5.3.3 Preparation for hybridization

- After analysis mix together the two differentially labeled probes (Cy3 and Cy5) which will be hybridized to the same microarray slide.
- Dry the Cy3/Cy5 probe mixture to completion in a speed vac (about ~30 minutes)
- Continue with SOP-M008 for the hybridization of the probe to a microarray.
- If not used immediately, the dried or resuspended probes should be stored at -80°C.

Conclusão

ANEXO 3

THE INSTITUTE FOR GENOMIC RESEARCH <i>Standard Operating Procedure</i>		
TITLE: HYBRIDIZATION OF LABELED DNA AND CDNA PROBES		PAGE: 1 of 7
SOP #: M008	REVISION LEVEL: 2.1	EFFECTIVE DATE: 11/06
AUTHOR: <i>Jeremy Hasseman, Jon Hnath, Kathy Ong, Erik Snesrud</i>		PRIMARY REVIEWERS: <i>Robin Cline, Marcus Jones, Tim Minogue</i>

1. PURPOSE

This protocol describes the hybridization of a Cy-dye labeled DNA and cDNA probe (mix of Cy3 and Cy5) onto an amino-silane coated or epoxy coated slide spotted with PCR amplicon or oligonucleotide arrays. This protocol is designed for use with PFGR microarrays.

2. SCOPE

This procedural format is currently utilized by the Pathogen Functional Genomics Resource Center and the Microbial Genomics Department at TIGR.

3. MATERIALS

- 3.1 20X SSC Buffer (Ambion; Cat # 9763)
- 3.2 10% SDS Solution (Ambion; Cat # 9823)
- 3.3 BSA fraction V Powder (Sigma; Cat # A-9418) (*Store at 4°C desiccated*)
- 3.4 Formamide (Sigma; Cat # F-7503) (*Store desiccated*)
- 3.5 2-Propanol (isopropyl alcohol) (Fisher Scientific; Cat # A451-1)
- 3.6 Coplin Staining Jar (VWR; Cat # 25457-200)
- 3.7 LifterSlip™ coverslips (Erie Scientific, Cat# 25X60I-2-4789) or Fisherfinest Premium Cover Glasses (Fisher Scientific; Cat # 12-548-5P)
- 3.8 Hybridization chamber (Corning; Cat #2551)
- 3.9 Corning Brand Mini-Miser Filter-Top Tube .22 µm (Fisher Scientific; Cat # 09-761-34)
- 3.10 Sheared Salmon Sperm DNA (10 mg/mL) (Ambion; Cat # 9680) (*Store at -20°C*)
- 3.11 Surfactant-Free Cellulose Acetate Syringe Filters .45 µM (VWR; Cat # 28196-114)
- 3.12 Wheaton Glass Staining Dishes (Fisher Cat# 08-812)
- 3.13 * Autoclaved Deionized water or Autoclaved MilliQ Water (UV and Carbon filtered) (NANOpure Infinity UV; Model D8971)
- 3.14 Microarray printed slides
- 3.15 Cy3/Cy5 Labeled cDNA probes (*see SOP M007 or M009*) (*Store at -80°C*)
- 3.16 Pyrex Brand Glass Drying Tray (Fisher Scientific; Cat # 15-242B)
- 3.17 1 ml Tuberculin Syringe with Slip Tip (VWR; Cat # BD309602)
- 3.18 Aluminum Foil
- 3.19 1M DL-Dithiothreitol solution (DTT) (Sigma; Cat# 43816)

Continua

ANEXO 3 - CONTINUAÇÃO

THE INSTITUTE FOR GENOMIC RESEARCH		
TITLE: HYBRIDIZATION OF LABELED DNA AND CDNA PROBES		
SOP #: M008	REVISION LEVEL: 2.1	PAGE: 2 of 7

* UV and Carbon filtered MQ water (NANOpure Infinity UV; Model D8971) may be used as an alternative to DI water. However, water must be completely filtered to eliminate any residual free radicals. Free radicals compete with Cy dyes, drastically inhibiting efficient coupling and hybridization.

4. EQUIPMENT REQUIRED

4.1 You will need the following instruments for this procedure:

42°C and 55°C water bath
 Rotary shaker
 Centrifuge with a flat 4-plate adaptor
 95°C heat block
 Microfuge tube centrifuge
 Clean compressed air
 Microfuge slide centrifuge

4.2 You will need to have or make the following buffers and reagents before beginning this procedure:

Low Stringency Wash Solution
 (2x SSC, 0.1% SDS) (Heat to 55°C)
 20x SSC 100 mL
 10% SDS 10 mL
 MilliQ/DI water 890 mL
 Total Volume 1 L

Medium Stringency Wash Solution
 (0.1x SSC, 0.1% SDS)
 20x SSC 5 mL
 10% SDS 10 mL
 MilliQ/DI water 985 mL
 Total Volume 1 L

High Stringency Wash Solution
 (0.1x SSC)
 20x SSC 5 mL
 MilliQ/DI water 995 mL
 Total Volume 1 L

100 mM DTT
 1M DTT 10 mL
 MilliQ/DI water 90 mL
 Total Volume 100 mL

Continuação

ANEXO 3 - CONTINUAÇÃO

THE INSTITUTE FOR GENOMIC RESEARCH		
TITLE: HYBRIDIZATION OF LABELED DNA AND CDNA PROBES		
SOP #: M008	REVISION LEVEL: 2.1	PAGE: 3 of 7

5. PROCEDURE

5.1 Prehybridization

5.1.1 Prepare the prehybridization solution

- Prepare 50 ml prehybridization buffer for every 5 slides:

(5x SSC, 0.1% SDS, 1% BSA)

Recipe:	Amount
20x SSC	12.5 mL
10% SDS	500 µL
BSA powder	0.5 gm
MilliQ/DI water	37 mL
Total Volume	50 mL

- Filter the prehybridization buffer with a 0.22 µm Mini-Miser (CA) Filter.
- Transfer the solution to a clean Coplin jar and preheat the buffer at 42°C for approximately 10 minutes.

5.1.2 Prehybridize the array slide

Note: It is extremely important that slides be perfectly clean or else you may have background problems. Try not to scratch or touch the printed area! Don't let the slides dry out at any time! Wear Gloves.

- Place the printed slide(s) with their labels up in a Coplin jar containing preheated prehybridization buffer. (no more than 5 slides per jar)
- Incubate at 42°C for at least an hour.

5.1.3 Washing Prehybridized Slides

- Following the prehybridization, remove slides from 42°C waterbath. Pour out the prehybridization buffer, being careful not to pour the slides out as well.
- Quickly fill the Coplin jar with MilliQ/DI water and replace the cap.
- Carefully shake the Coplin jar for approximately 30 seconds to remove the prehybridization buffer from the slides.
- Pour out the water and repeat the procedure approximately five times or until suds can no longer be seen in the water.
- Fill a glass staining dish with MilliQ/DI water for every 5 slides needing to be washed.

Continuação

ANEXO 3 - CONTINUAÇÃO

THE INSTITUTE FOR GENOMIC RESEARCH		
TITLE: HYBRIDIZATION OF LABELED DNA AND CDNA PROBES		
SOP #: M008	REVISION LEVEL: 2.1	PAGE: 4 of 7

- Using forceps *carefully* grip the slides by the label and then remove the slides from the Coplin jar. Place them in the slide holder for a glass staining dish. *No more than 5 slides should be used per holder. Don't place slides in the first or last slot of the holder and do not put slides together so that they touch.*
- Attach the metal handle to the slide holder and place the glass holder with the slides inside the staining dish.
- Place the entire staining dish apparatus on top of a rotor shaker and let shake for about 2 minutes.
- Change the water inside the staining dish every 2 minutes. Continue to wash until you have used ~2 liters total of wash water (including the water used in the Coplin jars).
- Empty the staining dish and fill with isopropyl alcohol.
- Wash in the isopropyl alcohol for two minutes on the rotary shaker.
- When done, leave the slides in the isopropyl alcohol and take them immediately to the centrifuge.

5.1.4 Drying Slides

Note: *DO NOT let the slides start to dry before putting them in the centrifuge. Allowing the slides to slowly air dry will cause background to appear on the slide.*

- Take the glass slide holder with the slides out of the isopropyl alcohol and remove the metal handle from the holder. Put the slides into a centrifuge with a flat plate-holder adaptor lined with paper towels. Place another slider holder with the same number of slides as a counterbalance. Make sure the centrifuge is clean inside. Make sure the centrifuge is at room temperature before centrifuging.
- Centrifuge the slides at ~1000 RPM's for at least 10 minutes at room temperature.
- Hold slides up to the light to check for any degree of streaking or spots. If any of these appear the slides must be re-washed and re-spun.

Note: *Slides should be used immediately following prehybridization to ensure optimal hybridization efficiency. Prehybridized slides cannot be stored for later use.*

Continuação

ANEXO 3 - CONTINUAÇÃO

THE INSTITUTE FOR GENOMIC RESEARCH		
TITLE: HYBRIDIZATION OF LABELED DNA AND CDNA PROBES		
SOP #: M008	REVISION LEVEL: 2.1	PAGE: 5 of 7

5.2 Hybridization

5.2.1 Making the hybridization buffer

* Note: Gene expression hybridizations involving probes generated from RNA require a hybridization buffer containing 40% formamide. Comparative genome hybridizations involving probes generated from genomic DNA require a hybridization buffer containing 50% formamide. **To maintain proper specificity during the hybridization, it is important not to alter these conditions.**

- Prepare the following 1X hybridization buffer fresh for every 5 slides.

Genomic DNA Hybridizations (40% formamide, 2x SSC, 0.1% SDS, 0.6 µg/ml Salmon Sperm DNA)

Recipe:	Amount
Formamide	500 µl
20x SSC	250 µl
10% SDS	10 µl
0.1 M DTT	1 µl
DL water	239 µl
Total Volume	1 mL

Gene Expression (RNA) Hybridizations (40% formamide, 2x SSC, 0.1% SDS, 0.6 µg/ml Salmon Sperm DNA)

Recipe:	Amount
Formamide	400 µl
20x SSC	250 µl
10% SDS	10 µl
0.1 M DTT	1 µl
DL water	339 µl
Total Volume	1 mL

- Using a 1 mL syringe, draw up the hybridization solution and filter it through a 0.45 µm filter
- Add 60 µl of Salmon Sperm DNA.
- Set the hybridization solution aside at room temperature until later use.

5.2.2 Preparing the probe for hybridization

- Add 50 µL of 1X hybridization buffer to the previously prepared Cy3/Cy5 probe mixture (see SOP-M007/M009). Don't throw away excess hybridization solution.
- Resuspend the probe by vortexing.
- Heat the mixture at 95°C for 5 minutes.
- Vortex probe and heat the probe mixture again at 95°C for another 5 minutes.

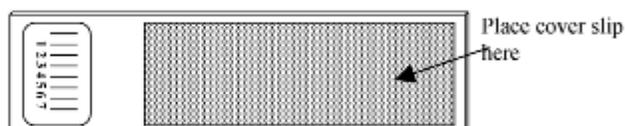
Continuação

ANEXO 3 - CONTINUAÇÃO

THE INSTITUTE FOR GENOMIC RESEARCH		
TITLE: HYBRIDIZATION OF LABELED DNA AND CDNA PROBES		
SOP #: M008	REVISION LEVEL: 2.1	PAGE: 6 of 7

5.2.3 Apply Labeled Probe Mixture to array

- Place a prehybridized microarray slide (array side up) between the two plastic teeth in the bottom half of a hybridization chamber (*the side with the rubber gasket*).
- Dust a clean LifterSlip with compressed air, and place it over the array printed area of the slide. Ensure that the elevated side of the LifterSlip faces down (touching the slide).*



- Slowly pipette the entire labeled probe mixture (~50 μ L) onto the lower edge of the LifterSlip. Ensure sample distributes evenly under cover slip. Remove any bubbles if necessary.

* While LifterSlips are recommended to prevent air bubbles and ensure proper diffusion of the sample over the slide, standard 24mm x 60mm microscope glass coverslips can also be used.

5.2.4 Slide Incubation

- Add 15 μ L of unused hybridization solution to the small wells at each end of the chamber. *This step is to prevent the sample from drying under the cover slip.*
- Place the top of the chamber on and seal it with the two metal edge bars.
- Wrap the chamber in foil and incubate in a 42°C water bath for 16-20 hours.

Note: Do not tilt or flip the slide chamber once the chamber is sealed with the slide inside.

5.2.5 Post-Hybridization Washes

Note: At this point all the staining dishes used should be covered in aluminum foil to prevent light exposure. Do not let the slides dry out at any time! The probe will streak the surface causing background problems if the slides dry.

Continuação

ANEXO 3 - CONTINUAÇÃO

THE INSTITUTE FOR GENOMIC RESEARCH		
TITLE: HYBRIDIZATION OF LABELED DNA AND CDNA PROBES		
SOP #: M008	REVISION LEVEL: 2.1	PAGE: 7 of 7

- Preheat the low stringency buffer to 55°C before use.
- Prior to beginning the post-hybridization washes, add 1 mL of 100 mM DTT to 1 L of each of the wash buffers.
- After the incubation in step 5.2.4, remove foil and unseal hybridization chamber. Remove the slide from the chamber, taking care not to disturb the cover slip.
- Fill a Pyrex glass dish about half full with low stringency buffer that has been warmed to 55°C.
- To remove the coverslip grab the slide label with forceps (*or gloved fingertips if the forceps prove difficult*) and submerge it in the buffer. Shake the slide to loosen the coverslip. With time the coverslip will slide free of the slide surface. Continue to wash the slide vigorously for about an additional minute once the cover slip has been removed. *Be careful not to scratch the slide surface with the cover slip.*
- Change the low stringency buffer in the Pyrex dish for every 5 slides washed.
- As the cover slips are removed, place every 5 slides in a glass slide holder. The slides should be spread out so they do not touch each other or the sides of the holder (as above).
- Submerge the slide holder(s) into staining dish(s) containing **low stringency** wash buffer (preheated to 55°C)
- Agitate on a rotary shaker for 5 minutes.
- After the 5 minutes, transfer the slides to a dish with new **low stringency** buffer (preheated to 55°C). Agitate an additional 5 minutes.
- After the 5 minutes, transfer the slides to a dish with **medium stringency** buffer at room temperature and agitate 5 minutes.
- After the 5 minutes, transfer the slides to a dish with new **medium stringency** buffer at room temperature. Agitate an additional 5 minutes.
- After the 5 minutes, transfer the slides to a dish with **high stringency** buffer at room temperature and agitate 5 minutes.
- After the 5 minutes, transfer the slides to a dish with new **high stringency** buffer at room temperature and agitate another 5 minutes.
- After the 5 minutes, keep slides in the **high stringency buffer** (with DTT) until ready for scanning.
- Dip one slide at a time several times in a dish containing clean MilliQ/DI water.
- Dry the slide in a mini-slide centrifuge for approximately one minute. Ensure slide is completely dry before scanning.
- Scan slide noting that the top of the print area begins on the part of the slide farthest from the barcode. A properly scanned slide, therefore, should have a legible barcode at the bottom of the scanned area.

Conclusão

ANEXO 4

Os dados totais (brutos) dos ensaios de *microarray* foram disponibilizados de acordo com o padrão MIAME (Brazma *et al.*, 2001) no sítio *Bioinformatics Resource for Oral Pathogens*, mantido pelo *The Forsyth Institute*.

Os experimentos para o mutante *vick*- podem ser visualizados pelo atalho <http://www.brop.org/idn:12496045393872>

Já os experimentos para o mutante *covR*- podem ser visualizados pelo atalho <http://www.brop.org/idn:12496187486126>

ANEXO 5

Custom Immunology Services Polyclonal Protocols

Sample Protocols using Protein Immunogens

Animal	Antigen Required	Estimated Serum Volume*
Rabbit Protein, 77 Day	625 µg	90 mL
http://www.covance.com/abservices/ab_rabbit_protein_77.php		

Custom Immunology Services Sample Polyclonal Protocols

Rabbit Protein Protocol, 77 Day

Day	Procedure
0	NZW Female Rabbit Pre-bleed (Avg. 5mL serum) 1°SC: 250 µg with FCA
21	Boost SC: 125 µg with FIA
42	Boost SC: 125 µg with FIA
52	Production Bleed (Avg. 20 mL serum)
53-60	ELISA Titer Assay of Bleed*
59	Production Bleed (Avg. 20 mL serum)
70	Boost SC: 125 µg with FIA
77	Project Completion** (Avg. 50mL serum)
78-84	ELISA Titer Assay of Bleed*

**contact us for further details regarding project completion

Total material required for injection for the above program is 0.625 µg/animal. If we are conjugating your peptide we assume a 20% loss of peptide during conjugation. Total amount of serum expected from a rabbit on the above protocol is approximately 90 mL. Immunogen is emulsified in Freund's Complete Adjuvant (FCA) for initial injections. Freund's Incomplete Adjuvant (FIA) is used for all subsequent injections (boosts). Projects follow a three-week cycle of boosts. Test bleeds are taken approximately 10 days after the boosts.

***Optional ELISA:** We suggest testing the first bleed of the project to evaluate the effect of antigen on the animal. Information gained from an ELISA at this point will provide an opportunity for you to make adjustments to your immunization schedule. Additional ELISA's performed later in the project will give you valuable information that can be used to determine which sera samples to include in your research or which bleeds you would like to have purified.

AAALAC International Accredited, GLP Studies, OLAW Assured, USDA Research Registered