

INVESTIGAÇÃO DA FUNÇÃO DA PROTEÍNA FIMX NA DIVISÃO CELULAR DA BACTÉRIA *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Barbara Macarini Leite; Giuliana Ágata dos Santos Durynek

Alzira Frota Marreiros Bezerra, Pedro Bonato Araujo

Regina Lúcia Baldini

Instituto de Química - Universidade de São Paulo

barbara_mleite@usp.br

Objetivos

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo Gram-negativo capaz de colonizar diversos ambientes, e que se apresenta como um patógeno oportunista em humanos, estabelecendo principalmente infecções pulmonares em pacientes com fibrose cística (FC)¹. Um importante fator de virulência dessa gama-proteobactéria é o pilus tipo IV (T4P), uma estrutura filamentosa responsável pela adesão celular e a motilidade *twitching*. Dentre os reguladores dessa estrutura encontra-se a proteína FimX, essencial para a extensão do pilus². Resultados preliminares de nosso laboratório com mutantes $\Delta fimX$, apresentaram diferenças expressivas em relação à literatura, com alterações no processo de divisão celular. Dessa maneira, objetiva-se com este projeto a complementação do mutante para o estudo do papel de FimX na divisão celular da *P. aeruginosa*, bem como a compreensão de sua influência na localização polar da diguanilato ciclase DgcP.

Métodos e Procedimentos

Foi utilizada a base de dados *Pseudomonas* Genome Database³ para a obtenção da sequência do operon onde se encontra o gene *fimX*. A construção para a complementação e

as sequências dos *primers* foram planejadas com a ferramenta NEBuilder. A região codificadora de *fimX* e o promotor do operon *fimWX* foram amplificadas por PCR a partir do DNA genômico da linhagem selvagem PA14. Os produtos de PCR obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose e purificados com o auxílio do kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System*, da Promega. Para a clonagem, foi utilizado o método SLIC (*Sequence and Ligation-Independent Cloning*)⁴ e o sequenciamento será feito a partir do método de Sanger. O vetor utilizado na construção foi o mini-CTX1⁵, que apresenta como marcador de seleção um gene de resistência à tetraciclina. A clonagem foi feita em células de *E. coli* DH5 α , e a confirmação foi realizada a partir de digestão com as enzimas *SacI* e *HindIII* dos plasmídeos extraídos de colônias selecionadas em placas de LB adicionadas de tetraciclina.

Por fim, a complementação das linhagens $\Delta fimX$ e $\Delta fimX/DgcP$ -GFP será feita por conjugação com bactérias *E. coli* S17 carregando o plasmídeo, que integra-se em cópia única no cromossomo das células receptoras.

Para o estudo dos fenótipos associados a FimX, ensaios comparativos entre a linhagem mutante e a complementada serão realizados, dentre eles: ensaios de motilidade (*twitching*, *swarming* e *swimming*), formação de biofilme,

curvas de crescimento e viabilidade, e microscopia de fluorescência para a localização da diguanilato ciclase DgcP.

Resultados

Diversas enzimas foram testadas para a obtenção dos fragmentos do promotor (740 bp) e da região codificadora de *fimX* (2200 bp). Para o promotor, foi utilizada a enzima Q5 High-Fidelity DNA Polymerase, com 35 ciclos a 98 °C por 10 s, 72 °C por 30 s e 72 °C por 22 s; e para a região codificadora foi utilizada a enzima PCR BIO VeriFi Polymerase, com 35 ciclos a 98 °C por 15 s, 72 °C por 15 s e 72 °C por 1min06s.

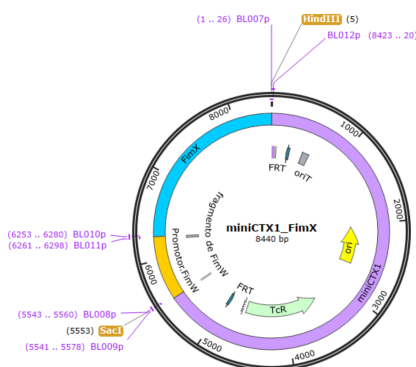


Figura 1. Construção do plasmídeo mini-CTX1. Em azul, o inserto do gene *fimX* e em amarelo o seu promotor. Esquema obtido com o programa SnapGene.

A confirmação da clonagem se deu a partir da digestão dos plasmídeos extraídos com as enzimas SacI e HindIII, seguida de análise por eletroforese de gel de agarose.

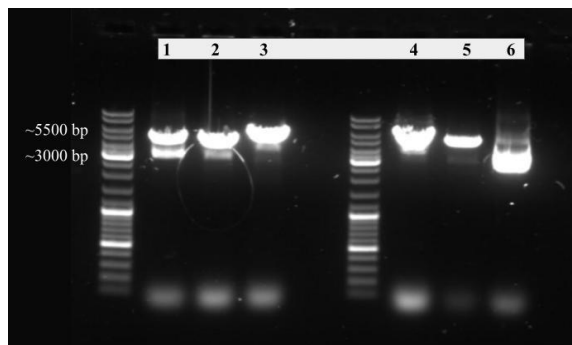


Figura 2. Gel de agarose da confirmação da clonagem. A amostra 1 apresentou duas bandas correspondentes ao padrão esperado para a digestão de plasmídeos clonados e, portanto, representa resultado positivo.

Conclusões

A clonagem do gene *fimX* e seu respectivo promotor no vetor mini-CTX1 foi obtida com sucesso - e sua sequência está sendo confirmada.

Em seguida, será realizada a complementação dos mutantes e, como descrito anteriormente, serão realizados ensaios de Bioquímica e Microbiologia para o estudo dos fenótipos associados a FimX.

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

A primeira autora realizou a clonagem e será responsável pela continuação do trabalho. A segunda autora preparou os mutantes $\Delta fimX$ e obteve os resultados preliminares que serviram de base a este projeto. Todas as autoras aprovaram a versão final do resumo.

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado graças à cooperação do grupo CEPID B3 e ao financiamento da FAPESP, projeto 2025/06540-4.

Referências

1. Lyczack, J. B.; Cannon, C. L.; Gerald, B. P. **Microbes and Infections**, v. 2, p. 1051-1060, 2000.
2. Jain, R.; Sliusarenko, O.; Kazmierczak, B. I. **PLoS Pathog.**, 2017.
3. Winsor, G. L., et. al. **Nucleic Acids Res**, v. 44, p. 646-653, 2016.
4. Jeong, J. Y. et. al. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 78, n. 15, p. 5440-5443, 2012.
5. Hoang, T. T. et. al. **Plasmid**, v. 43, n. 1, p. 59-72, 2000.