
TÍTULO

Caracterização funcional e estrutural de reguladores da formação de biofilme.

ORIENTAÇÃO

Mónica Serrano/Tiago Cordeiro

Telefone: 214469524 Email: serrano@itqb.unl.pt ou tiago.cordeiro@itqb.unl.pt

RESUMO

A formação de biofilmes é um exemplo de comportamento social em bactérias. Os biofilmes são formados por sub-populações de diferentes tipos celulares diferenciados, envolvidas por uma matriz composta por proteínas, exopolissacáridos e DNA. Este tipo de organização permite às bactérias exercerem uma forma mais robusta de influência sobre o ambiente circundante, em comparação com células individualizadas. Em anos recentes, demonstrou-se que os biofilmes são um aspecto importante da persistência de determinados organismos no tracto gastro-intestinal humano. Muitas bactérias do filo Firmicutes são membros da microbiota humana. Enquanto que algumas bactérias capazes de diferenciarem esporos encontradas ao nível do intestino são não patogénicas, como *Bacillus subtilis*, outras causam diversas doenças intestinais severas. Um exemplo deste último grupo é *Clostridium difficile*, o principal agente de doença intestinal nosocomial associada ao uso de antibióticos em adultos. Um dos aspectos importantes da doença causada por *C. difficile*, é a elevada taxa de recorrência, que normalmente é atribuída à persistência de esporos. No entanto, não é claro se este organismo persiste no tracto gastro-intestinal na forma de esporos ou na forma de biofilmes, porque ambas as formas são resistentes aos antibióticos.

A regulação transcricional que controla a formação de biofilme em *B. subtilis*, embora complexa, é bem conhecida. Existem reguladores transcricionais globais que controlam a passagem da fase exponencial de crescimento para a estacionária. Outros reguladores são específicos da formação do biofilme, como é o caso do Veg e do RemA. Os genes que codificam para estes dois reguladores são muito conservados no filo dos Firmicutes. Em *Bacillus subtilis*, Veg e RemA estão envolvidos no control da expressão dos genes que codificam para os componentes da matriz. Ambos os genes codificam para proteínas pequenas: RemA tem 89 aminoácidos e é uma proteína de ligação ao DNA sem homologia estrutural a outras proteínas; e Veg tem 86 aminoácidos e um domínio Sm, normalmente presente em proteínas de ligação ao RNA. Neste projecto propomos a caracterização funcional destes dois reguladores a nível genético, bioquímico e estrutural.

Sendo RemA e Veg proteínas conservadas entre Firmicutes, este trabalho irá ter impacto não só ao nível da saúde humana, onde as bactérias esporulantes são uma das maiores causas de infecções nosocomiais (adquiridas no hospital) associadas a terapias com antibióticos, mas também na indústria alimentar onde

os biofilmes formados por bactérias do grupo do *B. cereus* constituem um risco de diminuição da qualidade e segurança alimentares.

Metodologias:

Biologia Molecular: construção de fusões transcricionais e traducionais a genes repórteres fluorescente

Genética: construção de mutantes por recombinação homóloga em *B. subtilis*

Microbiologia: caracterização fenotípica de mutantes; ensaios de ligação de violeta cristal para teste de formação de biofilmes; avaliação do título de esporos resistentes ao calor

Biologia Celular: microscopia de fluorescência quantitativa para caracterizar padrões espaço-temporais de expressão ao nível da célula individual, na população celular; e em colónias; localização sub-celular de proteínas durante a diferenciação de biofilmes

Bioquímicas: cromatografia de afinidade, e cromatografia de exclusão molecular para purificar proteínas isotopicamente marcadas, seja com ^{15}N ou $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$, obtidas por expressão recombinante. Utilização da RMN para obter informação estrutural.

DURAÇÃO

Cerca de 9 meses em tempo integral.

LOCAL DE REALIZAÇÃO

O Projecto decorrerá no Laboratório de Desenvolvimento Microbiano e no Laboratório Biologia Estrutural Dinâmica do ITQB NOVA, em Oeiras.

NÚMERO DE ALUNOS

1

MÉTODO DE SELECÇÃO

Análise curricular, seguida de entrevista.