Anita Martins Fontes Del Guercio

Caracterização cinética do fator de transcrição
do sistema Ohr/OhrR de *Pseudomonas*
aeruginosa e análise de respostas fenotípicas e
imunológicas

Kinetic characterization of the transcriptional
factor of the Ohr/OhrR system from
Pseudomonas aeruginosa and phenotypic and
immunologic responses

São Paulo

2019

Anita Martins Fontes Del Guercio

Caracterização cinética do fator de transcrição
do sistema Ohr/OhrR de *Pseudomonas*
aeruginosa e análise de respostas fenotípicas e
imunológicas

Kinetic characterization of the transcriptional
factor of Ohr/OhrR system from *Pseudomonas*
aeruginosa and phenotypic and immunologic
responses

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências, na Área de
Biologia/Genética.

Orientador(a): Prof. Dr. Luis Eduardo
Soares Netto

São Paulo

2019

Resumo

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria oportunista de ampla distribuição e que infecta principalmente pacientes acometidos por fibrose cística, pneumonia ou com doenças respiratórias pré-existentes, sendo grande responsável por mortes em UTIs em todo o mundo. Entretanto, os mecanismos de ação envolvidos na determinação da virulência desse microrganismo ainda não estão completamente elucidados. A peroxidase Ohr e seu regulador transcricional OhrR, das famílias Ohr/OsmC e MarR (*Multiple antibiotic resistance Regulator*), respectivamente, estão envolvidos na defesa antioxidante de bactérias a peróxidos orgânicos e peroxinitrito. No presente trabalho foram investigadas as ações de Ohr e OhrR em interações patógeno-hospedeiro por meio de um modelo de infecção pulmonar aguda em camundongos pela linhagem PA14 de *P. aeruginosa*, bem como pelos mutantes simples (Δohr e $\Delta ohrR$) e o duplo mutante ($\Delta ohr/\Delta ohrR$). Foram construídas linhagens mutantes apolares por recombinação homóloga e a verificação fenotípica ocorreu por meio dos testes de Kirby-bauer e MIC (*Minimal Inhibitory Concentration*), confirmando maior sensibilidade das mutantes Δohr e $ohr/\Delta ohrR$ quando desafiadas por hidroperóxidos orgânicos em relação à selvagem. Inicialmente, as curvas de sobrevivência de camundongos infectados pelas diferentes linhagens foram determinadas. Não houve diferenças estatísticas significativas entre as linhagens, mas os camundongos infectados pela linhagem $\Delta ohrR$ demonstraram maior capacidade de sobrevivência, sugerindo a participação de OhrR na virulência da bactéria. Ao mesmo tempo, observamos a morte precoce de camundongos infectados pela linhagem Δohr , apontando que a ausência de Ohr poderia estar interferindo de maneira negativa para o hospedeiro. A baixa virulência da linhagem $\Delta ohrR$ foi um resultado surpreendente, uma vez que a expressão da peroxidase Ohr está aumentada nesses casos. Também foi inesperado o fato da linhagem Δohr provocar mortes precoces. Diversos parâmetros relacionados à resposta inflamatória de camundongos à infecção pelas distintas linhagens de *P. aeruginosa* foram analisados. Interessantemente, os camundongos infectados pelas linhagens Δohr e $\Delta ohr/\Delta ohrR$ apresentaram maior recrutamento de neutrófilos de forma significativa em relação à linhagem selvagem. Os níveis de IL-1 β e TNF- α nos pulmões de camundongos infectados pela linhagem Δohr foram maiores do que na linhagem selvagem, embora os valores só tenham sido significativos no primeiro caso. Em geral, os níveis de citocinas foram sempre maiores nos pulmões de camundongos infectados com as linhagens mutantes do que com a linhagem selvagem, embora em muitos casos sem significância estatística. O maior recrutamento de neutrófilos e os maiores níveis de citocinas nos pulmões de camundongos infectados pela linhagem Δohr são sugestivos de resposta inflamatória mais intensa. As análises de citocina dos demais órgãos (fígado e baço), bem como a análise de CFU, não apontaram diferenças estatísticas entre as linhagens, o que é coerente com o fato de *P. aeruginosa* ser um patógeno que infecta pulmões. Uma outra linha de investigação dessa tese envolveu análises bioquímicas e cinéticas de OhrR recombinante de *P. aeruginosa* (PaOhrR), já que esse fator de transcrição é considerado o sensor bacteriano de peróxidos orgânicos. As reações de PaOhrR com hidroperóxidos orgânicos foram avaliadas por meio da fluorescência

intrínseca de triptofano usando fluorímetro acoplado a equipamento de mistura rápida com fluxo interrompido (*Stopped Flow*). Dessa forma, as reações de PaOhrR com hidroperóxidos derivados de ácidos graxos procedeu com constantes de velocidade na ordem de $10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. De maneira semelhante, obtivemos valores na ordem de $10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para reações com peroxinitrito. Ao mesmo tempo, confirmou-se a baixa reatividade entre PaOhrR e H_2O_2 , com constantes de velocidade na ordem de $10^1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Também construímos mutantes individuais das três cisteínas presentes em PaOhrR, e assim pudemos determinar que Cys19 é a cisteína catalítica e Cys 121 é a cisteína de resolução. Esses resultados foram confirmados por meio de ensaios cinéticos e de SDS-PAGE não redutor. Isso era esperado, já que esses resíduos são conservados entre várias proteínas OhrR. As constantes de velocidade de oxidação de OhrR de *C. violaceum* (CvOhrR), também investigadas nessa tese, foram bastante semelhantes às constantes de PaOhrR. As constantes cinéticas de oxidação de CvOhrR por hidroperóxidos orgânicos artificiais e derivados de ácidos graxos situaram-se na ordem de $10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e $10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, respectivamente, portanto, valores similares aos obtidos por PaOhrR. Também determinamos a constante cinética de redução de CvOhrR por tiorredoxina de *C. violaceum* (CvTrxA), resultando em valores da ordem de $10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Em geral, as constantes de reação dos fatores de transcrição OhrR estudados nessa tese, estão de duas a três ordens de grandeza menores do que valores correspondentes para Ohr, determinados previamente por nosso grupo. Esses resultados estão de acordo com a proposição de que OhrR teria um papel na percepção de hidroperóxidos orgânicos, enquanto Ohr teria a função de decompor esses oxidantes. Portanto, os resultados obtidos nesta tese contribuíram para o melhor entendimento dos papéis do sistema Ohr-OhrR na resposta bacteriana a peróxidos orgânicos e possivelmente na compreensão de mecanismos de virulência de *P. aeruginosa*.

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen of widespread distribution that infects especially patients with cystic fibrosis, pneumonia or with pre-existing respiratory diseases, hence being a major cause of death in intensive care units worldwide. Nevertheless, the mechanisms involved in the virulence determination of this microorganism are still elusive. The peroxidase Ohr and its transcriptional regulator OhrR, from Ohr/OsmC and MarR (Multiple antibiotic resistance Regulator) families, respectively, are involved in the antioxidant defense in bacteria against organic hydroperoxides and peroxyxynitrite. In this research, we investigated the actions of Ohr and OhrR in host-pathogen interactions, using the acute pulmonary infection model in mice with the wild type strain PA14 of *P. aeruginosa*, as well as with the single mutants (Δohr and $\Delta ohrR$) and the double mutant ($\Delta ohr/\Delta ohrR$). Nonpolar strains were obtained by homologous recombination and the phenotypic verification was checked by the Kirby-bauer and MIC (*Minimal Inhibitory Concentration*) tests, confirming higher sensibility of Δohr and $ohr/\Delta ohrR$ mutants, when challenged by organic hydroperoxides and compared to the wild type (WT) strain. Initially the survival curves of mice infected with the different strains were determined. There were no significant statistical differences among strains, but the mice infected by the $\Delta ohrR$ strain showed higher survival rates, suggesting the participation of OhrR in the bacterial virulence. At the same time, we observed the early death of mice infected by the Δohr strain showing that the lack of Ohr could be negatively interfering with the host. The low virulence of the $\Delta ohrR$ strain was a surprising result as the Ohr peroxidase is higher in these cases. It was also surprising the fact that the Δohr strain causes early deaths. Many parameters related to inflammatory response of mice to the infection by the strains of *P. aeruginosa* were analyzed. Interestingly enough, the mice infected by the strains Δohr and $\Delta ohr/\Delta ohrR$ showed significantly higher recruitment of neutrophils compared to the wild type strain. The levels of IL-1 β and TNF- α were higher in the lungs of mice infected with Δohr in comparison to the WT strain, although only the first case showed statistical significance. In general, the cytokine levels in the lungs of mice infected with the single and double mutant strains were higher, but in many cases with no statistical significance. The higher neutrophils recruitment and higher levels of cytokines suggested higher inflammatory response caused by the Δohr strain infection. The analysis of cytokines in the other organs (liver and spleen) as well as CFU analysis did not show statistical differences among strains which is coherent with the fact that *P. aeruginosa* is a lung pathogen. Another field of investigation of this thesis involved biochemical and kinetic analysis of the recombinant OhrR from *P. aeruginosa* (PaOhrR), as this transcription factor is considered the bacterial sensor for organic hydroperoxides. The reactions of PaOhrR with organic hydroperoxides were evaluated by the intrinsic fluorescence of tryptophan, using a fluorimeter attached to a stopped flow device. The rate constants of the reactions

between PaOhrR and fatty acid hydroperoxides were in the order of $10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, while rate constants for the reaction of PaOhrR with peroxyxynitrite were within the $10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ range. In contrast, the reactivity of PaOhrR to H_2O_2 was very low (in the order of $10^1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). We also obtained mutant proteins in which each one of the three cysteines of PaOhrR were individually replaced by Ser residues, which enabled us to determine that Cys19 is the catalytic cysteine and Cys121 is the resolution cysteine. These results were confirmed by kinetic and non-reducing SDS-PAGE assays. These results were expected, as Cys19 and Cys121 residues are conserved across many OhrR proteins. The rate constants for the oxidation of OhrR from *C. violaceum* (CvOhrR), also investigated here, were very similar to the rate constants determined for PaOhrR. The rate constants for the oxidation of CvOhrR by artificial organic hydroperoxides and fatty acids derivatives were in the order of $10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ and $10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, respectively, again similar to the values obtained for PaOhrR. We also determined the rate constant of CvOhrR reduction by thioredoxin from *C. violaceum* (CvTrxA), resulting in values in the order of $10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. In general the rate constants of the OhrR transcription factors studied in this thesis are from two to three orders of magnitude lower than the values corresponding to Ohr, previously determined by our research group. These results are in accordance with the proposition that OhrR would have a role in organic hydroperoxides perception while Ohr would be responsible for decomposing these oxidants. Hence, the results obtained in this thesis have contributed to a better understanding of the roles in the Ohr-OhrR system in the bacterial response to organic hydroperoxides and, possibly, in the comprehension of the mechanisms underlying *P. aeruginosa* virulence.

1. Introdução

1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

O gênero *Pseudomonas* abriga mais de 200 espécies e seu nome deriva de ‘pseudes’ (falso) e ‘monas’ (uma unidade) e foi proposto para designar um gênero de bactérias não esporulantes, em forma de bastão, com flagelo(s) em um dos polos. *Pseudomonas aeruginosa* é uma proteobactéria, Gram-negativa, pertencente ao grupo gama com virulência comprovada em indivíduos filogeneticamente distintos^{1,2}. Apresenta ampla distribuição e caráter oportunista, podendo ser encontrada em praticamente todos os ambientes e em associação com plantas ou animais. Sua grande capacidade de adaptação permite que sobreviva tanto em meios naturais quanto em condições de hipóxia em ambiente hospitalar.

A versatilidade desse patógeno é dada, dentre outros fatores, pela capacidade de utilização de um amplo espectro de nutrientes para sobreviver³ (Figura 1), fazendo com que possa ser encontrado vivendo em ralos e pias de hospitais e, até mesmo, em soluções desinfetantes⁴. Apresenta proteínas que atuam como fatores de virulência através de diferentes mecanismos regulatórios e são capazes de lidar de maneira excepcional com fatores de estresse endógeno e exógeno, permitindo sua adaptação a ambientes bastante hostis⁵. É capaz de sintetizar diferentes compostos bioativos³, e é intrinsecamente resistente a muitos antibióticos, podendo adquirir resistência a tantos outros, tornando os tratamentos muito difíceis⁴.

Figura 1. Distribuição do gênero *Pseudomonas*. Esquema representativo de onde podem ser encontradas bactérias do gênero *Pseudomonas* com destaque para *P. aeruginosa* com ação patogênica humana. Adaptado de³.

Esse patógeno é importante causa de infecções humanas, principalmente em pacientes debilitados e/ou com sistema imunológico deficiente. Foram observadas bacteremia em vítimas de queimadura, contaminação de pacientes acometidos por pneumonia e infecções hospitalares ⁶. Apresenta também expressiva participação na morbidade e mortalidade em pacientes acometidos por fibrose cística ⁷ pois, não raro, apresenta resistência a antibióticos ⁶. Casos de infecção ocular também são relatados ⁸. *Pseudomonas aeruginosa* está entre as maiores causas de infecção hospitalar no Brasil e no mundo ⁹. Além disso, esse patógeno está dentro da classe dos chamados "superbugs" pois são bactérias multirresistentes aos antibióticos disponíveis ¹⁰.

A maioria das linhagens de *P. aeruginosa* produz um ou mais pigmentos, incluindo piocianina (azul-verde), pioverdina (amarelo-verde fluorescente) (Figura 2) e piorrubina (vermelho-marrom). Trabalhos apontam que as piocianinas não só contribuem para a persistência da bactéria nos pulmões de pacientes acometidos por fibrose cística mas também interferem em funções celulares de outros mamíferos; entretanto, o mecanismo utilizado por elas ainda não foi elucidado ¹¹.

Após a entrada do patógeno no hospedeiro, pode ocorrer a colonização do epitélio respiratório de indivíduos em condições de pré-disposição, como pacientes com fibrose cística, ventilação mecânica, imunodeficientes ou com doenças respiratórias pré-existentes ⁵. A movimentação de *Pseudomonas aeruginosa* no epitélio se dá por meio do flagelo e do *pilli*; entretanto, particularmente em casos de pacientes com fibrose cística, a bactéria pode perder ambas as estruturas locomotoras, formando um biofilme ^{5,6}. Biofilmes mostram alta tolerância a antibióticos e ao sistema imune do hospedeiro. Para *P. aeruginosa*, biofilmes formados em pulmões de pacientes portadores de fibrose cística resulta em resistência pois a superfície aderente das células fica protegida por uma matriz extracelular ¹² e, credita-se a isso, a maior causa de morte nesses casos ¹¹.

Figura 2. Coloração de *P. aeruginosa*-PA14. Cultura em meio líquido das linhagens PA14 (WT), Δohr e $\Delta ohrR$. A coloração das colônias sugere que produção de piocianina e pioverdina não é alterada nas linhagens mutantes.

1.2. Interação de *Pseudomonas aeruginosa* com o hospedeiro

A interação patógeno-hospedeiro nem sempre resulta em doença. O resultado depende da interação inicial, que pode ser: comensalismo, colonização, persistência e, finalmente, infecção, resultando em prejuízos para o hospedeiro ¹².

O sistema imune inato de um hospedeiro está programado para responder ao contato com um patógeno, mas a reação a diferentes infecções requer tempo para a geração de uma resposta específica. Células do sistema imune geram oxidantes contra microrganismos patogênicos e podem causar danos a ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos do invasor ¹³. Nosso sistema imune apresenta diferentes mecanismos de atuação que promovem a eliminação rápida e eficiente de bactérias. A fagocitose, por exemplo, pode acontecer e a digestão da bactéria se dá em apenas alguns minutos ¹⁴.

Neutrófilos são as células mais abundantes de nosso sistema imune, correspondendo entre 50% e 70% de nossos leucócitos. Os neutrófilos são células do sistema imune inato que colocam-se na linha de frente em casos de infecções bacterianas, fagocitando e gerando um *burst* oxidativo no local da infecção. Neutrófilos são as células imunes predominantes em infecções por *P. aeruginosa* ^{15,16} e são, rapidamente, recrutados ao local de infecção sendo cruciais na defesa do hospedeiro ¹⁷. Eles atravessam as paredes dos vasos sanguíneos e chegam até os locais da inflamação.

Bactérias, por sua vez, tentam escapar de neutrófilos pela inibição da fagocitose ¹⁴, detoxificando ROS ¹⁸, degradando NETs (redes compostas por aglomerado de cromatina e proteínas granulares de neutrófilos) ¹⁹ ou matando neutrófilos recrutados ²⁰. Ao longo do processo evolutivo, esses patógenos desenvolveram uma série de mecanismos para escapar da fagocitose e *burst* oxidativo provocados pelo hospedeiro. Dentre eles sistemas de detoxificação de hidroperóxidos, evitando a ação de ROS produzidos que levariam a danos na membrana plasmática e DNA.

O recrutamento de neutrófilos se dá por meio de sinalizadores chamados citocinas. Citocinas são polipeptídeos produzidos em resposta a microrganismos e outros antígenos, que medeiam e regulam reações imunológicas e inflamatórias ²¹. TNF- α é a principal citocina mediadora da resposta inflamatória aguda a bactérias Gram-negativas e outros microrganismos infecciosos e é responsável por muitas das complicações sistêmicas de infecções graves; participa do recrutamento e estimula a atividade microbicida de macrófagos e neutrófilos (*burst*

oxidativo), sendo presente na fase aguda de infecções. TNF- α é uma citocina pró-inflamatória produzida a partir de estímulos a vias de sinalização como a dos TLRs em macrófagos ²². Os receptores semelhantes ao toll (TLRs) de mamíferos, por sua vez, são membros de um sistema de reconhecimento e de sinalização evolutivamente conservado, descoberto em *Drosophila melanogaster*. Esses receptores estão presentes em macrófagos e em outras células do sistema imune e apresentam especificidade, por exemplo, na ligação a componentes da parede celular bacteriana.

Na resposta imunológica, sabe-se que ROS interagem na via do NF- κ B como resposta do sistema imune inato ²³. O NF- κ B é um complexo proteico que desempenha funções como fator de transcrição e, quando ativo, é translocado do citoplasma para o núcleo, onde promove a ativação de genes que codificam as citocinas TNF- α , IL-1 e IL-6 ²⁴. Em experimentos com ratos, foi demonstrada a elevação nas quantidades de TNF- α , IL-1 e IL-6 após infecção por *P. aeruginosa* ²⁵. Além dessas, outra citocina pró-inflamatória importante e também analisada em infecções por *P. aeruginosa* é IL-1 β ^{16,26,27}.

O contato de *P. aeruginosa* com o hospedeiro humano pode se dar pelas mucosas, desencadeando respostas inflamatórias com ativação de enzimas como óxido nítrico sintase ⁸; NADPH oxidase ²⁸ e mieloperoxidase ²⁹. Portanto, as bactérias são expostas a vários oxidantes, incluindo: radical ânion superóxido, radical hidroxila, peróxido de hidrogênio, peroxinitrito e hidroperóxidos orgânicos (OHPs) ³⁰. Dessa forma, a proteção de microorganismos contra estresse oxidativo é um componente crucial na interação bactéria-hospedeiro ³¹.

Em resposta a alterações de estado redox dentro da célula, a bactéria ajusta seus sistemas de controle, alterando seu metabolismo. Dessa forma, mantém as funções de proteínas essenciais, tratando de garantir sua sobrevivência, porém essas alterações redox podem servir como sinalização para informar a necessidade de mudanças de estratégia. Essas alterações demonstram como alterações redox são determinantes na promoção de ambientes redutores, essenciais à vida ³².

A virulência de genes de *P. aeruginosa*, utilizando *Caenorhabditis elegans* como organismo hospedeiro foi utilizada ³³ e os resultados obtidos apontam semelhanças nas estratégias da bactéria no ataque ao verme e a humanos.

Assim como em animais, a infecção de patógenos em plantas dispara a produção de resposta por parte do hospedeiro de elevadas quantidades de oxidantes no local da infecção como

forma de combate ao patógeno ²⁸ apresentando-se como uma alternativa no estudo das vias e estratégias de combate à bactéria.

De forma parecida, outros trabalhos apontam em diferentes patógenos e hospedeiros a participação de proteínas atuando na resposta a estresse oxidativo e resposta imunológica ^{31,34,35}. Trabalhos semelhantes têm demonstrado a relevância de mecanismos de defesa contra estresse oxidativo em bactérias e suas respostas *in vitro* e *in vivo* ³¹.

Dentre os vários oxidantes, o presente trabalho está focado no estudo de OHPs que podem reagir com ácidos nucleicos, proteínas e lipídios, causando mutações no DNA, inativação de enzimas e oxidação de fosfolipídeos de membranas ^{36,37}. Consequentemente, mecanismos de detoxificação de OHPs por bactérias são importantes para sua sobrevivência e proliferação no hospedeiro ³⁶. Organismos patogênicos desenvolveram estratégias complexas de reparo de danos e detoxificação causados por OHPs que serão descritos a seguir ³⁸.

A enzima alquil hidroperóxido redutase C (AhpC) catalisa a redução de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos, em água e o álcool correspondente; AhpC faz parte das enzimas da família das peroxirredoxinas (Prx) ³⁹. A importância de AhpC no papel de proteção de microorganismos contra o estresse oxidativo se reflete na grande variedade de espécies de eubactérias e arqueobactérias nas quais o referido gene é encontrado ³¹, além de seu papel na detoxificação de hidroperóxidos ^{40,41}.

Além de AhpC, a enzima Ohr está envolvida na detoxificação de OHPs, apresentando atividade peroxidase dependente de tiól como descrito por diferentes autores ^{34,42}. Ohr apresenta baixa indução frente a estímulos com peróxido de hidrogênio mas apresenta alta especificidade e é fortemente induzida quando desafiada por hidroperóxidos orgânicos ^{34,36,43}, sendo essa característica determinada pelo par de cisteínas conservadas em seu sítio ativo (Cys61 e Cys125 de acordo com numeração de proteína de *Xylella fastidiosa*) ^{34,42} que se apresenta conservado em todos os representantes da família Ohr/OsmC ⁴⁴.

1.3. O sistema Ohr/OhrR

O sistema Ohr/OhrR compreende a peroxidase Ohr e o fator de transcrição OhrR. Em várias bactérias como *Pseudomonas aeruginosa*, o sistema Ohr-OhrR se mostrou central para conferir resistência contra estresse oxidativo gerado por OHPs, como hidroperóxido de cumeno (CHP) e tércio-butil (t-BHP), mas não para peróxido de hidrogênio (Figura 3), além de contribuir

com a decomposição desses OHPs em cultura de bactérias^{36,45}. Inicialmente, vamos descrever as enzimas Ohr.

Figura 3. Estrutura de hidroperóxidos. (A) Peróxido de hidrogênio. (B) Peróxido de *t*-butil. (C) Peróxido de cumeno; comparação entre as estruturas de peróxido de hidrogênio e dois hidroperóxidos orgânicos (OHPs). Os átomos de oxigênio que compõem o grupo peróxido, estão realçados em vermelho. O grupo OOH ligado a um substituinte com carbono (orgânico) caracteriza um OHP. O substituinte orgânico pode ser variável. Imagens de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

A família de proteínas Ohr/OsmC compreende proteínas ligadas à detoxificação de OHPs no caso de Ohr³⁶, e de choque osmótico no caso de OsmC⁴⁶. A família de proteínas Ohr/OsmC, pode ser dividida em três subgrupos principais, sendo um representado por Ohrs, outro representado por OsmCs e o terceiro pela YhfA, sendo que todas apresentam cisteínas conservadas⁴⁷.

A identificação inicial do gene *ohr* foi realizada em *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, devido a sua capacidade de resgatar a resistência a OHPs de um mutante *AhpC* de *Escherichia coli*³⁶ e proteínas relacionadas já foram encontradas em uma grande variedade de bactérias⁴⁸. O gene *osmc* de *Escherichia coli* foi relacionado à resposta a choque osmótico⁴⁶.

Nosso grupo de pesquisa foi responsável por mostrar que a proteína Ohr apresenta atividade peroxidásica centrada em resíduo de cisteína, apresentando maior eficiência em relação a OHPs do que peróxido de hidrogênio⁴², o que explica o fenótipo de células Δohr de alta sensibilidade a OHPs. Também mostramos que proteínas lipoiladas são os substratos redutores de OHPs³⁴. A proteína Ohr é um homodímero de forma elíptica caracterizada por apresentar duas folhas β compostas por seis fitas cercado duas alfa hélices centrais formando uma estrutura em forma de barril⁴⁹ (Figura 4).

Figura 4. Estrutura de homodímero de Ohr. Estrutura quaternária de Ohr de *Xylella fastidiosa* (PDB = 1ZB9). A Cys61 em rosa é a cisteína catalítica, enterrada entre as duas folhas β . Na cadeia lateral a Arg 19 (magenta) envolvida na estabilização do tiolato com a Cys 61 e Glu 51 (vermelho) que forma uma ponte com Arg19. Cys 125 (amarelo), envolvida na formação da ponte dissulfeto intramolecular ⁵⁰

Ohr apresenta-se como uma peroxidase, com duas cisteínas reativas em seu sítio ativo localizadas em faces opostas na proteína e dependente de tiól. Outros resíduos importantes no ciclo catalítico são os resíduos de arginina (Arg 19) e de glutamato (Glu 51) (Figura 5), que estabilizam o ânion tiolato ⁴⁹. Portanto, Ohr apresenta propriedades únicas entre várias peroxidases dependentes de tiól e está presente principalmente em bactérias, sendo candidata para o desenvolvimento de drogas.

Figura 5. Mecanismo proposto para o ciclo catalítico de Ohr de *X. fastidiosa* (adaptado de OLIVEIRA et al., 2006). O resíduo de cisteína peroxidásica (Cys_P) na sua forma reduzida, Cys_P-S^- (ânion tiolato) é oxidada a Cys_P-SOH (ác. sulfênico) pelo hidróperóxido de ácido graxo (LHP). Em seguida, a instabilidade do ácido sulfênico é resolvida através de uma reação de condensação com o resíduo de cisteína de resolução (Cys_R), formando uma ligação dissulfeto. Concomitantemente à reação de condensação, ocorre a liberação do álcool correspondente do ácido graxo e de uma molécula de água. Postula-se que a liberação do substrato é ajudada pela mudança conformacional gerada pela perda da interação do resíduo de arginina com o ânion tiolato. Uma vez oxidada, Ohr deve ser regenerada por um sistema redutor que acredita-se ser composto por proteínas lipoiladas³⁴.

Homólogos ao gene *ohr* foram identificados em bactérias patogênicas⁵¹, como *Pseudomonas aeruginosa*⁴⁵. Llewellyn et al (2011)⁵² realizaram testes de virulência em mutantes de *Francisella tularensis* em ratos e em cultura de macrófagos e identificaram uma proteína putativa de Ohr (FTN_1133) com papel de patogenicidade e predominante de defesa do microrganismo contra estresse induzido por OHPs. Contudo, nosso grupo mostrou que a proteína FTN_1133 não pertence à família Ohr/OsmC⁵³, reforçando a necessidade de mais estudos sobre as proteínas e mecanismos envolvidos nos processos de defesa do patógeno.

A expressão do gene *ohr* está diretamente ligada à indução por OHPs e sua regulação é mediada por OhrR, um regulador negativo⁵⁴⁻⁵⁶. O mecanismo de inibição da expressão do gene *ohr* por OhrR envolve a ligação física desse fator de transcrição no promotor de *ohr*, quando OhrR está reduzida. Ao ser oxidada por OHPs, OhrR deixa de se ligar ao promotor de *ohr*,

ativando a transcrição desse gene ^{43,57} (Figura 6).

Figura 6. Mecanismo proposto para o ciclo catalítico de OhrR. Inicialmente OhrR está fisicamente ligada à região promotora de ohr, no DNA, com as cisteínas reduzidas; após o ataque por hidroperóxidos orgânicos se desprende do DNA pela alteração de conformação, com as cisteínas oxidadas. Figura modificada ⁵⁸. O retorno a seu estado inicial se dá pela redução via sistema Trx ⁴³.

O mecanismo de ação de OhrR foi também descrito em *X. campestris*, realçando seu controle sobre a transcrição de *ohr* ⁵⁹ e em *Chromobacterium violaceum* ⁴³. Nosso grupo, mostrou que OhrA e seu regulador negativo OhrR compreendem uma via de percepção e detoxificação de peróxidos orgânicos, importante para a defesa desse patógeno oportunista ⁴³. Ainda nesse trabalho, foi mostrado que OhrR é especificamente reduzido por tiorredoxina, com consequente liberação desse fator de transcrição do promotor de *ohr* ⁴³ (Figura 6).

Resultados obtidos em *X. campestris* por Panmanee et al. (2006) indicaram diferentes mecanismos de atuação de OhrR em organismos distintos. A partir do alinhamento da sequência de aminoácidos, OhrRs podem ser classificados em 1-Cys ou 2-Cys OhrR, dependendo do número de resíduos de cisteína envolvidos na ativação do fator de transcrição ⁶⁰. O grupo de OhrR contendo uma única cisteína (denominado 1-Cys) foi descrito para *B. subtilis* ⁶¹. Em algumas bactérias, existe mais de um gene *ohr*, denominados *ohrA* e *ohrB*. Nesses casos, como

por exemplo em *Chromobacterium violaceum* e *Bacillus subtilis*, a ação de OhrR só se dá no promotor de *ohrA* ^{43,54}.

Diferentes autores sugerem que OhrR pertença a um regulon que controle a expressão de outros genes ^{12,62}, além de seu próprio gene *ohrR* por autorregulação e a de *ohr*. De fato, o grupo liderado pelo Dr. José Freire da Silva Neto, em colaboração com nosso grupo, mostrou recentemente que OhrR também regula a expressão de diguanilato ciclases, atuando em sinalização mediada por di-cGMP ⁶³. Por outro lado, o gene *ohrR* pode ser regulado de maneira hierárquica, por OspR em *P. aeruginosa* ⁶⁴, além da autoregulação descrita acima.

Recentemente, outros autores têm sugerido que a identificação de regulons da família MarR podem contribuir significativamente no esclarecimento de fatores que determinem virulência e diversidade fenotípica ¹². Essa família recebe esse nome por abranger fatores de transcrição com múltipla resistência a antibióticos (**M**ultiple **a**ntibiotic **r**esistance **R**egulators).

OhrR apresenta-se como um dímero e sua estrutura assemelha-se às de todos os outros membros da família MarR, sendo formada por 6 α -hélices e 3 folhas β que se organizam da seguinte maneira: α 1, (resíduos 14–36), α 2 (resíduos 40–51), β 1 (resíduos 54–57), α 3 (resíduos 58–64), α 4 (resíduos 68–81), β 2 (resíduos 83–88), β 3 (resíduos 95–101), α 5 (resíduos 102–122), e α 6 (resíduos 130–143) ⁶⁵ (Figura 7); sendo que as porções da proteína que fazem contato com o DNA reconhecem o *major groove* e o *minor groove* da estrutura helicoidal ⁶⁶. O estado de oxidação de OhrR (Figura 8) determina a conformação da proteína e, conseqüentemente, sua interação ou desligamento do DNA.

Figura 7. Estrutura de OhrR de *B. subtilis*. (A) OhrR com N-terminal e C-terminal de ambas as subunidades e estrutura secundária de uma das subunidades colorida e marcada, e a outra em rosa. (B) Alinhamento da sequência estrutural da proteína OhrR e da família MarR. Os elementos da estrutura secundária de OhrR e DNA ligado a OhrR estão indicados por flechas (folhas β), retângulos sólidos (α -hélices) e retângulos (310 hélices). O resíduo da cisteína catalítica C15 está ressaltado por um quadrado em vermelho e as tirosinas Y29 e Y40 estão coloridas em vermelho. Os resíduos que se ligam ao DNA estão marcados com asteriscos vermelhos. Os resíduos homólogos que interagem com o DNA estão demarcados por um contorno dourado. Figura modificada⁶⁵.

Figura 8. Estruturas de OhrR de *Xanthomonas campestris*. (A) Estrutura de OhrR reduzida com uma subunidade magenta e a outra rosa claro. Cisteínas estão em amarelo; (B) Estrutura de OhrR oxidada com uma subunidade em azul esverdeado e a outra em azul claro. Figuras feitas com PyMOL, modificadas⁶⁷.

Além de OhrR, segundo Gupta (2018)¹², outros genes pertencentes à família MarR apresentam-se localizados no genoma próximos a genes que codificam proteínas importantes na interação com hospedeiros mamíferos.

Considerando que a maioria das proteínas da família MarR apresenta um ou mais

resíduos de cisteína e que os mecanismos de defesa bacterianos contra o ataque de ROS do hospedeiro são cruciais no sucesso ou fracasso da colonização, o papel das respostas redox deve ser considerado ¹².

Figura 9. Organização genômica de *ohr-ohrR*. (A) Locus gênico de *ohr* e *ohrR* em *P. aeruginosa*; (B) operon de *Ohr* e *OhrR* de *C. violaceum*. Figuras retiradas de ⁶⁸ e ⁴³, respectivamente.

A deleção de *ohrR* em *Mycobacterium smegmatis* promoveu aumento da virulência em macrófagos pela expressão constitutiva de *Ohr* ⁶⁹ porém linhagens Δohr exibiram virulência equivalente à linhagem selvagem (WT). Segundo Caswell et al. (2012)⁷⁰, contudo, tanto a linhagem mutante Δohr quanto $\Delta ohrR$ não alteraram a virulência em *Brucella abortus* no modelo de infecção de camundongos quando comparadas à linhagem selvagem. Esses e outros dados da literatura apontam para a necessidade de mais informações para a elucidação do funcionamento desses genes.

Em comparação com a enzima antioxidante *Ohr*, pouco se sabe sobre a reatividade do fator de transcrição *OhrR* frente a diferentes redutores e oxidantes. Assim, justifica-se a caracterização cinética de *OhrR* de *P. aeruginosa* e *C. violaceum* realizada nesta tese, já que esses fatores de transcrição são considerados os sensores redox de OHPs.

1.4. *Chromobacterium violaceum*

Além de *P. aeruginosa*, nesta tese também avaliamos o modo de ação de OhrR de *Chromobacterium violaceum*, aproveitando-se de construções geradas pelo Dr. José Freire da Silva Neto, nosso colaborador. *C. violaceum* é um bacilo Gram-negativo, portador de flagelo encontrado na natureza, no solo e em água parada. Seu predomínio ocorre em regiões tropicais e subtropicais ^{71,72} agindo como decompositor ⁷³; porém, ocasionalmente, pode agir como patógeno oportunista em animais e no homem via infecção cutânea ⁷⁴. As infecções podem ser localizadas ou septicêmicas graves com múltiplos abscessos, mais esporadicamente relatadas ⁷⁵ mas que apresentam alta taxa de mortalidade ⁷⁶.

Esse patógeno foi descrito pela primeira vez em 1927, na Malásia ⁷⁷ e uma de suas características é a produção de um antibiótico natural, violaceína, que pode ser útil no tratamento de alguns tipos de cânceres ⁷¹ e apresenta coloração violeta intenso, caracterizando as colônias ⁷².

Assim como *P. aeruginosa*, *C. violaceum* é um patógeno oportunista e, por serem bactérias Gram-negativas, apresentam regulação de expressão de genes em resposta à densidade populacional, mecanismo regulatório chamado de *quorum sensing* ⁷⁸ requerido para diferentes características fenotípicas bem como para produção de enzimas extracelulares em *C. violaceum* ⁷¹. De fato, Evans (2018)⁷⁹ relata a ação de controle via *quorum-sensing* em *C. violaceum* na defesa contra microbicidas.

Trabalhos reforçam a importância do sistema Ohr-OhrR na defesa contra oxidantes ^{43,63} além da ação de OhrR como um regulon modulando a defesa do patógeno em ensaios realizados em camundongos ⁶³. Ainda assim, os autores reafirmam a necessidade de mais informações em relação a esse mecanismo.

2. Conclusões

- A ausência de OhrR em linhagens de *P. aeruginosa* pode acarretar maior sobrevivência de camundongos infectados.
- A ausência de Ohr parece promover maior inflamação nos tecidos do hospedeiro.
- A ausência de Ohr e OhrR promove maior recrutamento de neutrófilos nos pulmões do hospedeiro em relação à linhagem selvagem.
- A linhagem Δohr ocasiona maior produção de citocinas IL-1 β nos pulmões de camundongos do que a linhagem selvagem.
- Análises de CFU com as diferentes linhagens testadas (WT, Δohr , $\Delta ohrR$ e $\Delta ohr/\Delta ohrR$) não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si.
- OhrR tem importante papel na percepção da presença de hidroperóxidos orgânicos.
- PaOhrR tem as Cys19 e Cys121 como cisteínas catalítica e de resolução, respectivamente.
- OhrR apresenta alta afinidade por hidroperóxidos orgânicos com constantes de reação da ordem de $10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.
- PaOhrR apresenta alta afinidade por peroxinitrito com constantes de reação da ordem de $10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.
- PaOhrR apresenta baixa afinidade por peróxido de hidrogênio com constantes de reação da ordem de $10^1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.
- CvOhrR deve ter como redutor TrxA.

3. Referências bibliográficas

1. An, D. *et al.* The pathogenic properties of a novel and conserved gene product, KerV, in proteobacteria. *PLoS One* **4**, (2009).
2. Mahajan-Miklos, S., Rahme, L. G. & Ausubel, F. M. Elucidating the molecular mechanisms of bacterial virulence using non-mammalian hosts. *Molecular Microbiology* **37**, 981–988 (2000).
3. Nikel, P. I., Martínez-García, E. & De Lorenzo, V. Biotechnological domestication of pseudomonads using synthetic biology. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 368–379 (2014).
4. Lister, P. D., Wolter, D. J. & Hanson, N. D. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 582–610 (2009).
5. Kipnis, E., Sawa, T. & Wiener-Kronish, J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med. Mal. Infect.* **36**, 78–91 (2006).
6. Gellatly, S. L. & Hancock, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa*: New insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog. Dis.* **67**, 159–173 (2013).
7. Stover C-K., Pham X-Q., Erwin A-L., Mizoguchi S-D., Warrenner P., H. M.-J. & Brinkman F-S., Hufnagle W-O., Kowalik D-J., Lagrou M. Garber R-L., Goltry L., Tolentino E., Westbrook-Wadman S., Yuan Y., Brody L-L., Coulter S-N., Folger K-R., Kas A., Larbig K., Lim R., Smith K., Spencer D., Wong G-K., Wu Z., Paulsen I-T., Reizer J., Sa, O. M.-V. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**, 959–964 (2000).
8. Hazlett, L. D. Pathogenic Mechanisms of *P. aeruginosa* Keratitis: A Review of the Role of T Cells, Langerhans Cells, PMN, and Cytokines. *DNA Cell Biol.* **21**, 383–390 (2002).
9. Arruda, É. A. G. De. Infecção hospitalar por *Pseudomonas aeruginosa* multi-resistente: análise epidemiológica no HC-FMUSP. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **31**, 503–504 (1998).
10. Aslam, B. *et al.* Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infect. Drug Resist.* **11**, 1645–1658 (2018).

11. Wu, W., Jin, Y., Bai, F. & Jin, S. *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Medical Microbiology* (Elsevier Ltd, 2015). doi:10.1016/B978-0-12-397169-2.00041-X
12. Gupta, A. *et al.* MarR Family Transcription Factors from *Burkholderia* Species: Hidden Clues to Control of Virulence-Associated Genes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **83**, 1–19 (2018).
13. Halliwell, Barry; Gutteridge, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. (Oxford University Press, 2007).
14. Rooijakkers, S. H. M., Van Kessel, K. P. M. & Van Strijp, J. A. G. Staphylococcal innate immune evasion. *Trends Microbiol.* **13**, 596–601 (2005).
15. Diaz, M. H. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* induces localized immunosuppression during pneumonia. *Infect. Immun.* **76**, 4414–4421 (2008).
16. Liang, X. *et al.* Macrophage FABP4 is required for neutrophil recruitment and bacterial clearance in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *FASEB J.* fj.201802002R (2018). doi:10.1096/fj.201802002R
17. Döhrmann, S., Cole, J. N. & Nizet, V. Conquering Neutrophils. *PLoS Pathog.* **12**, 1–8 (2016).
18. Aussel, L. *et al.* Salmonella detoxifying enzymes are sufficient to cope with the host oxidative burst. *Mol. Microbiol.* **80**, 628–640 (2011).
19. Doke, M. *et al.* Nucleases from *Prevotella intermedia* can degrade neutrophil extracellular traps. *Mol. Oral Microbiol.* **32**, 288–300 (2017).
20. Sun, Y., Karmakar, M., Taylor, P. R., Rietsch, A. & Pearlman, E. ExoS and ExoT ADP Ribosyltransferase Activities Mediate *Pseudomonas aeruginosa* Keratitis by Promoting Neutrophil Apoptosis and Bacterial Survival. *J. Immunol.* **188**, 1884–1895 (2012).
21. Murphy, K. *et al.* *Immunobiologia de Janeway*. (2010).
22. Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. *Nat. Immunol.* **11**, 373–384 (2010).
23. Morgan, M. J. & Liu, Z. G. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling. *Cell Res* **21**, 103–115 (2011).
24. Moynagh, P. N. The Pellino family: IRAK E3 ligases with emerging roles in

- innate immune signalling. *Trends Immunol.* **30**, 33–42 (2009).
25. Mijares, L. A. *et al.* Airway epithelial MyD88 restores control of *Pseudomonas aeruginosa* murine infection via an IL-1-dependent pathway. *J Immunol* **186**, 7080–7088 (2011).
 26. Jabir, M. S., Sulaiman, G. M., Taqi, Z. J. & Li, D. Iraqi propolis increases degradation of IL-1 β and NLRC4 by autophagy following *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Microbes Infect.* **20**, 89–100 (2018).
 27. Rimessi, A. *et al.* Page 1 of 43. 1–43 (2018).
 28. Wojtaszek, P. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* **322** (Pt 3), 681–92 (1997).
 29. Sattler, W., Obinger, C., Malle, E. & Furtmu, P. G. Myeloperoxidase : a target for new drug development ? 838–854 (2007). doi:10.1038/sj.bjp.0707358
 30. Skaar, E. P. *et al.* The outer membrane localization of the *Neisseria gonorrhoeae* MsrA/B is involved in survival against reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 10108–13 (2002).
 31. Charoenlap, N. *et al.* Alkyl hydroperoxide reductase is required for *helicobacter cinaedi* intestinal colonization and survival under oxidative stress in balb/c and balb/c interleukin-10-/- mice. *Infect. Immun.* **80**, 921–928 (2012).
 32. Sporer, A. J., Kahl, L. J., Price-whelan, A. & Dietrich, L. E. P. Redox-Based Regulation of Bacterial Development and Behavior. *Annu. Rev. Biochem.* **86**, 777–797 (2017).
 33. Feinbaum, R. L. *et al.* Genome-wide identification of *Pseudomonas aeruginosa* virulence-related genes using a *Caenorhabditis elegans* infection model. *PLoS Pathog.* **8**, 11 (2012).
 34. Cussiol, J. R. R., Alegria, T. G. P., Szweda, L. I. & Netto, L. E. S. Ohr (organic hydroperoxide resistance protein) possesses a previously undescribed activity, lipoyl-dependent peroxidase. *J. Biol. Chem.* **285**, 21943–21950 (2010).
 35. Kaihami, G. H. *et al.* Involvement of a 1-Cys Peroxiredoxin in Bacterial Virulence. *PLoS Pathog.* **10**, (2014).

36. Mongkolsuk, S., Praituan, W., Loprasert, S., Fuangthong, M. & Chamnongpol, S. Identification and characterization of a new organic hydroperoxide resistance (ohr) gene with a novel pattern of oxidative stress regulation from *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *J. Bacteriol.* **180**, 2636–2643 (1998).
37. Andô, W. *Organic Peroxides*. (Wiley, 1992).
38. Lesniak, J., Barton, W. A. & Nikolov, D. B. Structural and functional features of the *Escherichia coli* hydroperoxide resistance protein OsmC. *Protein Sci.* **12**, 2838–43 (2003).
39. Dubbs, J. M. & Mongkolsuk, S. In : Peroxiredoxin Systems : Structures and Functions Chapter 7 Peroxiredoxins in Bacterial Antioxidant Defense. **44**, 143–193 (2007).
40. Imlay, J. A. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu. Rev. Biochem.* 755–776 (2008).
doi:10.1146/annurev.biochem.77.061606.161055.Cellular
41. Mishra, S. & Imlay, J. Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide? *Arch. Biochem. Biophys.* **525**, 145–160 (2012).
42. Cussiol, J. R. R., Alves, S. V., De Oliveira, M. A. & Netto, L. E. S. Organic hydroperoxide resistance gene encodes a thiol-dependent peroxidase. *J. Biol. Chem.* **278**, 11570–11578 (2003).
43. da Silva Neto, J. F., Negretto, C. C. & Netto, L. E. S. Analysis of the Organic Hydroperoxide Response of *Chromobacterium violaceum* Reveals That OhrR Is a Cys-Based Redox Sensor Regulated by Thioredoxin. *PLoS One* **7**, (2012).
44. Meireles, D. A. *et al.* Functional and evolutionary characterization of Ohr proteins in eukaryotes reveals many active homologs among pathogenic fungi. *Redox Biol.* **12**, 600–609 (2017).
45. Ochsner, U. A., Hassett, D. J. & Vasil, M. L. Genetic and Physiological Characterization of ohr, Encoding a Protein Involved in Organic Hydroperoxide Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **183**, 773–778 (2001).
46. Gutierrez, C. & Devedjian, J. C. Osmotic induction of gene *osmC* expression in *Escherichia coli* K12. *J. Mol. Biol.* **220**, 959–973 (1991).

47. Shin, D. H. structural genomics papers Structure of OsmC from *Escherichia coli* : a salt-shock-induced protein structural genomics papers. 903–911 (2004). doi:10.1107/S0907444904005013
48. Atichartpongkul, S. *et al.* Bacterial Ohr and OsmC paralogues define two protein families with distinct functions and patterns of expression. *Microbiology* **147**, 1775–1782 (2001).
49. Oliveira, M. A. *et al.* Structural Insights into Enzyme-Substrate Interaction and Characterization of Enzymatic Intermediates of Organic Hydroperoxide Resistance Protein from *Xylella fastidiosa*. *J. Mol. Biol.* **359**, 433–445 (2006).
50. Netto, L. E. S. *et al.* Reactive cysteine in proteins: Protein folding, antioxidant defense, redox signaling and more. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* **146**, 180–193 (2007).
51. Chen, P. R. *et al.* An oxidation-sensing mechanism is used by the global regulator MgrA in *Staphylococcus aureus*. *Nat. Chem. Biol.* **2**, 591–595 (2006).
52. Llewellyn, A. C., Jones, C. L., Napier, B. A., Bina, J. E. & Weiss, D. S. Macrophage replication screen identifies a novel *Francisella* hydroperoxide resistance protein involved in virulence. *PLoS One* **6**, (2011).
53. Meireles, D. de A., Alegria, T. G. eronimo P., Alves, S. V. idigal, Arantes, C. R. ani R. & Netto, L. E. duardo S. A 14.7 kDa protein from *Francisella tularensis* subsp. novicida (named FTN_1133), involved in the response to oxidative stress induced by organic peroxides, is not endowed with thiol-dependent peroxidase activity. *PLoS One* **9**, e99492 (2014).
54. Fuangthong, M., Atichartpongkul, S., Mongkolsuk, S. & Helmann, J. D. OhrR is a repressor of *ohrA*, a key organic hydroperoxide resistance determinant in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **183**, 4134–4141 (2001).
55. Mongkolsuk, S. & Helmann, J. D. Regulation of inducible peroxide stress responses. *Molecular Microbiology* **45**, 9–15 (2002).
56. Panmanee, W., Vattanaviboon, P., Poole, L. B. & Mongkolsuk, S. Novel organic hydroperoxide-sensing and responding mechanisms for OhrR, a major bacterial sensor and regulator of organic hydroperoxide stress. *J. Bacteriol.* **188**, 1389–1395 (2006).

57. Chuchue, T. *et al.* *ohrR* and *ohr* Are the Primary Sensor / Regulator and Protective Genes against Organic Hydroperoxide Stress in *Agrobacterium tumefaciens* *ohrR* and *ohr* Are the Primary Sensor / Regulator and Protective Genes against Organic Hydroperoxide Stress in *Agrobacteri*. **188**, 842–851 (2006).
58. Netto, L. E. S., De Oliveira, M. A., Tairum, C. A. & Da Silva Neto, J. F. Conferring specificity in redox pathways by enzymatic thiol/disulfide exchange reactions. *Free Radic. Res.* **50**, 206–245 (2016).
59. Sukchawalit, R., Loprasert, S., Atichartpongkul, S. & Mongkolsuk, S. Complex regulation of the organic hydroperoxide resistance gene (*ohr*) from *Xanthomonas* involves *ohrR*, a novel organic peroxide-inducible negative regulator, and posttranscriptional modifications. *J. Bacteriol.* **183**, 4405–4412 (2001).
60. Dubbs, J. M. & Mongkolsuk, S. Peroxide-sensing transcriptional regulators in bacteria. *J. Bacteriol.* **194**, 5495–5503 (2012).
61. Fuangthong, M. & Helmann, J. D. The *OhrR* repressor senses organic hydroperoxides by reversible formation of a cysteine-sulfenic acid derivative. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 6690–6695 (2002).
62. Pande, A., Veale, T. C. & Grove, A. Gene regulation by redox-sensitive *Burkholderia thailandensis* *OhrR* and its role in bacterial killing of *Caenorhabditis elegans*. *Infect. Immun.* **86**, (2018).
63. Previato-Mello, M., Meireles, D. de A., Netto, L. E. S. & Neto, J. F. da S. Global transcriptional response to organic hydroperoxide and the role of *OhrR* in the control of virulence traits in *Chromobacterium violaceum*. *Infect. Immun.* **85**, (2017).
64. Atichartpongkul, S. *et al.* Regulation of Organic Hydroperoxide Stress Response by Two *OhrR* Homologs in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* **11**, e0161982 (2016).
65. Hong, M., Fuangthong, M., Helmann, J. D. & Brennan, R. G. Structure of an *OhrR-ohrA* operator complex reveals the DNA binding mechanism of the *MarR* family. *Mol. Cell* **20**, 131–141 (2005).

66. Perera, I. C. & Grove, A. Molecular mechanisms of ligand-mediated attenuation of DNA binding by MarR family transcriptional regulators. *J. Mol. Cell Biol.* **2**, 243–254 (2010).
67. Newberry, K. J., Fuangthong, M., Panmanee, W., Mongkolsuk, S. & Brennan, R. G. Structural Mechanism of Organic Hydroperoxide Induction of the Transcription Regulator OhrR. *Mol. Cell* **28**, 652–664 (2007).
68. Atichartpongkul, S., Fuangthong, M., Vattanaviboon, P. & Mongkolsuk, S. Analyses of the regulatory mechanism and physiological roles of *Pseudomonas aeruginosa* OhrR, a transcription regulator and a sensor of organic hydroperoxides. *J. Bacteriol.* **192**, 2093–2101 (2010).
69. Saikolappan, S., Das, K. & Dhandayuthapani, S. Inactivation of the organic hydroperoxide stress resistance regulator OhrR enhances resistance to oxidative stress and isoniazid in *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* **197**, 51–62 (2015).
70. Caswell, C. C., Baumgartner, J. E., Martin, D. W. & Martin Roop, R. Characterization of the organic hydroperoxide resistance system of *Brucella abortus* 2308. *J. Bacteriol.* **194**, 5065–5072 (2012).
71. Haselkorn, R., Artur, L., Bataus, M., Batista, S. & Teno, C. The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 11660–11665 (2003).
72. Durán, N. & Menck, C. F. M. *Chromobacterium violaceum* A Review of Pharmacological and Industiral Perspectives, Critical Reviews in Microbiology, Informa Healthcare. **27**, 201–222 (2001).
73. Madi, D. R., Vidyalakshmi, K., Ramapuram, J. & Shetty, A. K. Case report: Successful treatment of *chromobacterium violaceum* sepsis in a south indian adult. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **93**, 1066–1067 (2015).
74. Kumar, Mr. *Chromobacterium violaceum* : A rare bacterium isolated from a wound over the scalp. *Int. J. Appl. Basic Med. Res.* **2**, 70 (2012).
75. ANVISA. MICROBIOLOGIA CLÍNICA PARA O CONTROLE DE INFECÇÃO RELACIONADA À ASSISTÊNCIA À SAÚDE. (2013). Available at: https://spdbcfmusp.files.wordpress.com/2014/09/iras_modulodeteccaobact

erias.pdf. (Acessado: 15º julho 2019)

76. Rekha, R., Karnaker, V. K., Veena, S. & Krishnaprasad, M. S. Chromobacterium violaceum septicaemia - a case report. *Al Ameen J. Med. Sci.* **4**, 201–203 (2011).
77. Ray, P. *et al.* Chromobacterium violaceum septicaemia from north India. *Indian J. Med. Res.* **120**, 523–526 (2004).
78. Cha, C., Gao, P., Chen, Y.-C., Shaw, P. D. & Farrand, S. K. Production of Acyl-Homoserine Lactone Quorum-Sensing Signals by Gram-Negative Plant-Associated Bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**, 1119–1129 (1998).
79. Evans, K. C. *et al.* Quorum-sensing control of antibiotic resistance stabilizes cooperation in Chromobacterium violaceum. *ISME J.* **12**, 1263–1272 (2018).
80. Rahme, L. G. *et al.* Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science (80-.).* **268**, 1899–1902 (1995).
81. Liberati, N. T. *et al.* An ordered, nonredundant library of Pseudomonas aeruginosa strain PA14 transposon insertion mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 2833–2838 (2006).
82. Simon, R., Priefer, U. & Pühler, A. A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Bio/Technology* **1**, 784 (1983).
83. Hoang, T. T., Karkhoff-Schweizer, R. R., Kutchma, A. J. & Schweizer, H. P. A broad-host-range F1p-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: Application for isolation of unmarked Pseudomonas aeruginosa mutants. *Gene* **212**, 77–86 (1998).
84. Tsai, J. W. & Alley, M. R. K. Proteolysis of the McpA chemoreceptor does not require the Caulobacter major chemotaxis operon. *J. Bacteriol.* **182**, 504–507 (2000).
85. Sambrook, J. & Russell, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (John Inglis, 2001).
86. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. *Current protocols in Molecular Biology*. (John Wiley & Sons, Inc., 2003).
87. Chen, W. ping & Kuo, T. teh. A simple and rapid method for the preparation of

- gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* **21**, 2260 (1993).
88. Masuda, N. *et al.* Contribution of the MexX-MexY-OprM Efflux System to Intrinsic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **44**, 2242–2246 (2000).
 89. Cai, S., Batra, S., Wakamatsu, N., Pacher, P. & Jeyaseelan, S. NLRC4 Inflammasome-Mediated Production of IL-1 Modulates Mucosal Immunity in the Lung against Gram-Negative Bacterial Infection. *J. Immunol.* **188**, 5623–5635 (2012).
 90. Koh, A. Y., Priebe, G. P., Ray, C., Van Rooijen, N. & Pier, G. B. Inescapable need for neutrophils as mediators of cellular innate immunity to acute *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Infect. Immun.* **77**, 5300–5310 (2009).
 91. Zar, J. H. *Biostatistical analysis*. (Englewood Cliffs, N.J Prentice-Hall, 1984).
 92. Jiang, Z. Y., Hunt, J. V. & Wolff, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal. Biochem.* **202**, 384–389 (1992).
 93. Miyamoto, S. *et al.* Linoleic acid hydroperoxide reacts with hypochlorous acid, generating peroxy radical intermediates and singlet molecular oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 293–298 (2006).
 94. Kelly, S. M. & Price, N. C. The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function. *Curr. Protein Pept. Sci.* **1**, 349–384 (2000).
 95. Kelly, S. M., Jess, T. J. & Price, N. C. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **1751**, 119–139 (2005).
 96. Reyes, A. M. *et al.* Oxidizing substrate specificity of *Mycobacterium tuberculosis* alkyl hydroperoxide reductase E: Kinetics and mechanisms of oxidation and overoxidation. *Free Radic. Biol. Med.* **51**, 464–473 (2011).
 97. Antelmann, H. & Helmann, J. D. Thiol-based redox switches and gene regulation. *Antioxid. Redox Signal.* **14**, 1049–63 (2011).
 98. Lee, J.-W., Soonsanga, S. & Helmann, J. D. A complex thiolate switch regulates the *Bacillus subtilis* organic peroxide sensor OhrR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 8743–8748 (2007).
 99. González, S. *et al.* A family of diverse Kunitz inhibitors from *Echinococcus*

- granulosus potentially involved in host-parasite cross-talk. *PLoS One* **4**, (2009).
100. Alegria, T. G. P. *et al.* Ohr plays a central role in bacterial responses against fatty acid hydroperoxides and peroxyxynitrite. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, E132–E141 (2017).
 101. Clair, G., Lorphelin, A., Armengaud, J. & Duport, C. OhrRA functions as a redox-responsive system controlling toxinogenesis in *Bacillus cereus*. *J. Proteomics* **94**, 527–539 (2013).
 102. Karp, C. L. *et al.* Defective lipoxin-mediated anti-inflammatory activity in the cystic fibrosis airway. *Nat. Immunol.* **5**, 388–392 (2004).
 103. Binder, C. J., Papac-Milicevic, N. & Witztum, J. L. Innate sensing of oxidation-specific epitopes in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 485–497 (2016).
 104. Chen, G. Y. & Nuñez, G. Sterile inflammation: Sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 826–837 (2010).
 105. Vance, R. E., Hong, S., Gronert, K., Serhan, C. N. & Mekalanos, J. J. The opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* carries a secretable arachidonate 15-lipoxygenase. **101**, (2004).
 106. Serhan, C. N. Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin biosynthesis: An update and role in anti-inflammation and pro-resolution. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **68–69**, 433–455 (2002).
 107. Takai, D., Nagase, T. & Shimizu, T. New therapeutic key for cystic fibrosis : a role for lipoxins. **5**, 357–358 (2004).
 108. Aliberti, J. & Bafica, A. Anti-inflammatory pathways as a host evasion mechanism for pathogens. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **73**, 283–288 (2005).
 109. Aliberti, J. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 162–170 (2005).
 110. Serhan, C. N., Chiang, N., Dalli, J. & Levy, B. D. Lipid mediators in the resolution of inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, (2015).
 111. Brink, C. *et al.* International Union of Pharmacology XXXVII. Nomenclature for

- leukotriene and lipoxin receptors. *Pharmacol. Rev.* **55**, 195–227 (2003).
112. Vareechon, C., Zmina, S. E., Karmakar, M., Pearlman, E. & Rietsch, A. *Pseudomonas aeruginosa* Effector ExoS Inhibits ROS Production in Human Neutrophils. *Cell Host Microbe* **21**, 611–618.e5 (2017).
 113. Chi, B. K. *et al.* S-bacillithiolation protects against hypochlorite stress in *Bacillus subtilis* as revealed by transcriptomics and redox proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **10**, 1–21 (2011).
 114. De Almeida, J. R. F. *et al.* An immunoproteomic approach revealing peptides from *Sporothrix brasiliensis* that induce a cellular immune response in subcutaneous sporotrichosis. *Sci. Rep.* **8**, 1–11 (2018).
 115. Deng, Q. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* triggers macrophage autophagy to escape intracellular killing by activation of the NLRP3 inflammasome. *Infect. Immun.* **84**, 56–66 (2015).
 116. Zhang, Y. *et al.* Kinase suppressor of Ras-1 protects against pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Nat. Med.* **17**, 341–346 (2011).
 117. Guillemot, L. *et al.* Cytosolic phospholipase A2 α enhances mouse mortality induced by *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection via interleukin 6. *Biochimie* **107**, 95–104 (2014).
 118. Vinolo, M. A. R., Rodrigues, H. G., Nachbar, R. T. & Curi, R. Regulation of inflammation by short chain fatty acids. *Nutrients* **3**, 858–876 (2011).
 119. Wiehlmann, L., Cramer, N. & Tümmeler, B. Habitat-associated skew of clone abundance in the *Pseudomonas aeruginosa* population. *Environ. Microbiol. Rep.* **7**, 955–960 (2015).
 120. Hilker, R. *et al.* Interclonal gradient of virulence in the *Pseudomonas aeruginosa* pangenome from disease and environment. *Environ. Microbiol.* **17**, 29–46 (2015).
 121. Klockgether, J. & Tümmeler, B. Recent advances in understanding *Pseudomonas aeruginosa* as a pathogen. *F1000Research* **6**, 1261 (2017).
 122. Gales, A. C., Castanheira, M., Jones, R. N. & Sader, H. S. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: Results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010).

- Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **73**, 354–360 (2012).
123. Martínez, E. & Campos-Gómez, J. Oxylipins produced by *Pseudomonas aeruginosa* promote biofilm formation and virulence. *Nat. Commun.* **7**, 1–10 (2017).
 124. Klomsiri, C., Panmanee, W., Dharmsthiti, S., Vattanaviboon, P. & Mongkolsuk, S. Novel roles of ohrR-ohr in *Xanthomonas* sensing, metabolism, and physiological adaptive response to lipid hydroperoxide. *J. Bacteriol.* **187**, 3277–3281 (2005).
 125. Kokatnur, M. G. et al. Fatty acid composition of human adipose tissue from two anatomical sites in a biracial community. *Am. J. Clin. Nutr.* **32**, 2198–2205 (1979).
 126. Chen, C. H. et al. An innate bactericidal oleic acid effective against skin infection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A therapy concordant with evolutionary medicine. *J. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 391–399 (2011).
 127. Ma, D. C. et al. Cholesteryl esters are elevated in the lipid fraction of bronchoalveolar lavage fluid collected from pediatric cystic fibrosis patients. *PLoS One* **10**, 1–14 (2015).
 128. Mongkolsuk, S., Praituan, W. & Loprasert, S. Identification and Characterization of a New Organic Hydroperoxide Resistance (ohr) Gene with a Novel Pattern of Oxidative Stress Regulation from *Xanthomonas campestris* pv . *phaseoli* Identification and Characterization of a New Organic Hydroperoxide Res. (1998).
 129. Netto, L. E. S. & Antunes, F. The Roles of Peroxiredoxin and Thioredoxin in Hydrogen Peroxide Sensing and in Signal Transduction. *Mol. Cells* **39**, 65–71 (2016).
 130. Marinho, H. S., Real, C., Cyrne, L., Soares, H. & Antunes, F. Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox Biol.* **2**, 535–562 (2014).
 131. Tao, K. In vivo oxidation-reduction kinetics of OxyR, the transcriptional activator for an oxidative stress-inducible regulon in *Escherichia coli*. *FEBS*

- Lett.* **457**, 90–92 (1999).
132. Wei, Q. *et al.* Global regulation of gene expression by OxyR in an important human opportunistic pathogen. *Nucleic Acids Res.* **40**, 4320–4333 (2012).
 133. Domènech, A., Ayté, J., Antunes, F. & Hidalgo, E. Using in vivo oxidation status of one- and two-component redox relays to determine H₂O₂ levels linked to signaling and toxicity. *BMC Biol.* **16**, 1–15 (2018).
 134. Saridakis, V., Shahinas, D., Xu, X. & Christendat, D. Structural Insight on the Mechanism of Regulation of the MarR Family of Proteins: High-Resolution Crystal Structure of a Transcriptional Repressor from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J. Mol. Biol.* **377**, 655–667 (2008).
 135. Kho, C. W. *et al.* Gpx3-dependent responses against oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 270–282 (2008).
 136. Tachibana, T. *et al.* A major peroxiredoxin-induced activation of yap 1 transcription factor is mediated by reduction-sensitive disulfide bonds and reveals a low level of transcriptional activation. *J. Biol. Chem.* **284**, 4464–4472 (2009).
 137. Reyes, A. M. *et al.* PrxQ B from *Mycobacterium tuberculosis* is a monomeric, thioredoxin-dependent and highly efficient fatty acid hydroperoxide reductase. *Free Radic. Biol. Med.* **101**, 249–260 (2016).
 138. Feng, X., Sun W., Kong, L., Gao, H. Distinct roles of *Shewanella oneidensis* thioredoxin in regulation of cellular responses to hydrogen and organic peroxides. *Appl. Environ. Microbiol.* (2019). doi:10.1128/AEM.01700-19