UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

THAYS DE OLIVEIRA PEREIRA

Regulação da expressão de pioverdina dependente de contato em *Pseudomonas aeruginosa*

Versão corrigida da dissertação conforme resolução CoPGr 5890

O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data de depósito na SPG:

18 de setembro de 2018

THAYS DE OLIVEIRA PEREIRA

Regulação da expressão de pioverdina dependente de contato em *Pseudomonas aeruginosa*

Dissertação apresentada ao Instituto de Química

da Universidade de São Paulo para a obtenção

do Título de Mestre em Ciências (Bioquímica)

Orientadora: Profa. Dra. Regina Lúcia Baldini

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletronico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

de Oliveira Pereira, Thays

d278r Regulação da expressão de pioverdina dependente de contato em *Pseudomonas aeruginosa* / Thays de Oliveira Pereira. - São Paulo, 2018.

122 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador: Baldini, Regina Lucia

1. Microbiologia. 2. Regulação gênica. 3. Expressão de fatores de virulência. 4. *Pseudomonas aeruginosa*. I. T. II. Baldini, Regina Lucia, orientador.

Agradecimentos

Agradeço muito, do fundo do coração, à minha mãe, minha Lurdinha. E não só por ter me apoiado durante o meu mestrado, mas por sempre ter me incentivado e motivado. O meu interesse científico é fruto do seu incentivo e o seu apoio sempre me fez ir mais longe. Eu nem tenho palavras para te agradecer, mãe.

À minha família pelo apoio, mesmo não entendo muito bem o que eu faço. Vocês estão no meu coração.

À minha orientadora Regina Baldini por ter me acolhido e guiado durante todos esses anos no laboratório. O meu amadurecimento e discernimento na Ciência eu devo ao seu trabalho, não apenas diretamente, mas também indiretamente. A senhora montou um grupo dinâmico e forte, que sempre me desafiou. Também agraço as oportunidades que a senhora me ofereceu, dentre elas o desenvolvimento no meu estágio no exterior. Muito obrigada, Regina.

Aos meus colegas de laboratório por terem me aturado e desafiado: Ana Paula, Ana Laura, Gian, Gilberto, Larissa, Duílio, Rinaldo e Caio. Um agradecimento especial ao Gian e ao Gil por terem me acolhido durante a minha Iniciação Científica e ao Caio, por me fazer acreditar que minhas habilidades didáticas não são tão ruins assim... além de sempre me fazer rir.

À Profa. Dra. Suely Lopes pelo apoio e disponibilidade do espaço físico, além dos ótimos conselhos. Agradeço também pelas histórias do Instituto... sempre bom entender melhor o nosso ambiente.

Aos docentes que participaram da minha banca de qualificação, Profa. Dra. Aline Maria da Silva, Profa. Dra. Maria Julia Manso Alves e a Profa. Dra. Flávia Vischi Winck, pelas críticas e sugestões.

Ao Institut Armand-Frappier e, especialmente, ao grupo do Prof. Dr. Éric Déziel por ter me acolhido tão calorosamente durante o meu estágio. O desafio científico e o pessoal, de trabalhar num grupo diferente e me relacionar com pessoas novas, foram muito enriquecedores e, por isso, eu jamais vou esquecer. Muito obrigada Éric Déziel, Marie-Christine Groleau, Pauline, Anissa, Carlos e Gérman.

À Sandra Mara, que além de auxiliar com o trabalho de base no laboratório, tem ótimos conselhos de vida. Obrigada por sempre me escutar, sendo pra pedir meios de cultura ou contar sobre a minha vida.

À Luci Navarro... sentimos muito a sua falta no laboratório!

À Doris pelo trabalho de base e pelo sorriso constante no rosto, que é muito reconfortante.

Agradeço aos meus amigos de corredor, que sempre estiveram ali quando foi preciso. Agradeço de todo coração o meu querido Bazz e o Douglas... sempre bom a companhia de quem passa pelos mesmos desafios que você, num contexto acadêmico. Obrigada meus amores.

Aos meus amigos fora do Instituto, que estão aqui pra ajudar a manter a minha sanidade e lembrar que nem tudo se resume ao laboratório... agradeço àqueles que estão comigo desde o Ensino Médio – Fernanda, Scuba, Cold, Rapha, Gui, Batman e Thiago e aos que estão comigo desde que eu me lembre: Raíssa e minha amiga-irmã Jéssica. Agradeço também ao Kévin pelo apoio, que permanece.

Ao Franklin por estar ao meu lado e me fazer sorrir. Obrigada pelo apoio e pelo carinho, eles têm sido essenciais pra mim.

Gostaria de agradecer, de forma geral, a todos que estiveram e estão ao meu lado. A gente aprende um pouco com cada experiência e, sem vocês, eu não seria a pessoa que eu sou hoje.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos FAPESP nº 2015/09920-0 e 2016/21360-3, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento deste projeto.

Resumo

de Oliveira Pereira, T. **Regulação da expressão de pioverdina dependente de contato em *Pseudomonas aeruginosa***, 2018. 121p. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A gama-proteobactéria *Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno oportunista humano frequentemente associado a pacientes com queimadura grave e aos portadores de fibrose cística. O estabelecimento de infecção depende de uma série de fatores que contribuem para a virulência deste patógeno, dentre eles a produção de sideróforos e outros sistemas de captação de ferro. Pioverdina é o principal sideróforo sintetizado por bactérias do gênero *Pseudomonas* e linhagens deficientes na sua produção são incapazes de estabelecer infecção em modelos animais. A regulação da biossíntese deste sideróforo envolve a agregação entre as células, indicando a dependência de contato para completa indução da sua produção. O contato com uma superfície altera o comportamento das células e diversos fenótipos são dependentes deste sinal mecânico. PrlC é uma oligopeptidase A putativamente envolvida na degradação de peptídeo-sinais e PA14_00800, uma pequena proteína com domínio de função desconhecida, codificada por um gene imediatamente à jusante de *prlC*. Existem poucos trabalhos na literatura sobre PrlC e seus homólogos e nenhuma informação sobre PA14_00800. Este trabalho teve como objetivo elucidar o envolvimento de PrlC e PA14_00800 na regulação da produção de pioverdina por células em contato com uma superfície. Para estabelecer uma correlação na expressão destes genes, um estudo da organização gênica foi realizado por RT-PCR, confirmando que eles fazem parte do mesmo operon e, portanto, que a expressão destes genes é regulada pelos mesmos fatores. Ensaios classicamente modulados pelo segundo mensageiro c-di-GMP, como formação de biofilme e motilidade, não apresentaram variações nas linhagens mutantes Δ*prlC*, Δ*PA14_00800* ou Δoperon, indicando que a deleção destes genes não altera significativamente os níveis de c-di-GMP nas células. A motilidade do tipo *swarming* é, no entanto, severamente afetada na linhagem Δ*PA14_00800* quando o meio de cultura não contém cloreto de cálcio e glicose, indicando um defeito na sinalização celular ou requerimento energértico desta linhagem nestas condições. PA14_00800 regula a fluorescência de *P. aeruginosa* em meio sólido e semissólido, mas não em meio líquido. Esta fluorescência depende tanto de pioverdina quanto de PQS, uma

molécula de comunicação celular fluorescente, e a possibilidade de outros fatores estarem envolvidos neste fenótipo ainda está sob investigação. Análise do transcritoma por RNASeq com a linhagem Δ*PA14_00800* comparada à linhagem parental foi realizada a partir de colônias destas linhagens crescidas em M9 modificado. Genes envolvidos no sistema de secreção do tipo III e do tipo VI e na biossíntese de PQS apareceram dentre os genes diferencialmente expressos, bem como genes para o catabolismo de glicose. Este trabalho foi o primeiro a investigar o papel de PA14_00800 na fisiologia de *P. aeruginosa*, e os conhecimentos adquiridos aqui podem ser transpostos, com cautela, para compreensão da função dos homólogos de PA14_00800 em outras bactérias.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*, pioverdina, *swarming*, fatores de virulência, PQS, regulação gênica dependente de contato.

Abstract

de Oliveira Pereira, T. **Regulation of surface-dependent pyoverdine expression in *Pseudomonas aeruginosa***, 2018. 121p. Masters Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The gamma-proteobacterium *Pseudomonas aeruginosa* is a human opportunistic pathogen frequently associated with patients with severe burns and those with cystic fibrosis. The establishment of infection depends on several factors that contribute to the virulence of this pathogen, among them siderophore production and other iron uptake systems. Pyoverdine is the main siderophore synthesized by the bacteria of the genus *Pseudomonas* and pyoverdine-deficient strains are unable to establish infection in animal models. The regulation of biosynthesis of this siderophore involves cell aggregation, indicating contact dependency for complete induction of pyoverdine production. Surface contact alters cell behavior and several phenotypes are dependent on this mechanical cue. PrlC is an oligopeptidase A putatively involved in peptide-signals degradation and PA14_00800, a small protein with a domain of unknown function, encoded by a gene immediately downstream of *prlC*. There are few papers in the literature on PrlC and its homologues and no information on PA14_00800. This work aimed to elucidate the role of PrlC and PA14_00800 in surface-dependent regulation of pyoverdine production. To establish a correlation in the expression of these genes, a study of the gene organization was performed by RT-PCR, confirming that they are part of an operon and therefore the expression of these genes is regulated by the same factors. Traits classically modulated by the second messenger c-di-GMP, such as biofilm formation and motility, did not show variations in the Δ*prlC*, Δ*PA14_00800* or Δ*operon*, indicating that the deletion of these genes does not significantly alter the levels of c-di-GMP within the cells. Swarming motility is, however, severely affected in the strain Δ*PA14_00800* when the culture medium does not contain calcium chloride and glucose, indicating a cell signaling defect or energetic requirement under these conditions. PA14_00800 regulates surface-dependent fluorescence of *P. aeruginosa*, in solid and semi-solid medium. This fluorescence depends on both pyoverdine and PQS, a fluorescent cell-to-cell communication molecule, and the investigation of other putative factors involved in this phenotype is still under study. Transcriptomic analysis by RNASeq with the strain Δ*PA14_00800* compared to PA14 was performed from colonies of

these strains grown in modified M9 1% agar. Genes involved in the type III and type VI secretion systems, in PQS biosynthesis and glucose catabolism were differentially expressed. This work was the first to investigate the role of PA14_00800 in the physiology of *P. aeruginosa*, and the knowledge obtained here can be cautiously transposed to understanding the role of PA14_00800 homologues in other bacteria.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, pyoverdine, swarming, virulence factors, PQS, surface-dependent gene regulation.

Sumário

1. Introdução 13
1.1. *Pseudomonas aeruginosa* ..... **Erro! Indicador não definido.**
1.1.1. A linhagem UCBPP-PA14 14
1.2. Importância do ferro em sistemas biológicos 15
1.2.1. *P. aeruginosa* usa diversos sistemas de captação de ferro 15
1.2.1.1. Pioverdina 18
1.2.1.1.1. Pioverdina e infecção por *P. aeruginosa* 21
1.2.1.1.2. Regulação da biossíntese de pioverdina 22
1.2.1.1.2.1. A percepção de estímulos mecânicos atua na expressão gênica 25
1.3. Motilidade do tipo *swarming* 27
1.4. PrlC e PA14_00800 29
2. Objetivos 31
3. Material e Métodos 32
3.1. Linhagens, Plasmídeos e Condições de Cultivo 32
3.2. Técnicas básicas de Biologia Molecular 32
3.3. Construção das linhagens utilizadas neste trabalho 37
3.3.1. Mutantes de deleção não-polares 37
3.3.2. Complementação de *PA14_00800* integrada no cromossomo 38
3.3.3. Transformação com DNA genômico de *pvdA* 38
3.4. Ensaios de motilidade 39
3.4.1. *Swimming* 39
3.4.2. *Swarming* 39
3.5. Ensaio de iniciação de biofilme 39
3.6. Trancriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e RT-PCR quantitativa (qRT-PCR) 40
3.7. Leituras de fluorescência 41
3.8. Detecção da presença de ramnolipídeos 42
3.9. Quantificação de HHQ e PQS 42
3.10. Análise da expressão gênica com base no gene repórter *lacZ* 42
3.11. Sequenciamento de RNA 43
3.11.1. Análise do sequenciamento de RNA 44
4. Resultados e Discussão 46
4.1. A fluorescência de colônias de *swarming* não depende de *prlC* 46
4.2. Estudo da organização gênica 47
4.3. Caracterização fenotípica das linhagens mutantes 49

4.3.1. Ensaio de iniciação de biofilme 49
4.3.2. Ensaios de *swarming* 52
4.3.2.1. O swarming de ΔPA14_00800 depende da presença de cálcio e glicose 53
4.4. PA14_00800 contribui para o perfil de fluorescência de colônias de *P. aeruginosa* 60
4.4.1. PA14_00800 regula a produção de pioverdina dependente de contato com uma superfície61
4.4.2. A fluorescência de *P. aeruginosa* não depende somente de pioverdina 65
4.4.2.1. A fluorescência das colônias é parcialmente dependente de PQS 69
4.4.2.2. Fluorescência de P. aeruginosa em meio sólido 71
4.5. Perfil transcriptômico da linhagem Δ*PA14_00800* 72
4.5.1. Sistema de secreção do tipo III 75
4.5.2. Genes da via de biossíntese de PQS 78
4.5.3. Genes de transporte e catabolismo de glicose 79
4.6. PA14_00800 tem efeito positivo na expressão de RsmZ 83
4.7. Considerações finais 86
5. Conclusões 90
6. Referências Bibliográficas 91
Apêndice 105

1. Introdução

1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é uma proteobactéria do grupo gama que apresenta um amplo repertório genético (Stover *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2006). Tal característica é base da versatilidade deste patógeno e possibilita, por exemplo, a metabolização de diferentes fontes de carbono e nitrogênio, assim como o crescimento em aerobiose e anaerobiose. A adaptabilidade de *P. aeruginosa* é refletida na sua ubiquidade, sendo frequentemente encontrada em amostras de solo e de água, e em associação com diversos hospedeiros, tais como plantas, nematódeos, insetos e mamíferos (Snouwaert *et al.*, 1992; Rahme *et al.*, 1997, 2000; Tan *et al.*, 1999; Potvin *et al.*, 2003; Apidianakis and Rahme, 2009). Em humanos, esse patógeno comporta-se como oportunista, colonizando aqueles cujo sistema imune encontra-se comprometido ou cujas barreiras naturais foram prejudicadas. *P. aeruginosa* é frequentemente associada a infecções em pacientes neutropênicos sob quimioterapia, portadores de AIDS, de fibrose cística ou com queimaduras graves; esse patógeno pode também ser responsável por quadros como bacteremia, ceratite e infecção crônica respiratória (Lyczak *et al.*, 2000). *P. aeruginosa* é frequentemente associada a infecções hospitalares, devido a sua habilidade de se aderir a materiais, tais como próteses, cateteres e ventiladores. Estima-se que 10-20% das infecções adquiridas no ambiente hospitalar sejam causadas por esse patógeno (Bodey *et al.*, 1983).

As infecções causadas por *P. aeruginosa* são de difícil tratamento devido à resistência inerente desta bactéria a diversas classes de fármacos. A resistência é atribuída, em parte, à presença de bombas de efluxo na membrana e à capacidade de adquirir resistência a antibióticos via mutações. A habilidade de formar biofilme durante infecções persistentes, o que aumenta a resistência aos fármacos e às defesas do hospedeiro, também contribui na

dificuldade de erradicação das infecções por *P. aeruginosa* (Drenkard, 2003). A problemática do tratamento de algumas infecções causadas por *P. aeruginosa* foi, recentemente, reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (WHO, sigla em inglês) que inseriu linhagens de *P. aeruginosa* resistentes à carbapenens numa lista de organismos prioritários, em escala mundial, para guiar esforços científicos em busca de novos fármacos, capazes de combater as infecções por este patógeno (Tacconelli *et al.*, 2018).

Recentemente, tem se buscado novas drogas anti-infectivas, em contraponto a drogas bactericidas e bacteriostáticas, supondo-se que essas drogas não causem uma pressão seletiva que leve a aquisição de resistência do patógeno e tendo como alvo a inibição de fatores envolvidos com sua virulência, ao invés da sobrevivência (Lesic *et al.*, 2007; Wiehlmann *et al.*, 2007). Para que essa busca tenha sucesso, os mecanismos responsáveis pela patogenicidade precisam ser entendidos em detalhes. Assim, torna-se cada vez mais relevante a busca por estratégias alternativas de tratamento contra *P. aeruginosa*, com interesse crescente de vários grupos de pesquisa, tanto básica quanto aplicada, na compreensão de seus mecanismos de adaptação e de patogenicidade.

1.1.1. A linhagem UCBPP-PA14

A linhagem UCBPP-PA14 (Rahme *et al.*, 1995; Schroth *et al.*, 2018), a partir daqui referida como PA14, é um isolado de queimadura humano virulento em diversos hospedeiros, e é um dos grupos clonais mais difundidos no mundo e entre pacientes de fibrose cística (Cramer *et al.*, 2011; De Soyza *et al.*, 2013). Frequentemente comparada com a linhagem PAO1, a primeira de *P. aeruginosa* a ser sequenciada (Stover *et al.*, 2000), há uma alta conservação genômica entre as linhagens, mesmo considerando a diferença da virulência das mesmas (Lee *et al.*, 2006). A presença de duas ilhas de patogenicidade em PA14 pode contribuir para a maior virulência desta linhagem em relação a PAO1 (He *et al.*, 2004), apesar

dos genes específicos de PA14 não se relacionarem diretamente com o nível de virulência (Lee *et al.*, 2006).

1.2. Importância do ferro em sistemas biológicos

O ferro atua como cofator para muitas enzimas redox-dependentes. Processos vitais para a manutenção de vida, tais como a fotossíntese, a respiração, a fixação de nitrogênio e a biossíntese de nucleotídeos são exemplos da importância da disponibilidade desse micronutriente (Guerinot, 1994). Embora o ferro seja extremamente abundante na crosta terrestre, em pH fisiológico e ambiente aeróbio a sua solubilidade é extremamente baixa (aproximadamente 1,4 x 10^{-9} M), uma vez que ele se encontra predominante na sua forma oxidada: íon férrico (Fe^{3+}) (Ratledge and Dover, 2000). Em sistemas biológicos, o ferro está associado com macromoléculas como heme, ferritinas e transferritinas, diminuindo ainda mais a disponibilidade desse elemento. A concentração de ferro livre nos fluídos biológicos é estimada em 10^{-18} M (Raymond and Carrano, 1979). Portanto, a concentração de ferro livre é extremamente baixa para que haja crescimento bacteriano na maioria dos biótopos de microrganismos.

1.2.1. *P. aeruginosa* usa diversos sistemas de captação de ferro

Como mencionado, os organismos patogênicos são confrontados com a constante limitação de ferro livre e, para permitir a sobrevivência durante a infecção e a competição com outros organismos, *P. aeruginosa* emprega diferentes estratégias para sua captação (Cornelis and Dingemans, 2013).

A produção de pequenas moléculas quelantes, com alta afinidade ao Fe^{+3}, chamadas de sideróforos, e o reconhecimento e o transporte de volta às células dos ferrisideróforos por receptores dependentes de TonB (TBDR) é a alternativa mais difundida no domínio Bacteria para a captação de ferro insolúvel. *P. aeruginosa* sintetiza dois sideróforos, pioverdina e

pioquelina. Dentre as características-chave que os distinguem estão a complexidade na síntese e a afinidade ao Fe^{+3}. Pioquelina, o sideróforo secundário de *P. aeruginosa*, tem afinidade reduzida ao Fe^{+3} quando comparado à pioverdina (Brandel *et al.*, 2012), mas requer menos genes para sua biossíntese. *P. aeruginosa* produz primeiramente pioquelina e só inicia a síntese de pioverdina, altamente eficiente e metabolicamente custosa, quando as concentrações de ferro extracelulares são mais limitantes (Dumas *et al.*, 2013).

TBDRs estão envolvidos, majoritariamente, no reconhecimento e no transporte de ferrisideróforos ao periplasma. A função de alguns destes receptores é bem caracterizada, como é o caso dos receptores de pioverdina FpvA e FpvB (Schalk *et al.*, 2001; Ghysels *et al.*, 2004), assim como o de pioquelina FptA (Heinrichs *et al.*, 1991; Ankenbauer, 1992). Os outros receptores são responsáveis pela captação de ferro de fontes heterólogas, estando envolvidos no reconhecimento de sideróforos produzidos por outros microrganismos (xenosideróforos) ou na utilização do grupo heme. As linhagens de *P. aeruginosa* possuem, em geral, mais de 30 genes que codificam TBDRs, permitindo a utilização de diversos xenosideróforos e, portanto, de uma gama diversa de fontes de ferro (Cornelis and Bodilis, 2009). A função de alguns desses receptores são caracterizadas, como o reconhecimento de enterobactina, sideróforo sintetizado por *Escherichia coli*, por PfeA e PirA (Dean and Poole, 1993; Ghysels *et al.*, 2005) ou vibriobactina, produzida por *Vibrio cholerae*, via FvbA (Elias *et al.*, 2011).

P. aeruginosa é capaz de utilizar o grupo heme de hemoproteínas produzidas pelo hospedeiro ou do ambiente pelos sistemas Has e Phu (Ochsner *et al.*, 2000). Como o grupo heme não está livre, uma dissociação entre o grupamento e a proteína deve acontecer para que o ferro ali contido seja utilizado pela célula. No sistema Phu, o grupo heme é diretamente extraído por PhuR, um TBDR, enquanto o sistema Has depende da secreção de uma proteína, o hemóforo HasA. O complexo hemóforo-heme é reconhecido por outro TBDR, HasR, e, então,

translocado ao periplasma. Uma vez no periplasma, o grupo heme se associa a uma proteína de ligação periplasmática que guia o transporte do grupamento ao citoplasma, via transportador tipo ABC. A degradação do grupo heme ocorre pela ação conjunta de PhuS e da heme-oxigenase HemO, culminando nos produtos biliverdina, CO e Fe^{+2} (Lee *et al.*, 2014, 2017).

Ambientes anaeróbios e de microaerofilia ocorrem durante a infecção e já foram relatados no muco de pacientes de fibrose cística, onde *P. aeruginosa* forma biofilme (Yoon *et al.*, 2002). Em ambientes como este, com baixo oxigênio, é possível encontrar íon ferroso, a forma solúvel de ferro. Neste caso, ocorre a difusão de ferro pela membrana externa e o transporte para dentro da célula é dependente do sistema FeoABC (Cartron *et al.*, 2006). Alguns compostos com atividade redox, tal como o precursor de piocianina, fenazina-1-carboxílica (PCA), são capazes de reduzir Fe^{+3} associado a proteínas e torná-lo disponível às células pelo sistema Feo (Wang *et al.*, 2011).

Os diversos sistemas de captação de ferro de *P. aeruginosa* auxiliam na adaptabilidade desta bactéria. Como já foi mencionado, há uma mudança no perfil de produção de sideróforos em resposta à concentração extracelular de ferro, indo de um sideróforo pouco eficiente (pioquelina) para um mais eficiente (pioverdina), mas metabolicamente mais custoso (Dumas *et al.*, 2013). A estratégia de utilização de ferro por *P. aeruginosa* pode ser observada também durante a infecção num pulmão com fibrose cística. No início da colonização, a produção de pioverdina, considerada um bem comum da população, ocorre no sítio de infecção. Durante o curso da infecção, no entanto, há um acúmulo em mutações nos genes necessários para a síntese deste sideróforo em alguns indivíduos, resultando numa proporção progressivamente menor de células de *P. aeruginosa* capazes de sintetizar pioverdina. Os sistemas de reconhecimento e captação de ferripioverdina são mantidos na população até

que a proporção de células produtoras de pioverdina seja virtualmente nula, evidenciando o fato de células trapaceiras não-produtoras, *cheaters*, se beneficiarem da disponibilidade de uma molécula metabolicamente custosa. O acúmulo de mutações no receptor começa a acontecer quando as células produtoras de pioverdina deixam de existir na população (Andersen *et al.*, 2015). A inabilidade de produzir pioverdina não compromete a capacidade de captar ferro em infecções já estabelecidas, por haver o acúmulo de danos no tecido pulmonar e consequente liberação de hemoproteínas, assim como a presença de microambientes microaerofílicos.

1.2.1.1. Pioverdina

Pioverdina designa uma classe de sideróforos produzida pelos membros fluorescentes do gênero *Pseudomonas*. São conhecidas mais de 50 estruturas para pioverdina, que têm como característica unificadora uma cadeia peptídica de 6-12 resíduos de aminoácidos cuja sequência é espécie-específica, ligada a um cromóforo derivado de 2,3-diamino-6,7-dihidroxiquinolina, conferindo a molécula coloração amarelo-esverdeada e fluorescência (Visca *et al.*, 2007). Três variações de pioverdina, conhecidas como PVDI, PVDII ou PVDIII, foram descritas para linhagens de *P. aeruginosa*, sendo que cada linhagem é capaz de sintetizar apenas uma destas moléculas (Meyer *et al.*, 1997). PVD I, sideróforo produzido pelas linhagens PAO1 e PA14, é caracterizado por um octapeptídeo parcialmente cíclico ligado ao cromóforo (Demange *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 2005).

A via de biossíntese de pioverdina e os mecanismos de aquisição de ferro por este sistema só foram investigados no nível molecular em *P. aeruginosa* PAO1. Pioverdinas são sintetizadas por peptídeo sintases não-ribossomais (NRPSs), numa via que envolve múltiplas sintases e enzimas acessórias que fornecem aminoácidos não-proteogênicos precursores, tal como D-isômeros (Visca *et al.*, 2007). Os produtos de outros genes, que fazem parte de

clusters de genes *pvd*, também são requeridos para a síntese do sideróforo, apesar de nem todos terem sua função caracterizada. O início da biossíntese ocorre no citoplasma pela ação sequencial de NRPSs, iniciada por PvdL, responsável pela síntese do esqueleto do cromóforo. PvdL é a única NRPS envolvida na síntese de pioverdina conservada em todos os genomas analisados (Smith *et al.*, 2005). A ação sequencial das outras NRPS é responsável pela síntese do curto peptídeo associado ao cromóforo (Schalk and Guillon, 2013). O produto citoplasmático, ferribactina acetilada, ainda não fluorescente, é transportado ao periplasma por PvdE (Yeterian *et al.*, 2010). Várias modificações na estrutura do sideróforo ocorrem no periplasma, tais como a deacetilação da molécula por PvdQ e a posterior ciclização do cromóforo, via cascata oxidativa, conferindo a fluorescência característica da pioverdina na ausência de Fe^{+3} (Dorrestein *et al.*, 2003; Yeterian *et al.*, 2010). Pioverdina recém-sintetizada pode ser armazenada no periplasma (Yeterian *et al.*, 2010), facilitando a secreção rápida e em grandes quantidades quando há carência de ferro intracelular. O processo de secreção de pioverdina do periplasma ao meio extracelular ocorre via pelo menos dois sistemas de secreção distintos: PvdRT-OmpQ e outro(s) sistema(s) ainda desconhecido(s) (Hannauer *et al.*, 2010). Uma vez no espaço extracelular, a pioverdina liga-se ao íon férrico e o complexo ferripioverdina é reconhecido e translocado para o periplasma pelos receptores FpvA e FpvB, transportadores dependentes de TonB (Schalk *et al.*, 2001; Ghysels *et al.*, 2004). O processo de liberação de ferro da molécula de pioverdina ocorre no periplasma, diferentemente do descrito para outros sideróforos bem caracterizados, numa via que não envolve modificações químicas à molécula e sim a redução do íon associado a ela por FpvG, uma proteína de membrana com atividade redutase, e FpvC, que atua como quelante e favorece a dissociação do íon Fe^{+2} da pioverdina (Ganne *et al.*, 2017). A pioverdina livre é secretada novamente ao

meio extracelular via PvdRT-OpmQ, num processo de reciclagem **(Figura 1)** (Imperi *et al.*, 2009).

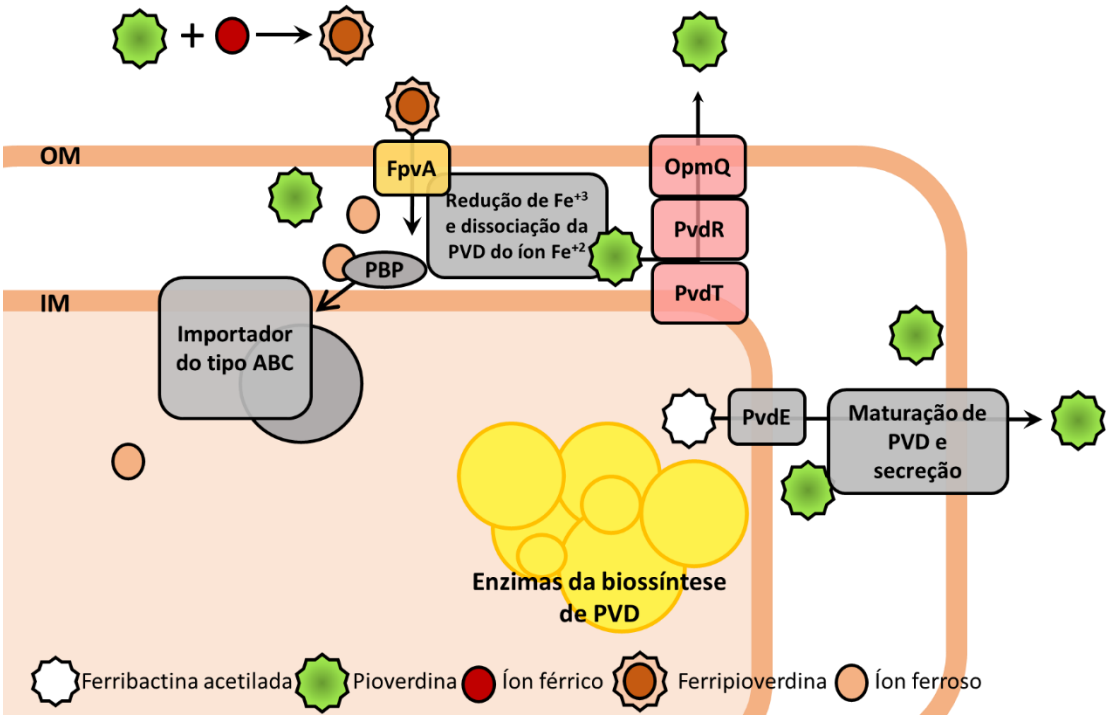

Figura 1. **O tráfego de pioverdina pelo envelope celular de *P. aeruginosa*.** Ferribactina acetilada, precursor não-fluorescente de pioverdina, é sintetizada no citoplasma e translocada ao periplasma por PvdE, um transportador do tipo ABC. A maturação da pioverdina, que inclui a ciclização do cromóforo, ocorre no periplasma e confere coloração e fluorescência à molécula. Pioverdina é secretada pelo sistema PvdTR-OpmQ e por outro sistema complementar ainda não descrito. No espaço extracelular, pioverdina se complexa ao íon férrico (Fe^{+3}) e o complexo ferripioverdina é reconhecido e translocado ao periplasma por FpvA. No periplasma, o íon é reduzido e se dissocia da pioverdina. A pioverdina livre é secretada ao meio externo pelo sistema PvdTR-OpmQ e o íon ferroso (Fe^{+2}) é transportado ao citoplasma por um sistema de importação do tipo ABC clássico. Adaptado de (Imperi *et al.*, 2009).

A expressão dos genes necessários para a síntese de pioverdina é modulada pelo fator sigma ECF (*extracytoplasmic function*) PvdS. A expressão do gene *pvdS* é regulada pelo repressor sensível a ferro Fur. Em suma, na presença de ferro intracelular, Fur se liga à região operadora dos genes cuja expressão é ferro-sensível e impede a transcrição dos mesmos; Fe^{2+} age como correpressor nessa situação. A expressão de *pvdS* e a produção de pioverdina só ocorrem, portanto, na ausência de ferro livre (Visca, 2004; Cornelis, 2010).

Pioverdina apresenta mais de um papel na fisiologia de *P. aeruginosa*. Além de quelar o íon férrico, tornando-o disponível para utilização celular, pioverdina atua como uma

molécula sinalizadora. Na presença de pioverdina, o transportador FvpA fica em complexo com FpvR, um fator anti-sigma. Este é capaz de associar-se com dois fatores sigma distintos: PvdS e FpvI. A interação sequestra os fatores sigma e, portanto, os genes que dependem desses fatores para a sua transcrição não são transcritos nessa situação. A ligação de ferripioverdina a FpvA induz a proteólise de FpvR via mudança conformacional. Tanto PvdS como FpvI podem, então, interagir com a RNA polimerase e transcrever os genes alvo. A síntese de dois fatores de virulência extracelulares, a exotoxina A e a endoprotease PrpL são induzidas por este processo, assim como a síntese da própria pioverdina e do receptor FpvA **(Figura 2)** (Lamont *et al.*, 2002; Edgar *et al.*, 2017).

1.2.1.1.1. Pioverdina e infecção por *P. aeruginosa*

A síntese de pioverdina é fundamental para o estabelecimento da infecção por *P. aeruginosa* em modelos de queimadura (Meyer *et al.*, 1996) e infecção pulmonar em camundongos (Takase *et al.*, 2000; Minandri *et al.*, 2016). Pioverdina é detectada em quantidades significativas no escarro de pacientes portadores de fibrose cística (Haas *et al.*, 1991) e análises transcricionais mostram que há expressão de *pvdS*, que codifica o fator sigma ECF que induz a síntese de pioverdina, no escarro desses pacientes (Loubens *et al.*, 2002). A captação de ferro, conferida principalmente pela atividade quelante de pioverdina, assim como a cascata de sinalização induzida por este sideróforo, parecem ser aspectos fundamentais para o estabelecimento da infecção (Minandri *et al.*, 2016). Como mencionado anteriormente, a síntese de pioverdina é progressivamente perdida na população no pulmão de pacientes portadores de fibrose cística, indicando que a presença do sideróforo não é necessária em infecções já estabelecidas, provavelmente pelo uso de outros sistemas de captação de ferro nessas condições.

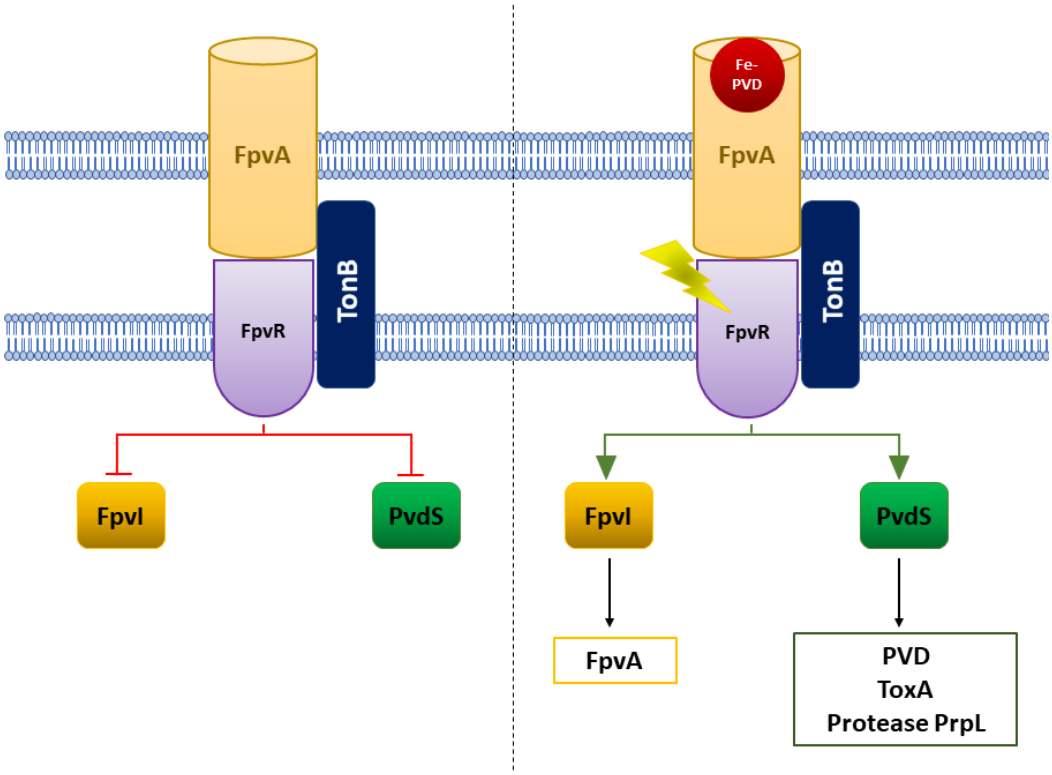

Figura 2. **Cascata de sinalização dependente de pioverdina em *P. aeruginosa*.** O sistema é inativo na ausência de ferripioverdina, estado em que FpvA interage com FpvR, um fator antissigma, que sequestra os fatores sigma FpvI e PvdS, impedindo que os genes regulados por eles sejam transcritos neste cenário (representado no painel à esquerda). O reconhecimento de ferripioverdina por FpvA gera mudança conformacional do receptor, num processo que depende de TonB, e culmina na degradação proteolítica de FpvR, liberando os fatores sigma. A associação destes com o core da RNA polimerase dirige a transcrição dos genes regulados tanto por PvdS, como os genes de biossíntese de pioverdina (*pvd*) e da exotoxina A (*toxA*), quanto por FpvI, como o *fpvA* (painel à direita). Adaptado de (Jimenez *et al.*, 2012).

1.2.1.1.2. Regulação da biossíntese de pioverdina

Como anteriormente mencionado, a biossíntese de pioverdina é metabolicamente custosa e, portanto, sua expressão é regulada por diferentes sistemas em *P. aeruginosa*. O repressor transcricional Fur é central na resposta a baixos níveis de ferro intracelular e sua importância fisiológica é demostrada pelo fato de *fur* ser um gene essencial em *P. aeruginosa* (Vasil and Ochsner, 1999). Fur requer a presença de íon ferroso para sua dimerização e ligação na região operadora dos genes regulados por este repressor, o que culmina na repressão transcricional de um conjunto de genes ferro-sensíveis em células sem limitação nutricional. Dentre os genes regulados pelos níveis intracelulares de ferro, muitos não possuem a sequência consenso de ligação de Fur na região promotora (conhecida com Fur box) (Ochsner

et al., 2002), indício de que a regulação por Fur ocorre tanto direta quanto indiretamente, pela ação de reguladores transcricionais regulados por Fur ou de pequenos RNAs (sRNAs) (Cornelis *et al.*, 2009). Os genes de biossíntese de pioverdina, que estão sob a regulação de PvdS, por exemplo, são indiretamente regulados por Fur.

Recentemente, o sistema de sinalização Gac/Rsm, central na virulência de *P. aeruginosa*, foi relacionado com a regulação de produção de pioverdina neste patógeno (Burrowes *et al.*, 2006; Brencic and Lory, 2009; Frangipani *et al.*, 2014). A mudança do perfil de infecção, entre o agudo e crônico, é modulada por este sistema de dois componentes. A histidina quinase desse sistema, GacS, fosforila do regulador de resposta GacA. Uma vez fosforilado, GacA torna-se ativo e atua positivamente na transcrição de dois sRNAs, RsmY e RsmZ. Estes sRNA atuam de maneira similar e, aparentemente redundante no sequestro das proteínas ligadoras de RNA RsmA e RsmN (Morris *et al.*, 2013). Quando livres, RsmA e RsmN ligam-se a certos mRNAs, promovendo a degradação de transcritos envolvidos na infecção crônica, tais como os relacionados com a formação de biofilme e com o sistema de secreção do tipo VI (T6SS), enquanto favorecem a virulência aguda, mediando a expressão do sistema de secreção do tipo III (T3SS) e motilidade (Parkins *et al.*, 2001; Pessi *et al.*, 2001; Valverde *et al.*, 2003; Heurlier *et al.*, 2004; Burrowes *et al.*, 2006; Mulcahy *et al.*, 2008; Brencic and Lory, 2009; Moscoso *et al.*, 2011; Morris *et al.*, 2013). O envolvimento desta cascata de regulação na biossíntese de pioverdina ocorre pela ação de RsmA, que atua de forma negativa na transcrição de PvdS, e independe da ação do repressor transcricional Fur (Frangipani *et al.*, 2014). A regulação de pioverdina pela cascata de sinalização Gac/Rsm acontece pela interconexão com o metabolismo de c-di-GMP, um segundo mensageiro celular prevalente em bactérias (Frangipani *et al.*, 2014). Altos níveis de c-di-GMP, causados pela ausência de RsmA, culminam no aumento na produção de pioverdina, enquanto a ausência de RsmY/Z,

que diminue indiretamente a concentração intracelular deste nucleotídeo cíclico, culmina na redução de pioverdina em comparação à linhagem selvagem (Frangipani *et al.*, 2014). A regulação de pioverdina pela cascata de sinalização Gac/Rsm, via modulação dos níveis de c-di-GMP, ocorre mesmo na presença de ferro livre, ao contrário do observado para regulação dependente de Fur, representando uma via de regulação da biossíntese de pioverdina que independe de ferro.

A modulação dos níveis de c-di-GMP é suficiente para a regulação da expressão de pioverdina (Frangipani *et al.*, 2014; Visaggio *et al.*, 2015) e, portanto, a atuação da cascata de sinalização Gac/Rsm na biossíntese desse sideróforo é restrita ao controle dos níveis do segundo mensageiro por uma via que permanece elusiva. O nível intracelular de c-di-GMP contribui, por sua vez, na agregação entre as células, uma vez que modula a composição da matriz extracelular, atuando de forma positiva na produção dos exopolissacarídeos Psl e Pel. A agregação entre as células, conferida pela presença destes exopolissacarídeos, está associada positivamente com a biossíntese de pioverdina. É por tal motivo que os níveis elevados de c-di-GMP refletem no aumento deste sideróforo. A biossíntese de pioverdina pode ser recuperada em linhagens defectivas na produção de exopolissacarídeos pela agregação celular artificialmente induzida, num gradiente de concentração de agentes gelificantes, tais como ágar ou Phytagel (Visaggio *et al.*, 2015). É importante notar que este estudo foi realizado com a linhagem PAO1, capaz de produzir tanto o polissacarídeo Psl quanto Pel (Friedman and Kolter, 2004b). A linhagem em estudo neste trabalho, PA14, sintetiza apenas o polissacarídeo Pel (Friedman and Kolter, 2004a). Outro ponto interessante, não muito explorado no estudo, é que a produção dos polissacarídeos promove, além da agregação celular, a adesão a superfícies. De tal forma, a indução da produção de pioverdina

em resposta aos polissacarídeos pode ocorrer, pelo menos parcialmente, em resposta ao contato com uma superfície.

1.2.1.1.2.1. A percepção de estímulos mecânicos atua na expressão gênica

Os sistemas de regulação bacterianos ajustam a expressão gênica às mudanças no ambiente. As variações ambientais podem ser de natureza química ou física, apesar desta última ser pouco estudada. Recentemente, a percepção mecânica tem sido estudada principalmente para compreensão, no nível bioquímico, das mudanças que ocorrem na transição do estado de vida planctônico para o séssil, etapa inicial na formação de biofilme.

O primeiro contato das células de *P. aeruginosa* com a superfície envolve, provavelmente, a participação do pilus tipo IV (TFP), um apêndice celular sabidamente importante para a adesão das células e formação inicial de biofilme, cuja expressão é regulada positivamente em células crescidas em placas de ágar – em comparação com as células planctônicas (O'Toole and Wong, 2016). Em resposta ao contato inicial, a concentração intracelular do segundo mensageiro cAMP aumenta (Luo *et al.*, 2015; Persat *et al.*, 2015), sendo amplificada pelos ciclos de extensão e retração do TFP (Persat *et al.*, 2015). Este nucleotídeo cíclico derivado de ATP atua na expressão gênica global, uma vez que é o coativador do regulador global de virulência Vfr, homólogo da proteína receptora de cAMP de *E. coli* CRP (*cAMP receptor protein*) (West *et al.*, 1994). Dentre os genes regulados por Vfr-cAMP estão os de biogênese do TFP (Beatson *et al.*, 2002; Wolfgang *et al.*, 2003), criando uma alça de retroalimentação positiva. O estímulo da produção de TFP em resposta a percepção de contato envolve, ainda, a participação do sistema de dois componentes FimS/AlgR (Luo *et al.*, 2015). Estudos de duplo-híbrido sugerem a interação entre este sistema de componentes e o sistema Pil-Chp, previamente mencionado como responsável pelo aumento de cAMP, o

que pode indicar a formação de um complexo de sinalização responsivo à percepção inicial de contato (Luo *et al.*, 2015; Persat *et al.*, 2015).

A regulação positiva do TFP em resposta à percepção de contato reflete no aumento de PilY1, um dos componentes deste sistema. PilY1 foi caracterizada como uma adesina associada ao TFP (Heiniger *et al.*, 2010) e, independentemente, é uma proteína associada a membrana externa que influencia na modulação da produção de c-di-GMP frente à percepção de contato (Luo *et al.*, 2015). A localização de PilY1, que é associada a face externa da membrana externa, é importante para a modulação dos níveis de c-di-GMP (Kuchma *et al.*, 2010). O mecanismo pela qual uma proteína de membrana externa modula os níveis do segundo mensageiro c-di-GMP ainda precisa ser confirmado, mas um modelo envolve algumas proteínas do complexo TFP e a diguanilato ciclase SadC, associada à membrana interna (Luo *et al.*, 2015). A concentração de cAMP também é regulada por PilY1, porém de forma negativa (O'Toole and Wong, 2016). Esta observação vai ao encontro da teoria que as concentrações dos segundos mensageiros são inversa e coordenadamente reguladas (Almblad *et al.*, 2015).

A modulação das concentrações dos segundos mensageiros cAMP e c-di-GMP frente à percepção mecânica já é complexa, apesar dos esforços para a compreensão das alterações bioquímicas que regem esse evento terem se iniciado recentemente. Muitas perguntas permanecem sem resposta, o que tornará essa linha de pesquisa ainda mais intricada. No entanto, este assunto é importante pois mostra, claramente, que a expressão gênica de células planctônicas e sésseis são distintas e, portanto, que as comparações feitas entre estes dois estilos de vida devem ser feitas com muita atenção.

1.3. Motilidade do tipo *swarming*

Swarming é um fenômeno social definido pela translocação coordenada de uma população bacteriana em meio semissólido (Kearns, 2010). Esse tipo de motilidade é complexo, sendo dependente da atividade flagelar e da produção de surfactantes, como a produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* (Köhler *et al.*, 2000). A necessidade de locomoção em superfícies semissólidas, tal como a camada mucosa que reveste a superfície epitelial do pulmão, sítio de infecção por *P. aeruginosa* em pacientes portadores de fibrose cística, evidencia a necessidade de compreensão deste tipo de motilidade (Yeung *et al.*, 2009).

A motilidade do tipo *swarming* de *P. aeruginosa* é modulada por estímulos extracelulares sintetizados pela própria colônia (Tremblay *et al.*, 2007). Ramnolipídeos são glicolipídeos anfipáticos constituídos por L-ramnose e ácido β-hidroxidecanóico. Os ramnolipídeos são sintetizados como uma mistura de congêneres que diferem entre si pelo número de ramnoses e pelo tamanho e grau de saturação da cadeia de ácidos graxos (Déziel *et al.*, 2000; Reis *et al.*, 2011). *P. aeruginosa* secreta tanto monorramnolipídeos (Rha-C10-C10) quanto dirramnolipídeos (Rha2- C10- C10), além de 3-(3-hidroxialcanoiloxi)-alcanoato (HAA), precursor na biossíntese desses componentes (Lépine *et al.*, 2002; Déziel *et al.*, 2003). As células em *swarming* são capazes de sentir e responder a esses estímulos químicos. Os dirramnolipídeos atuam como atrativo para essas células e os HAAs, como repelente. A difusão de dirramnolipídeos em ágar é mais rápida que a de HAAs devido a sua maior solubilidade em meio aquoso, e as células em *swarming* se locomovem a favor do gradiente constituído pela razão entre dirramnolipídeos e HAAs, sendo este último mais concentrado no centro da colônia. Os monorramnolipídeos não atuam como moléculas quimiotáticas e são responsáveis pela umidificação do meio, rompendo a tensão superficial (Tremblay *et al.*, 2007).

A percepção de quórum ativa a produção de ramnolipídeos e, portanto, a motilidade do tipo *swarming* (Köhler *et al.*, 2000). Os genes envolvidos na síntese de ramnolipídeos, *rhlAB* e *rhlC*, são diretamente regulados pelo sistema RhlRI de percepção de quórum (Tremblay *et al.*, 2007). As interações célula-célula são importantes ainda para as características apresentadas por esse tipo de colônia. As células da colônia de *swarming* apresentam, por exemplo, maior resistência a diversos antibióticos quando comparado a células planctônicas, uma característica bastante estudada em células em biofilme (Lai *et al.*, 2009).

A morfologia da colônia de *swarming* de *P. aeruginosa* PA14 é curiosa, sendo representada por padrões dendríticos que formam um fractal (Tremblay and Déziel, 2010) e figuras mostrando esse padrão serão apresentadas na seção de **Resultados** deste trabalho. A diferenciação celular que ocorre durante esse tipo de locomoção envolve o alongamento das células das extremidades da colônia em comparação às do centro e, possivelmente, a síntese de um segundo flagelo polar (Kearns, 2010). A regulação gênica das subpopulações da colônia de *swarming* foi estudada no nível transcricional em *P. aeruginosa* (Overhage *et al.*, 2008; Tremblay and Déziel, 2010). As células da extremidade da colônia são altamente ativas, demonstrado pela regulação positiva de genes envolvidos na cadeia de transporte de elétrons e na síntese de ATP, além de genes cujos produtos estão envolvidos na tradução ou em mecanismos pós-traducionais, como a modificação e degradação de proteínas. As células do centro contêm, em relação às das extremidades, altas concentrações de transcritos relacionados a fatores de virulência extracelulares e a aquisição de ferro. Genes envolvidos na produção de pioverdina estão regulados negativamente nas extremidades dos dendritos em relação ao centro e os autores hipotetizam que este padrão de expressão pode estar relacionado à carência de ferro nas regiões mais populosas, representadas pelo centro das colônias (Tremblay and Déziel, 2010).

1.4. PrlC e PA14_00800

Existem poucos trabalhos na literatura sobre os papéis biológicos da oligopeptidase A PrlC e seus homólogos. A oligopeptidase A foi primeiramente identificada por Vimr et al. em extratos de *Salmonella enterica* pela capacidade de hidrolisar o peptídeo exógeno N-acetiltetra-alanina (AcAla4) (Vimr *et al.*, 1983). Posteriormente, PrlC mostrou-se importante na hidrólise de fragmentos proteicos gerados pela degradação de peptídeos sinais oriundos da ação da protease IV em *E. coli* (Novak and Dev, 1988). Experimentos *in vitro* mostraram que a oligopeptidase A isolada de *E. coli* pode clivar eficientemente os produtos peptídicos formados pelas proteases ATP-dependentes ClpAP, Lon e HslUV (Jain and Chan, 2007).

A proteína PrlC é composta de 681 resíduos de aminoácido, consistindo de uma região de baixa complexidade, que se estende dos resíduos de aminoácido 196 ao 207, e um domínio peptidase M3, dos resíduos 224 ao 676 (Letunic and Bork, 2018). A presença deste domínio é comum aos membros da família de peptidases M3, caracterizadas como metaloendopeptidades dependentes de zinco, com atividade catalítica comumente direcionada a substratos de baixo peso molecular. As enzimas desta família de peptidases contêm o motivo HEXXH conservado e, em conjunto com um resíduo de glutamato na região carboxi-terminal, formam o sítio ativo destas proteínas (Rawlings *et al.*, 2018). A família de endopeptidades M3 é ubíqua e encontra-se nos três domínios taxonômicos, indicando a importância de enzimas que exerçam essa função na manutenção da vida. A região N-terminal da proteína, mesmo sem um domínio predito, é conservada em homólogos de PrlC, indicando a importância dessa região para a função de PrlC.

O gene *prlC* é predito de formar um operon com *PA14_00800*, num contexto gênico conservado em Pseudomonadaceae (pseudomonas.com, (Winsor *et al.*, 2016)(Szklarczyk *et al.*, 2015)). Não há trabalhos sobre a função de *PA14_00800*, gene a jusante de *prlC*, ou de

seus homólogos. PA14_00800 é uma proteína hipotética de 91 resíduos de aminoácido cujo único domínio presente, DUF2387, não tem função conhecida, mas apresenta um provável motivo de ligação a metal (Letunic and Bork, 2018). Ferramentas de bioinformática para predição da estrutura terciária, como Phyre2 (Kelley *et al.*, 2015) ou I-TASSER (Yang *et al.*, 2015), não fornecem uma estrutura confiável da molécula, já que não há proteínas similares cuja estrutura foi resolvida. Portanto, não é possível inferir a função de PA14_00800 com base na similaridade estrutural com proteínas descritas. A organização gênica de *PA14_00800 e prlC*, no entanto, pode indicar o papel desses genes na fisiologia de *P. aeruginosa*, já que genes em operon normalmente atuam na mesma via. A possível interação entre estas proteínas é evidenciada ao nível bioquímico, uma vez que o ponto isoelétrico calculado para PrlC é 4,84, enquanto o de PA14_00800 é 9,01 e, em pH fisiológico, a carga respectiva das proteínas é de -26,04 e 4,1 (Winsor *et al.*, 2016).

Em trabalhos anteriores desenvolvidos pelo nosso grupo, mostramos que os níveis da proteína PrlC variam com os níveis intracelulares de c-di-GMP, que regula negativamente a motilidade em *P. aeruginosa* (Nicastro *et al.*, 2014). Altos níveis intracelulares de c-di-GMP, que induzem o estado séssil da bactéria, regulam positivamente a quantidade de PrlC (Nicastro *et al.*, 2014). Dado semelhante foi encontrado independentemente, reforçando a tese de que os níveis da proteína PrlC estão relacionados aos níveis de c-di-GMP (Chua *et al.*, 2013). A análise fenotípica do mutante *prlC*::mrT7 mostrou defeito na produção de pioverdina em colônia de *swarming*. Dados preliminares mostraram que a produção de pioverdina em meio líquido pela linhagem mutante por transposon em *prlC* é similar à da linhagem selvagem, indicando uma regulação relacionada à diferenciação celular na colônia de *swarming*. Essas observações levantaram a hipótese de que a produção de pioverdina em *P. aeruginosa* em meio sólido é dependente do provável operon *prlC-PA14_00800.*

2. Objetivos

Elucidar o papel de PrlC e PA14_00800 na produção de pioverdina por células em contato com uma superfície.

Objetivos específicos

- Estudar a organização gênica de *prlC* e *PA14_00800*;
- Estudar a função de PrlC e PA14_00800 pela análise fenotípica de mutantes nulos nos respectivos genes;
- Compreender o efeito de PrlC e PA14_00800 na expressão gênica de *P. aeruginosa*.

3. Material e Métodos

3.1. Linhagens, Plasmídeos e Condições de Cultivo

As linhagens e plasmídeos utilizados estão listados na **Tabela 1**. Culturas de *E. coli* e *P. aeruginosa* foram cultivadas rotineiramente em meio LB, a 37°C, acrescido de antibiótico, quando necessário, nas concentrações indicadas: para culturas de *E. coli*, ampicilina 100 µg/mL, canamicina 50 µg/mL ou gentamicina 10 µg/mL e, para *P. aeruginosa*, carbenicilina 300 µg/mL, ácido nalidíxico 20 µg/mL ou gentamicina 50 µg/mL, com e sem a adição de 0,2% de arabinose. Alternativamente, *P. aeruginosa* foi cultivada em meio M9 modificado (20 mM NH_4Cl, 12 mM Na_2HPO_4, 22 mM KH_2PO_4, 8,6 mM NaCl, 1 mM $MgSO_4$, 1 mM $CaCl_2$, 0,2% dextrose e 0,5% casaminoácidos) (Tremblay *et al.*, 2007) ou meio CAA (5 mM K_2HPO_4, 1 mM $MgSO_4$ e 0,5% casaminoácidos)(Ochsner *et al.*, 2002). O meio CAA foi frequentemente suplementado de 0,2% de dextrose ou 1mM de $CaCl_2$, ou ambos.

3.2. Técnicas básicas de Biologia Molecular

Isolamento de DNA plasmidial, digestão, reação de polimerase em cadeia (PCR), ligações, transformações e outras técnicas básicas de Biologia Molecular foram realizadas de acordo com metodologias padrão, descritas em manuais de referência (Sambrook *et al.*, 1989; Ausubel *et al.*, 2001), e protocolos dos fabricantes. O isolamento de DNA genômico de *P. aeruginosa* foi realizado como descrito por Chen e Kuo (Chen and Kuo, 1993). Os oligonucleotídeos utilizados estão listados na **Tabela 2**.

Tabela 1. Linhagens e Plasmídeos

Linhagens ***P. aeruginosa***	**Descrição**	**Referência**
PA14	Linhagem selvagem *P. aeruginosa* UCBPP-PA14	(Rahme *et al.*, 1995)
Δ*prlC*	Deleção de *prlC* em PA14	Este trabalho
Δ*PA14_00800*	Deleção de *PA14_00800* em PA14	Este trabalho
Δ*operon*	Deleção de *prlC* e *PA14_00800* em PA14	Este trabalho
Δ*PA14_00800*::p*00800*	Deleção de *PA14_00800* em PA14, com complementação integrada. Expressão sob controle da sequência regulatória de *PA14_00800*; Tc^R	Este trabalho
Δ*pqsA*	Deleção de *pqsA* em PA14	Este trabalho
pvdA	Mutante por inserção do transposon *mariner* na região codificadora de *pvdA* (ID: 36087); Gm^R	(Liberati *et al.*, 2006)
Δ*pqsA*Δ*PA14_00800*	Deleção de *pqsA* e *PA14_00800* em PA14	Este trabalho
Δ*pqsA pvdA*	Deleção de *pqsA*; *pvdA* inativado pela inserção do transposon *mariner* em PA14; Gm^R	Este trabalho
Δ*PA14_00800 pvdA*	Deleção de *PA14_00800; pvdA* inativado pela inserção do transposon *mariner* em PA14; Gm^R	Este trabalho
Δ*pqsA*Δ*PA14_00800 pvdA*	Deleções de *pqsA* e *PA14_00800; pvdA* inativado pela inserção do transposon *mariner* em PA14; Gm^R	Este trabalho
pelA	Mutante por inserção do transposon *mariner* na região codificadora de *pelA* (ID: 26187); Gm^R	(Liberati *et al.*, 2006)
PA14::CTX *rsmZ lacZ*	Integração da sequência regulatória de *rsmZ* fusionada a *lacZ* em PA14	Este trabalho
PA14::CTX *rsmY lacZ*	Integração da sequência regulatória de *rsmY* fusionada a *lacZ* em PA14	Este trabalho
Δ*PA14_00800*::CTX *rsmZ lacZ*	Integração da sequência regulatória de *rsmZ* fusionada a *lacZ* em Δ*PA14_00800*	Este trabalho
Δ*PA14_00800*::CTX *rsmY lacZ*	Integração da sequência regulatória de *rsmY* fusionada a *lacZ* em Δ*PA14_00800*	Este trabalho
gacA::CTX *rmsZ lacZ*	Integração da sequência regulatória de *rsmZ* fusionada a *lacZ* em *gacA*	Este trabalho
gacA::CTX *rmsY lacZ*	Integração da sequência regulatória de *rsmY* fusionada a *lacZ* em *gacA*	Este trabalho

E. coli		
DH5α	*supE44 lacU169* (80 *lacZ*M15) *hsdR17 recA1 endA11 gyrA96 thi-1 relA1*	Invitrogen
S17-1	*Pro thi recA hsdR* (r- m+) Tpr Smr Kms [Ω RP4-2-Tc::Um-Km::Tn7]	(Simon *et al.*, 1983)
Plasmídeo	**Descrição**	**Referência**
pGEM-T	Vetor de clonagem; Ap^R	Promega
pEX18Ap	Vetor de substituição alélica, *oriT*$^+$*sacB*; Ap^R	(Hoang *et al.*, 1998)
mini-CTX2	Vetor de integração auto proficiente derivado do mini-CTX1; Tc^R	(Hoang *et al.*, 2000)
pEXΔ*prlC*	Regiões à montante e à jusante de *prlC*, clonadas em pEX18Ap; Ap^R	Este trabalho
pEXΔ*PA14_00800*	Regiões à montante e à jusante de *PA14_00800*, clonadas em pEX18Ap; Ap^R	Este trabalho
pEXΔ*operon*	Região à montante de *prlC* e a jusante de *PA14_00800*, clonadas em pEX18Ap; Ap^R	Este trabalho
pEXΔ*pqsA*	Regiões à montante e à jusante de *pqsA*, clonadas em pEX18Ap; Ap^R	Este trabalho
mini-CTX2_seqreg00800	Sequência regulatória (750 pb antes do início de tradução de *prlC*) e *PA14_00800* clonados no mini-CTX2; Tc^R	Este trabalho
pCTX_*rsmZ_lacZ*	Sequência regulatória de *rsmZ* fusionada a *lacZ*	(Brencic *et al.*, 2009)
pCTX_*rsmZ_lacZ*	Sequência regulatória de *rsmY* fusionada a *lacZ*	(Brencic *et al.*, 2009)

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho

Oligonucleotídeo	Sequência (5'-3')	Utilização
prlC1_deleção	**AAGCTT**GGCCGATGAAGTGTTCCA	Deleção de *prlC* e do operon
prlC2_deleção	**GGATCC**TCACGTTGGCAACCTTGG	
prlC3_deleção	**GGATCC**AGTCACTCCGGGCTGGTC	Deleção de *prlC*
prlC4_deleção	**GAATTC**GGCTGGTAGGGGTCGGTA	
PA14_00800_del1_HindIII	**AAGCTT**GACGTACGCCTGTTCGAGA	Deleção de *PA14_00800*
PA14_00800_del2_BamHI	**GGATCC**GCGCTTCCTGGTGATCG	
PA14_00800_del3_BamHI	**GGATCC**AAGCCCGACGCCTGAC	Deleção de *PA14_00800* e do operon
PA14_00800_del4_EcoRI	**GAATTC**CCAGCCATTCCTCGAACA	
(RE)Seq_Reg_Operon_fwd	cggccgctctagaactagtgGCGCGCCAGGTCCGGCTC	Amplificação da sequência regulatória de *prlC* e *PA14_00800*
(RE)Seq_Reg_Operon_rev	ccgggctcatGTTGGCAACCTTGGCTAAGGAAATACCCG	
(RE)PA14_00800_fwd	ggttgccaacATGAGCCCGGCGATCACCAGGAAG	Amplificação da sequência codificadora de *PA14_00800*
(RE)PA14_00800_rev	tatcgataagcttgatatcgGCACCGGACCCCGGCCCA	
pqsA_up_fwd	cctgcaggtcgactctagagACCCACCGGCGAAACCGG	Deleção de *pqsA*
pqsA_up_rev	gcctgaatcaCATGACAGAACGTTCCCTCTTCAGC	
pqsA_down_fwd	ttctgtcatgTGATTCAGGCTGTGGGGGTG	Deleção de *pqsA*
pqsA_down_rev	attcgagctcggtacccgggCGTTCTCGCCGTTCCGCG	
pEX18Ap_fwd	CCCGGGTACCGAGCTCGAAT	Linearização do vetor por PCR
pEX18Ap_rev	CTCTAGAGTCGACCTGCAGGC	
qRT_prlC_left	CAAGCATGTCACCGACGA	qRT-PCR de *prlC*
qRT_prlC_right	GGGGAACTCCAGGCTGAT	
qRT_PA14_00800_left	GTACGCGGGTCAACCAGA	qRT-PCR de *PA14_00800*
qRT_PA14_00800_right	CGTCGGGCTTCTTCTTCA	

Oligonucleotídeo	Sequência (5'-3')	Utilização
nadB_qRT_L	CTACCTGGACATCAGCCACA	Normalizador qRT-PCR
nadB_qRT_R	GGTAATGTCGATGCCGAAGT	
qRT_pscF_up	AACGCAGCGAACAAGGAC	qRT-PCR de *pscF*
qRT_pscF_down	GATGACCGACCACTTGTTGA	
qRT_pscN_up	CGCTATCGCTGGGTGTG	qRT-PCR de *pscN*
qRT_pscN_down	GCCAGCAGGGTGCTCTT	
qRT_pscL_up	GCGCTGCAATCGCTACTA	qRT-PCR de *pscL*
qRT_pscL_down	CCAGGGTCAGCTCGACAG	
qRT_popD_up	AGCGTCGAGCTTCTGCTG	qRT-PCR de *popD*
qRT_popD_down	CTTCTGCGCGTGGATGAT	
qRT_exsA_up	GGGAAAGGACAGCCGAAT	qRT-PCR de *exsA*
qRT_exsA_down	GTCGCAACGCTCGACTTC	
qRT_exsD_up	TGCGGCAGATTCTCCTCT	qRT-PCR de *exsD*
qRT_exsD_down	GCAGGACCCAATCGATCA	
qRT_exsC_up	GCGAGCGTCTGTTGCTG	qRT-PCR de *exsC*
qRT_exsC_down	CGAAGCCGAAATGCAGAT	
qRT_exoT_up	CGCCGAGATCAAGCAGAT	qRT-PCR de *exoT*
qRT_exoT_down	TCCTTCGCCAGTCTCTCC	
qRT_exoU_up	CACTCTGCGCCAGTTTGA	qRT-PCR de *exoU*
qRT_exoU_down	AGCATTGCTCCCGGGTAT	
qRT_exoY_up	GCGGGGTTCATCTGTGTC	qRT-PCR de *exoY*
qRT_exoY_down	TATAGGCTCCGCCATCCA	

Oligonucleotídeo	Sequência (5'-3')	Utilização
RT_prlC/PA14_00800_left	CTCGCGTTTCGAGGAAGA	Confirmação da organização gênica por RT-PCR
RT_prlC/PA14_00800_right	GCTCCTTCGGGATCGACT	

Nucleotídeos em negrito representam sítios de restrição;

Nucleotídeos em letra minúscula representam as regiões que são complementares ao vetor e/ou demais fragmentos.

3.3. Construção das linhagens utilizadas neste trabalho

3.3.1. Mutantes de deleção não-polares

Oligonucleotídeos foram desenhados afim de amplificar as regiões a montante e jusante dos genes de interesse (**Tabela 2**). Os iniciadores de DNA foram desenhados com sítios de restrição específicos ou com sequências de nucleotídeos complementares ao vetor pEX18Ap e ao segundo fragmento que foi utilizado na mesma clonagem, utilizando uma clonagem independente de sequência e ligação (SLIC, *sequence and ligation-independent cloning*) (Jeong *et al.*, 2012). Os amplicons que continham sítios de restrição foram subclonados no vetor de clonagem pGEM-T (Promega) em DH5α termocompetentes. A confirmação de clonagem foi feita pelo perfil de restrição e posterior sequenciamento dos plasmídeos. Reações de digestão com as enzimas específicas contidas nos amplicons foram feitas, a fim de cloná-los em pEX18Ap – previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição, em uma reação dependente da T4 DNA ligase (Thermo Fisher), conforme protocolo do fabricante. Os plasmídeos foram confirmados tanto pelo perfil de digestão quanto por PCR. No caso do SLIC, os fragmentos foram amplificados usando a Q5 DNA polimerase (NEB) e purificados com o kit GeneJET (Thermo). Uma reação, baseada na atividade de exonuclease 3'-5' da T4 DNA polimerase (Thermo), com os amplicons purificados e o pEX18Ap previamente linearizado por PCR, foi transformada em células DH5α. Os transformantes foram confirmados por PCR e, caso pertinente, perfil de restrição. Todas as clonagens, já em pEX18Ap, foram

transformadas em S17-1 por choque térmico. Os vetores foram introduzidos nas linhagens de interesse por conjugação. A recombinação homóloga, evento que integra o vetor no cromossomo na região de homologia ao vetor, faz com que os primeiro-recombinantes tenham característica específicas tais como a resistência à carbenicilina e sensibilidade à sacarose, dada pela presença do gene *sacB* no vetor. O segundo evento de recombinação ocorre naturalmente e os clones foram selecionados utilizando sacarose como contra-seleção (Hmelo *et al.*, 2015).

3.3.2. Complementação de *PA14_00800* integrada no cromossomo

A complementação da linhagem Δ*PA14_00800* foi realizada pela integração de *PA14_00800* no cromossomo no sítio *attP* (Hoang *et al.*, 2000). Para tal, a sequência regulatória prevista de *PA14_00800*, de 750 pb à montante do início de tradução de *prlC*, foi clonada no vetor mini-CTX2, previamente linearizado com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI, juntamente com a sequência codificadora de *PA14_00800*, por SLIC. Após confirmação por PCR e perfil de digestão, o plasmídeo foi transferido para S17-1. A construção foi inserida na linhagem de interesse por conjugação e a seleção ocorreu com o uso de placas de tetraciclina acrescidas de ácido nalidíxico.

3.3.3. Transformação com DNA genômico de *pvdA*

A maioria dos clones da biblioteca de mutantes PA14NR (Liberati *et al.*, 2006) é resistente à gentamicina, visto a presença de um cassete de resistência a este antibiótico em um dos transposons utilizados para construí-la. O mutante *pvdA* (ID: 36087), deficiente na produção de pioverdina, foi isolado desta biblioteca e sua identidade foi confirmada pela incapacidade de produção deste sideróforo em meio pobre em ferro. Uma vez confirmado, as linhagens de interesse (mutantes de deleção em *PA14_00800*, *prlC* e *pqs*) foram transformadas com 1 µg do DNA genômico extraído de *pvdA*. Os transformantes foram

selecionados em placas contendo 5 µg/mL de gentamicina e cultivados em meio pobre em ferro para confirmação fenotípica. Apenas os clones incapazes de produzir pioverdina foram selecionados.

3.4. Ensaios de motilidade

Ensaios de caracterização fenotípica baseados na motilidade celular foram realizados conforme anteriormente descritos, com algumas modificações importantes descritas abaixo.

3.4.1. *Swimming*

Placas de M9 modificado ou CAA, acrescido de cálcio ou glicose ou ambos, foram solidificadas com 0,3% de ágar (BD Difco). Cada placa continha 20 mL de meio e permaneceu aberta, permitindo a secagem parcial, por 30 minutos, no centro do fluxo laminar. 5 µl de culturas na fase exponencial tardia (DO_{600}=3) foram inoculados no centro das placas, que foram incubadas, dentro de sacos plásticos, a 30°C ou 34°C, por 16 horas.

3.4.2. *Swarming*

5 µl de culturas na fase final do crescimento exponencial foram inoculados no centro de placas de M9 modificado ou CAA – com adição de cálcio ou glicose ou ambos. O meio foi parcialmente solidificado com 0,5% de ágar (BD Difco) e 20 mL foram dispostos em cada placa de Petri. As placas, dispostas em duas fileiras no centro do fluxo laminar, permaneceram abertas por 60-75 minutos, dependendo da umidade média, antes da inoculação. A incubação ocorreu dentro de sacos plásticos a 30°C ou 34°C. O cálculo da área de cobertura das colônias nas placas de Petri, quando mencionado, foi feito com o ImageJ (https://imagej.nih.gov/ij/index.html).

3.5. Ensaio de iniciação de biofilme

Culturas no final de crescimento exponencial foram diluídas em meio LB, M9 modificado ou CAA para a DO_{600}=0,05. 100 µl das culturas diluídas foram dispensadas por

poço, em uma placa de 96 poços. Pelo menos 10 poços foram utilizados por linhagem, e o experimento foi repetido duas vezes. As placas foram incubadas a 30°C, sem agitação, por 24 horas. Após o período de incubação, as culturas foram cuidadosamente retiradas da placa e a mesma foi lavada rigorosamente, a fim de retirar células que não estavam aderidas. O biofilme foi corado com cristal violeta 0,1% por 15 minutos. A retirada do excesso de corante foi realizada e, posteriormente, o corante foi solubilizado com acetona/etanol 8:2. A absorbância foi medida a 550 nm e os valores são proporcionais à biomassa que estava aderida.

3.6. Trancriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e RT-PCR quantitativa (qRT-PCR)

A organização gênica de *prlC* e *PA14_00800* foi investigada por RT-PCR. A extração de RNA total foi feita com reagente TRIzol (Thermo Fisher) de culturas da linhagem parental PA14 na fase de crescimento exponencial inicial e tardia (DO600 = 1 e DO600 = 2, respectivamente). O RNA foi tratado com DNase I (Thermo Fisher), para remoção do DNA genômico residual. O RNA tratado foi usado como molde para a síntese de DNA complementar (cDNA) a partir de oligonucleotídeos randômicos ou do oligonucleotídeo específico (qRT PA1400800 Right) **(Tabela 2)** pela enzima RevertAid Reverse Transcriptase Premium (Thermo Fisher), segundo protocolo do fabricante. A PCR foi feita com oligonucleotídeos específicos, a fim de amplificar a sequência terminal de *prlC* e a inicial de *PA14_00800* **(Tabela 2)**, usando como molde os cDNAs. O DNA genômico (gDNA) de PA14 foi utilizado como controle positivo de amplificação da PCR e os RNAs como controles negativos.

Análises de expressão gênica em nível de transcrição foram realizadas por qRT-PCR, técnica que permite estimar os níveis relativos de RNA mensageiro (mRNA) de um determinado gene nas células em relação a um gene normalizar, cuja expressão não varia nas condições de ensaio. Para avaliar a expressão gênica das linhagens de interesse em meio

sólido, 10 µl de culturas no final da fase exponencial (DO_{600}=3) foram inoculados em M9 modificado 1% ágar e incubados a 37°C por 24 horas. As células foram suspensas em PBS 1x e, em seguida, centrifugadas. O pellet foi utilizado para extração do RNA total com TRizol, como previamente descrito, e o RNA foi tratado com DNase I. Alternativamente, culturas líquidas foram utilizadas e a extração e tratamento do RNA total foram feitos com a metodologia delineada anteriormente. O RNA tratado foi utilizado como molde para a síntese de cDNA com a enzima RevertAid Reverse Transcriptase Premium, utilizando primers randômicos. O cDNA foi amplificado com SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) com o uso de oligonucleotídeos específicos para os genes de interesse (**Tabela 2**) no equipamento StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems), em triplicata técnica. O gene *nadB* foi utilizado como normalizador e a expressão relativa foi calculada de acordo com o método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001).

3.7. Leituras de fluorescência

A detecção de fluorescência intrínseca, dada pela produção de moléculas naturalmente fluorescentes pelas colônias, foi detectada inicialmente por leituras feitas no scanner Typhoon (Typhoon FLA 9500, GE) ou no leitor Cytation 5 (Biotek). Os padrões de fluorescência específicos de pioverdina já são caracterizados, com excitação em 398nm e emissão em 455 nm (Elliott, 1958; Meyer and Abdallah, 1978). O scanner Typhoon não permite o ajuste de parâmetros de fluorescência e, portanto, os filtros utilizados foram os que mais se aproximavam dos parâmetros da pioverdina. A excitação foi realizada a 473 nm e o filtro de emissão BPG1, cujo comprimento de onda varia de 560-580 nm, foi utilizado para leituras no Typhoon. Alternativamente, leituras em placa foram realizadas no Cytation 5 com medidas de fluorescência nos parâmetros específicos de pioverdina. Neste equipamento, as

medidas de fluorescência, assim como a densidade ótica das culturas, eram realizadas de hora em hora, em um período de 24 horas.

3.8. Detecção da presença de ramnolipídeos

A presença de ramnolípideos em placa foi detectada pela pulverização da mesma com uma fina camada de uma mistura de óleo e corante. Um halo ao redor da colônia, formado pela formação de micelas nesta área, caracteriza a produção de ramnolipídeos.

3.9. Quantificação de HHQ e PQS

A quantificação das pequenas moléculas de comunicação célula-célula HHQ e PQS foi realizada com base em colônias crescidas em M9 modificado com 1% ágar, a 37°C, por 24 horas. As colônias foram cuidadosamente excisadas e imersas em metanol, acrescido de controle interno, por um período de 16 horas, sob constante agitação. Após este período, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi coletado e seco sob um jato gentil de nitrogênio. As amostras foram solubilizadas em metanol 50% antes das injeções. A quantificação foi feita por cromatografia líquida de alta performance acoplada a espectrometria de massas (LC/MS), em relação ao controle interno. LC/MS foi realizada com ionização *electrospray* em modo positivo (ESI+). A metodologia foi realizada como descrito em (Lépine and Déziel, 2011), no laboratório do Professor Éric Déziel, no Institut Armand Frappier (INRS), com auxílio técnico do Sylvain Milot, especialista em espectrometria de massas.

3.10. Análise da expressão gênica com base no gene repórter *lacZ*

Ensaios de atividade de β-galactosidase foram realizados com colônias crescidas em M9 modificado a 37°C por 24 horas. As células foram cuidadosamente suspensas em PBS 1x e uma alíquota de 100 µl foi utilizada para o ensaio, após a medida da densidade ótica. Nas alíquotas foram adicionados 800 µl de tampão Z (Na_2HPO_4 8,51 g/l; NaH_2PO_4 6,25 g/l; KCl 0,75 g/l; $MgSO_4$ 0,25 g/l; β-mercaptoetanol 2,7 ml/l). As células foram rompidas com a adição de

50 µl de SDS 0,1% e 50 µl de clorofórmio e incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos. Após o tempo de incubação, 200 µl de orto-nitrofenol D-galactopiranosídeo (ONPG) (4 mg/ml) foram adicionados e o tempo até o aparecimento de coloração amarela foi cronometrado. 400 µl de Na_2CO_3 1M foram utilizados para parar a reação. As amostras foram centrifugadas e a absorbância da fase aquosa foi dosada a 420 nm no espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo). Os ensaios foram realizados em triplicatas, pelo menos três vezes. Os níveis de expressão foram calculados em unidades Miller (U), de acordo com a equação abaixo (Miller, 1972):

$$\mathrm{U} = \frac{1000 * \mathrm{DO\ 420\ nm}}{\text{tempo em minutos} * \text{volume de cultura em ml} * \mathrm{DO\ 600\ nm}}$$

3.11. Sequenciamento de RNA

Para análise dos transcritos, o RNA total foi extraído de colônias de PA14 e de Δ*PA14_00800* crescidas em M9 modificado por 24 horas à 37°C, em triplicata biológica. As células foram suspensas com uma mistura de PBS 1x com RNAprotect Bacteria Reagent (Qiagen), como instruído pelo fabricante, para a estabilização imediata do RNA. Posteriormente, a extração do RNA total foi feita com kit RNeasy Mini (Qiagen).

A integridade das amostras de RNA, indicada pelo RIN (*RNA integrity number*), foi verificada com o chip RNA 6000 Pico. Todas as amostras apresentaram boa qualidade, com RIN acima de 9. Em seguida, para depleção do RNA ribossomal (rRNA) das amostras, o kit Ribo-Zero rRNA Removal (Bacteria)(Illumina). Um segundo chip de RNA 6000 Pico foi utilizado para confirmar a depleção dos rRNA, evitando o enriquecimento de *reads* que correspondem a estes RNAs no sequenciamento.

Após a depleção dos rRNAs, as amostras foram usadas como molde para a construção de bibliotecas de cDNA *paired-end*. Para tal, as amostras foram submetidas a fragmentação,

conversão de RNA a cDNA, e ligação de adaptadores nas duas extremidades. Estas etapas foram feitas com o kit TruSeq RNA Library Prep v2 (Illumina), de acordo com as instruções do fabricante. O tamanho médio dos fragmentos de cDNA, importante na normalização de sua concentração, foi estimado com o chip DNA, no BioAnalyser. A quantificação das amostras de cDNA foi realizada com o kit KAPA Library Quantification (Kapa Biosystems). Após a normalização da concentração de cada biblioteca, elas foram agrupadas, diluídas e desnaturadas. O sequenciamento das amostras foi realizado no aparelho MiSeq (plataforma da Illumina), com 8-10 pM do *pool* de amostras. Cada corrida consistiu de quatro amostras independentes, com índices, contido nos adaptadores, diferentes. Duas corridas foram realizadas para sequenciar as seis amostras utilizadas neste trabalho.

3.11.1. Análise do sequenciamento de RNA

A análise dos dados provenientes do sequenciamento das amostras foi realizada pelo Dr. Gilberto Kaihami, então aluno de doutorado orientado pela Prof. Regina Baldini. Após a corrida, os *reads* correspondentes a cada uma das amostras foram agrupados, utilizando os índices individuais inseridos durante a construção das bibliotecas, numa etapa conhecida como *demultiplex*. Posteriormente, a qualidade dos *reads* foi verificada com o programa FastQC (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/). A deleção de bases com baixa qualidade (*trimming*), cuja inserção ocorreu, provavelmente, devido a erros no sequenciamento, foi realizada. Este processo tem a capacidade de aumentar a porcentagem de *reads* pareados corretamente no genoma e foi realizado com o programa FASTX-Toolkit (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/).

O programa EDGE-pro (*Estimated Degree of Gene Expression in Prokaryotic Genomes*, (Magoc *et al.*, 2013)), voltado para análises de expressão de genomas procarióticos, contém algoritmos que levam em consideração a sobreposição de genes, comum em genomas com

alta densidade de genes, como os bacterianos, e ignoram evidências de *splicing*. Este programa foi utilizado no alinhamento dos *reads* com o genoma de *P. aeruginosa* PA14, gerando arquivos com a contagem bruta de cada gene (*raw data*) e com o RPKM (*reads per kilobase per million mapped reads*), uma estratégia para a quantificação da expressão gênica oriunda da normalização do tamanho do gene com o número de *reads* que se alinham a ele.

A análise da expressão diferencial foi feita a partir da contagem bruta de cada gene, com auxílio do programa edgeR (Robinson *et al.*, 2010). O edgeR utiliza um modelo de distribuição binomial negativa. Este pacote emprega procedimentos empíricos de Bayes, que permitem a estimação da variação biólogica para cada gene, mesmo em experimentos com baixo número de réplicas.

4. Resultados e Discussão

4.1. A fluorescência de colônias de *swarming* não depende de *prlC*

A redução da fluorescência em colônias de *swarming,* mas não em meio líquido, fenótipo observado na linhagem *prlC*::mrT7, foi a principal motivação para o desenvolvimento deste projeto. A construção do mutante de deleção em *prlC* foi realizada para que a possibilidade de um efeito polar da inserção do transposon ou de mutações secundárias serem responsáveis por este fenótipo fossem descartadas. No entanto, o perfil de produção de pioverdina diferiu entre estas linhagens mutantes, sendo igual à linhagem selvagem no mutante Δ*prlC*, indicando que a produção de pioverdina tinha origem num efeito secundário. A possibilidade de mutação secundária em outra região do genoma foi descartada pela reconstituição do gene selvagem na linhagem com o transposon por troca alélica. Portanto, a alternativa mais plausível era a de um efeito polar da inserção de transposon MAR2xT7 no gene a jusante de *prlC*, *PA14_00800*. Para investigar esta possibilidade, a construção do mutante de deleção em *PA14_00800* foi realizada e o fenótipo, quanto a produção de pioverdina, avaliado. A linhagem Δ*PA14_00800* também é deficiente na produção deste sideróforo, o que suporta a hipótese de o efeito polar ser responsável pelo fenótipo previamente observado **(Figura 3)**.

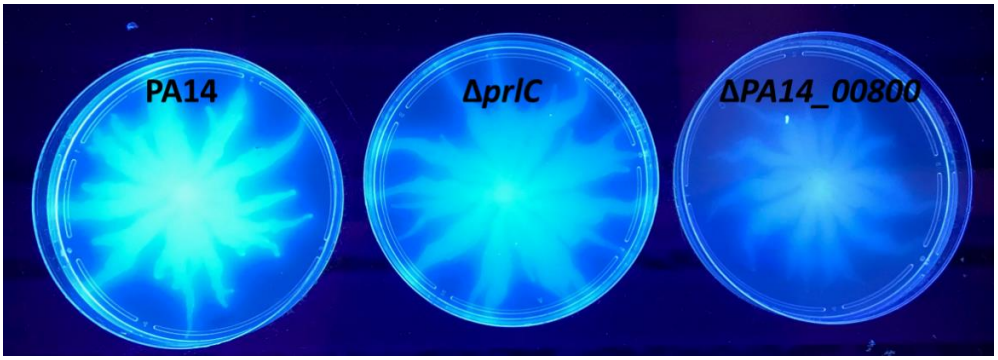

Figura 3. **A fluorescência das colônias de *swarming* depende de PA14_00800**. Placas de M9 modificado 0,5% ágar inoculadas com 5 µl de culturas de PA14, Δ*prlC* ou Δ*PA14_00800* em DO_{600} 3. As placas foram inoculadas por 16h a 30°C seguidas de 24h a temperatura ambiente. A fluorescência das colônias foi observada sob luz UV.

4.2. Estudo da organização gênica

A organização de genes em operon permite a corregulação da expressão gênica e pode indicar que as proteínas codificadas por clusters de genes são importantes na resposta ao mesmo estímulo ou que tenham funções relacionadas. Há predição de formação de operon, por bioinformática, (Mao *et al.*, 2009; Winsor *et al.*, 2016) dos genes *prlC* e *PA14_00800,* que poderia sugerir uma correlação funcional entre as proteínas codificadas por eles. A fim de confirmar a predição, a co-transcrição destes genes foi investigada por RT-PCR. Uma PCR foi realizada com cDNA extraído de culturas de *P. aeruginosa* no início da fase exponencial e em fase exponencial tardia, para maximizar a probabilidade de expressão dos genes em uma destas condições. O par de oligonucletídeos utilizados **(Tabela 2)** foi desenhado para hibridizar com as regiões codificadoras de *prlC* e de *PA14_00800*. A obtenção do produto de PCR só ocorreria se o cDNA originado da transcrição reversa contivesse os dois genes, indicando que estes faziam parte do mesmo mRNA e, portanto, fossem cotranscritos a partir de um operon. A **Figura 4A** representa o locus *prlC-PA14_00800* e destaca, em vermelho, o tamanho do produto esperado da RT-PCR. O DNA genômico (gDNA) de PA14 foi utilizado como controle positivo de amplificação da PCR e o RNA sem a adição de transcriptase reversa, como controle negativo **(Figura 4B)**. Como esperado, não houve produto na amplificação do RNA, o que descarta a possibilidade de contaminação das amostras com DNA genômico residual. Portanto, a presença de fragmentos do tamanho esperado (346 bp) na amplificação dos cDNAs confirma a predição de bioinformática de que *prlC* e *PA14_00800* constituem um operon **(Figura 4B)**. Apesar deste ensaio ser apenas qualitativo, não foram evidenciadas grandes diferenças na expressão nas fases de crescimento, sendo o produto da RT-PCR evidenciado nas duas condições.

Para compreender a correlação funcional de PrlC e PA14_00800, um mutante duplo de deleção duplo Δoperon foi construído a partir da linhagem parental PA14, como descrito em **Material e Métodos**.

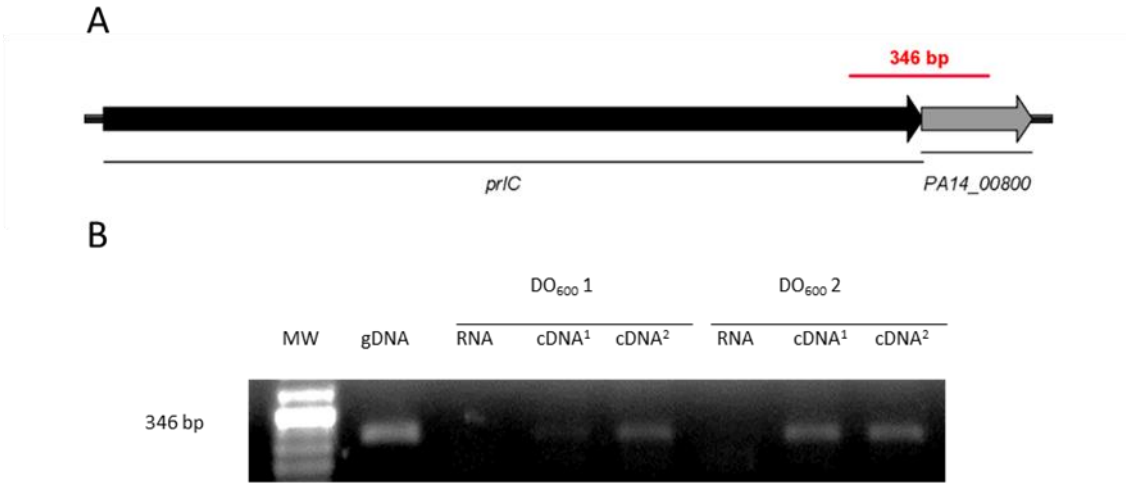

Figura 4. ***prlC* e *PA14_00800* constituem um operon**. **(A)** Contexto genômico do *locus prlC-PA14_00800*, em escala. Em vermelho está destacado o tamanho do produto esperado da RT-PCR caso *prlC* e *PA14_00800* formem um operon. **(B)** Gel de agarose 0,8% com os produtos de RT-PCR. M, marcador. gDNA, controle positivo da PCR. Amostras extraídas na fase exponencial inicial de crescimento (DO_{600} 1) e exponencial tardia (DO_{600} 2). RNA, controle negativo da PCR. $cDNA^1$, cDNA sintetizado a partir de iniciadores randômicos. $cDNA^2$, cDNA sintetizado a partir de iniciador específico (qRT PA1400800 Right).

Como citado na **Introdução**, o contexto genômico de *prlC-PA14_00800* é conservado nos membros do gênero *Pseudomonas* e, num contexto mais geral, nos membros da família Pseudomonadacea (Szklarczyk *et al.*, 2015). Homólogos de *prlC* são encontrados em genomas dos três domínios da árvore da vida, enquanto os de PA14_00800 parecem ser restritos a algumas espécies de gamaproteobactérias. Os genomas bacterianos que contêm homólogos a *PA14_00800* também apresentam homólogos a *prlC* (Szklarczyk *et al.*, 2015). A coocorência destes genes, entretanto, não está associada à proximidade gênomica entre eles. Em membros da família Enterobacteriaceae, incluindo *E. coli*, um homólogo de *PA14_00800* está em associação com genes para uma peptidil-prolil isomerase (*slyD*) e uma proteína do sistema de efluxo de potássio (*kefB*); em outro trecho do cromossomo, *prlC* está em proximidade ao

gene que codifica a metiltransferase envolvida na metilação do RNA ribossomal da subunidade 16S (*rsmJ*)(Kanehisa *et al.*, 2017). A organização gênica observada em *E. coli* não é conservada em Pseudomonadaceas e homólogos aos genes que estavam em associação por proximidade em *E. coli* com *prlC* e *PA14_00800* são encontrados em regiões distantes no cromossomo. A organização do locus gênico *prlC-PA14_00800* em Pseudomonadacea pode indicar a optimação na interação entre os produtos codificados por estes genes nesta família.

4.3. Caracterização fenotípica das linhagens mutantes

A variação intracelular do segundo mensageiro c-di-GMP modula o comportamento celular, incluindo a regulação de diversos fenótipos. Como os níveis proteicos de PrlC são regulados positivamente em altos níveis de c-di-GMP (Chua *et al.*, 2013; Nicastro *et al.*, 2014), a avaliação do comportamento dos mutantes de deleção em *prlC*, *PA14_00800* e do duplo mutante Δoperon foi baseada inicialmente em fenótipos classicamente relacionados às variações intracelulares de c-di-GMP (Ueda and Wood, 2009).

4.3.1. Ensaio de iniciação de biofilme

Ensaios de início de formação de biofilme foram realizados com as linhagens de interesse em três meios de cultura distintos, a fim de detectar possíveis alterações no perfil de adesão das células diretamente relacionados à disponibilidade de nutrientes e, consequentemente, ao estado metabólico das células. Os meios utilizados, LB, M9 modificado e CAA, apresentam distinções importantes entre si, dentre elas a disponibilidade de ferro. Ferro atua como sinal para formação de biofilme em *P. aeruginosa*, modulando a formação de estruturas em cogumelo (Banin *et al.*, 2005). Portanto, a utilização de um meio rico LB tem contraste direto com os meios M9 modificado e CAA, pobres em ferro e outros nutrientes (Ghysels *et al.*, 2004).

Não houve diferença na adesão das células das linhagens de interesse comparadas às da linhagem parental PA14 nas condições avaliadas **(Figura 5)**. Como controle experimental, a linhagem *pelA*, deficiente na produção do exopolissacarídeo Pel, principal exopolissacarídeo da matriz extracelular de *P. aeruginosa* PA14, foi utilizada. Como esperado, o início de formação de biofilme desta linhagem é severamente comprometido, com redução de aproximadamente 80%, independente do meio utilizado no ensaio **(Figura 5)**.

As primeiras etapas no desenvolvimento de um biofilme maduro são caracterizadas pela adesão das células numa superfície, seja ela biótica ou abiótica, seguida da formação de microcolônias e da secreção de substância extracelular polimérica (EPS), que fará parte da matriz do biofilme. O ensaio de iniciação de biofilme só permite que estas primeiras fases de desenvolvimento sejam avaliadas. A arquitetura do biofilme maduro, formada por estruturas que se assemelham a domos ou cogumelos (Costerton *et al.*, 1999), presentes nos biofilmes de *P. aeruginosa*, não é observada nesse tipo de ensaio. Portanto, não temos informação sobre a estrutura do biofilme das linhagens citadas, sendo possível haver diferenças entre elas na estrutura do biofilme maduro.

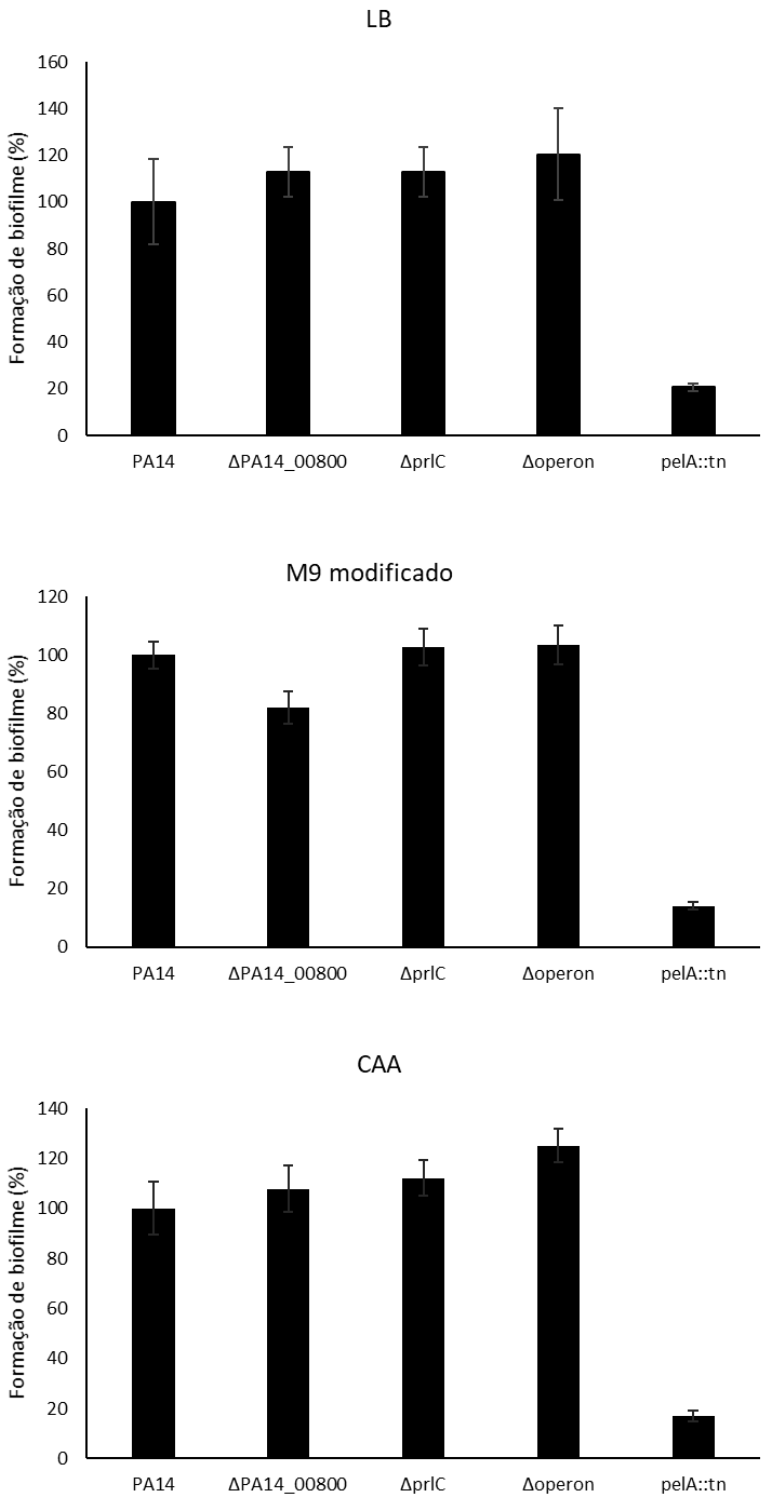

Figura 5. **O início de formação de biofilme não é influenciado por PrlC ou PA14_00800.** O início de formação de biofilme foi avaliado em meio LB (painel ao topo), M9 modificado (painel ao centro) e CAA (painel abaixo) para as linhagens Δ*PA14_00800*, Δ*prlC*, Δoperon e *pelA* em relação à linhagem parental PA14, considerada 100%. O desvio padrão do ensaio está representado nas barras de erro.

4.3.2. Ensaios de *swarming*

A concentração intracelular de c-di-GMP modula, de forma negativa, a motilidade de *P. aeruginosa*. Como citado anteriormente, uma das motilidades apresentadas por este patógeno é o *swarming*, dependente tanto da atividade flagelar quanto da produção de ramnolipídeos (Köhler *et al.*, 2000). Todos os mutantes de interesse apresentaram um padrão similar ao da linhagem parental em meio M9 modificado (**Figura 6**). No entanto, as linhagens Δ*PA14_00800* e Δoperon apresentaram colônias de *swarming* ligeiramente reduzidas em relação à linhagem parental **(Figura 6)**. Isso sugere, todavia, que a variação dos níveis intracelulares de c-di-GMP das linhagens de interesse não é relevante, ao encontro do observado nos ensaios de iniciação de biofilme **(Figura 5)**. Nesse tipo de ensaio, é possível observar também que as colônias de Δ*PA14_00800* tem coloração diferente de PA14, confirmando o defeito na produção de pioverdina **(Figura 7)**.

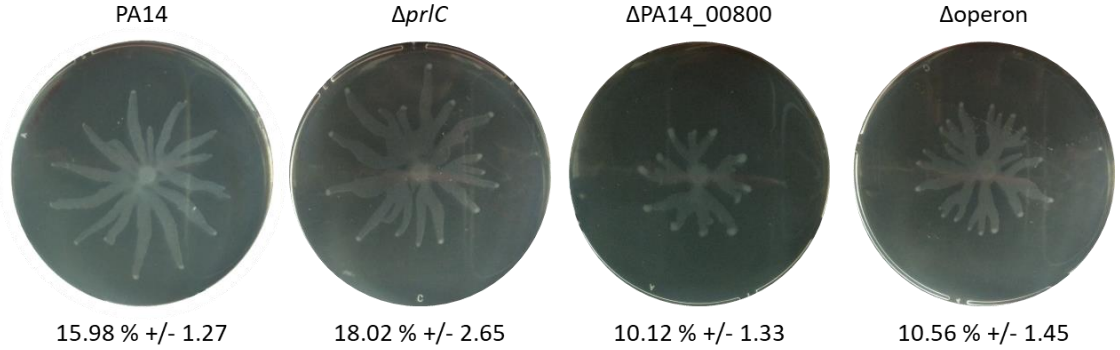

Figura 6. **Perfil de colônias de *swarming*.** Placas de *swarming* das linhagens PA14, Δ*prlC*, Δ*PA14_00800* e Δoperon em M9 modificado. As placas foram incubadas, dentro de um saco plástico, à 30°C por 16 horas. Após este período, todas as placas foram fotografadas e a área de cobertura de cada colônia foi calculada no ImageJ (https://imagej.nih.gov/ij/index.html). As porcentagens de cobertura, com o desvio padrão, estão abaixo de cada imagem representativa. Teste T não paramétrico foi utilizado para avaliar a variação entre pares de amostras. PA14 *vs* Δ*prlC*, não significativo; PA14 *vs* Δ*PA14_00800*, valor-p = 0,0159; PA14 *vs* Δoperon, valor-p = 0,0159. Os valores foram calculados com base em pelo menos oito placas por linhagem.

As colônias de *swarming* foram drasticamente distintas entre as linhagens PA14 e Δ*PA14_00800* quando o *swarming* foi avaliado em meio CAA, classicamente utilizado para evidenciar a produção de pioverdina por linhagens produtoras deste sideróforo (Ochsner *et*

al., 2002). Enquanto a motilidade da linhagem parental independe do meio de cultura utilizado, as células da linhagem Δ*PA14_00800* não são capazes de se locomover em CAA, permanecendo no ponto de inoculação **(Figura 7)**. Este resultado foi inesperado, já que a formação de colônias de *swarming* clássicas ocorrem no meio M9 modificado, evidenciando a capacidade da linhagem mutante na produção de ramnolipídeos e a normalidade da atividade flagelar. Em adição, a composição do meio M9 modificado tem base no meio CAA, com a adição de outros componentes, como a complementação com fontes alternativas de carbono e nitrogênio, como descrito em **Material e Métodos**.

4.3.2.1. O *swarming* de Δ*PA14_00800* depende da presença de cálcio e glicose

A alteração do perfil de *swarming* de Δ*PA14_00800* foi atribuída a um requerimento nutricional, não evidenciado na linhagem parental. Para elucidar qual(is) componente(s) presente(s) em M9 modificado, e ausente em meio CAA, era(m) necessário(s) para restaurar o perfil de *swarming* encontrado em meio M9 modificado, diversas combinações de meio CAA complementado com um ou mais componentes de M9 modificado foram testadas. Os componentes foram adicionados nas mesmas concentrações descritas para meio M9 modificado, afim de reduzir o impacto de variações nos resultados. Como observado nas **Figuras 7** e **8**, em meio CAA as colônias de *swarming* de Δ*PA14_00800* quase não apresentam dendritos, estruturas de saem do centro do colônia e contêm, por característica, células metabolicamente ativas e prontas para colonizar novos ambientes (Tremblay and Déziel, 2010). Quando cloreto de cálcio ou glicose (dextrose) foram adicionados ao meio, a formação de dendritos por Δ*PA14_00800* foi mais frequente, indicando que estes compostos estimulam, de alguma forma, a motilidade dessa linhagem **(Figura 8).** Baseado nessa observação, o perfil de *swarming* de Δ*PA14_00800* foi avaliado com a adição concomitante de cálcio e glicose ao meio. A presença destes componentes, em suplementação ao meio CAA,

foi suficiente para restaurar o perfil de motilidade de Δ*PA14_00800* igual ao observado em M9 modificado **(Figura 8)**. Portanto, apesar de desnecessários para a motilidade *swarming* de PA14, a presença de cálcio e glicose é requerida para Δ*PA14_00800*.

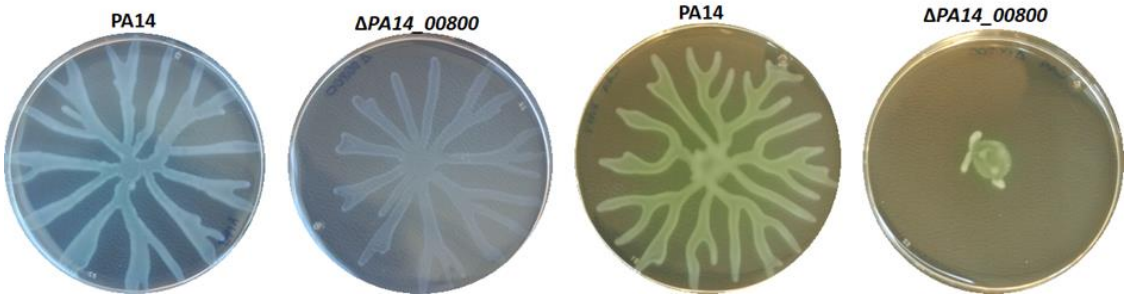

Figura 7. **A composição do meio de cultura altera o perfil de *swarming* de Δ*PA14_00800*.** À esquerda, placas de *swarming* de PA14 e Δ*PA14_00800* em meio M9 modificado e, à direita, em meio CAA. O padrão fractal da colônia, característico de *P. aeruginosa* PA14, é observado para as duas linhagens em meio M9 modificado, mas é observado apenas na linhagem parental quando meio CAA é utilizado.

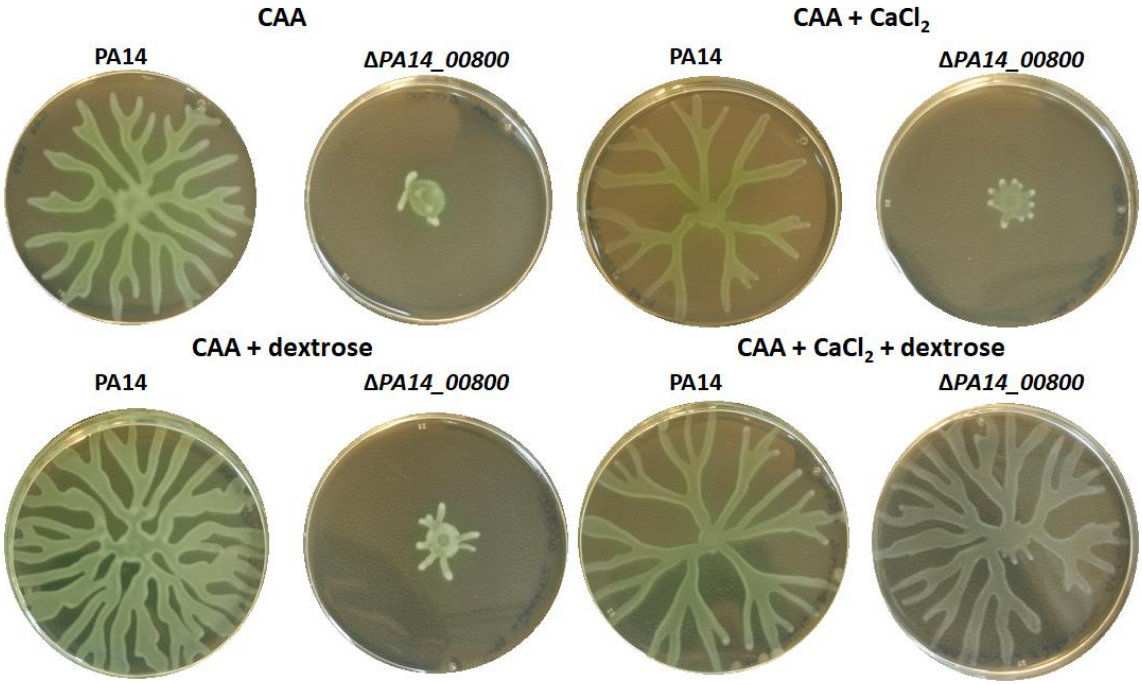

Figura 8. **A suplementação do meio CAA com cálcio e glicose (dextrose) restaura o perfil de *swarming* de Δ*PA14_00800*.** A composição do meio está indicada acima da respectiva imagem, correspondendo ao meio CAA sem ou com a adição de cloreto de cálcio, glicose ou ambos.

A alternativa mais simples seria a dependência da maquinaria flagelar ou/e da produção de ramnolipídeos da presença de cálcio e glicose no meio de cultura na linhagem Δ*PA14_00800*, mesmo que não existam indícios diretos dessas associações na literatura. Para a avaliação da atividade flagelar, ensaios de *swimming* foram realizados nas mesmas condições que os ensaios de *swarming* quanto a composição dos meios, com variações na concentração de ágar utilizada e no tempo de secagem das placas, já que as células nadam numa viscosidade menor do que a utilizada nos ensaios de *swarming*. Diferente do *swarming*, a função flagelar é suficiente para o *swimming* (Henrichsen, 1972) e, portanto, se a ausência de cálcio e de glicose no meio interferisse nessa função, as células da linhagem mutante não seriam capazes de se locomover pela ausência de atividade flagelar. Tanto a linhagem parental quanto o mutante em *PA14_00800* foram capazes de se locomover por *swimming* em todos os meios testados (dados não mostrados), sem diferenças na locomoção entre as linhagens, evidenciando que o defeito de *swarming* de Δ*PA14_00800* não ocorre pela desregulação da atividade flagelar.

Alternativamente, a produção de ramnolipídeos poderia ser modulada pela composição dos meios testados. Para avaliar essa possibilidade, placas de *swarming* com as diferentes composições de meio foram utilizadas para evidenciar, qualitativamente, a presença de ramnolipídeos. Ramnolipídeos são surfactantes e, portanto, interagem com lipídeos criando estruturas micelares em ambiente aquoso. Adicionando colorante a óleo e pulverizando essa mistura nas placas, é possível verificar visualmente a produção de ramnolipídeos pela formação de um halo ao redor da colônia produtora **(Figura 9)**. A produção de ramnolipídeos pelas colônias de Δ*PA14_00800* pode ser observada em todos os meios testados e, tal como a atividade flagelar, não justifica a deficiência da linhagen Δ*PA14_00800* na locomoção em meio CAA semissólido.

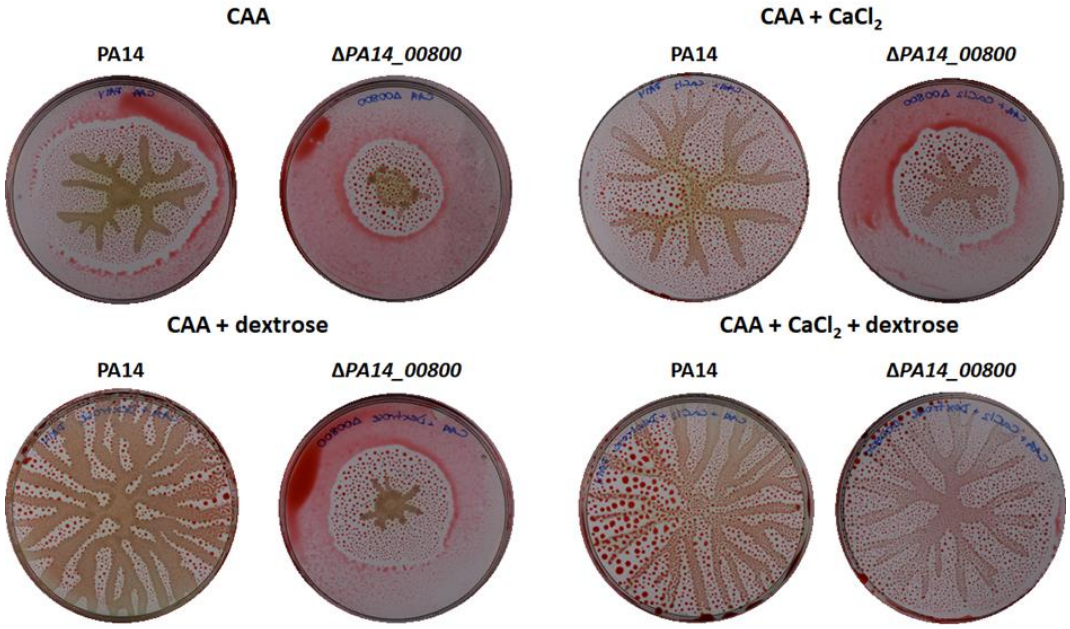

Figura 9. **A presença de cálcio ou glicose (dextrose) no meio de cultura não altera a produção de ramnolipídeos no mutante Δ*PA14_00800***. A presença de ramnolipídeos, produzidos pela colônia de *swarming*, é evidenciada pela presença de um halo ao redor da colônia produtora. Em colônias maiores, há formação de micelas em toda a placa, impedindo a visualização de um halo. A suplementação de CAA com cálcio, glicose ou ambos não impede a produção de ramnolipídeos pela colônia.

Como a ausência de cloreto de cálcio e glicose não afeta qualitativamente nem a atividade flagelar nem a produção de ramnolipídeos tanto na linhagem selvagem quanto no mutante, a recuperação do fenótipo selvagem observado na linhagem Δ*PA14_00800* pode estar relacionada com defeitos na sinalização celular, que é restaurada pela adição destes componentes no meio de cultura. O cálcio tem um papel importante nos sistemas de sinalização de eucariotos e procariotos, apesar dos mecanismos pelos quais as células respondem ao cálcio serem muito mais elusivos no último grupo. Em bactérias, o íon cálcio já foi relacionado com diferentes funções fisiológicas, tais como a formação de esporos, motilidade, transporte e virulência (Dominguez, 2004). Em *P. aeruginosa*, o íon cálcio estimula a formação de biofilme, além de induzir a biossíntese de diversos fatores de virulência que são secretados, como alginato, proteases extracelulares, piocianina e pioverdina (Sarkisova *et al.*, 2005; Patrauchan *et al.*, 2007). Além de atuar positivamente na expressão destes fatores

de virulência, o cálcio também induz a motilidade *swarming* em *P. aeruginosa* e em outros organismos (Gode-Potratz *et al.*, 2010; Guragain *et al.*, 2013), apesar de uma correlação negativa entre a motilidade *swarming* e a concentração de cálcio ter sido estabelecida para outras espécies do gênero *Pseudomonas* (Sakai *et al.*, 2003). O aumento da motilidade pode ser explicado pela indução da transcrição de *rhlB* e *rhlR* por altos níveis de íon cálcio no meio, tanto em células planctônicas quanto em células em biofilme (Guragain *et al.*, 2016). Como mencionado anteriormente, estes genes estão envolvidos na biossíntese de ramnolipídeos. Portanto, cálcio induz a motilidade *swarming* provavelmente atuando na maior produção de ramnolipídeos. Este íon não parece ter efeito na expressão de genes do flagelo, como observado em análise transcritômica (Guragain *et al.*, 2016). Cálcio também atua como sinal negativo na secreção de efetores tóxicos para células eucarióticas pelo sistema de secreção do tipo III, sendo esta atividade induzida apenas em condições de depleção do mesmo (Frank, 1997).

É importante ressaltar que os dados na literatura sobre a sinalização mediada por cálcio em *P. aeruginosa* foram obtidos, majoritariamente, com a linhagem *P. aeruginosa* PAO1. Recentemente, a histidina quinase LadS, central no sistema de sinalização Gac/Rsm, foi caracterizada como responsiva a cálcio (Broder *et al.*, 2016). A presença de cálcio aumenta a atividade de quinase de LadS, que tem o seu grupo fosforila transferido para GacS num mecanismo de fosforelê (Chambonnier *et al.*, 2016). Essa transferência ativa o sistema Gac/Rsm, ativando diretamente a transcrição dos sRNAs RsmZ e RsmY e, consequentemente, modula a expressão de uma série de genes, culminando na regulação positiva de fenótipos relacionados à cronicidade da infecção causada por *P. aeruginosa* (Broder *et al.*, 2016; Chambonnier *et al.*, 2016). No entanto, a linhagem modelo utilizada no nosso laboratório, PA14, apresenta uma mutação que altera a fase de leitura de *ladS* (Mikkelsen *et al.*, 2011), o

que faz com que seu produto não seja funcional. Dessa maneira, o sistema Gac/Rsm não é responsivo a cálcio na linhagem PA14 (Broder *et al.*, 2016). Como ainda há conservação entre outros mecanismos de sinalização por cálcio nas linhagens modelo PAO1 e PA14, como o sistema de dois componentes CarSR (Guragain *et al.*, 2016), algumas das respostas induzidas por este íon devem ser observadas em PA14, mas a transposição de conhecimento deve ser feita com muita atenção.

A adição de glicose no meio de cultura CAA, composto de caseína hidrolisada, fornece às células uma segunda fonte de carbono. A hierarquização do uso de múltiplas fontes de carbono no meio de cultura é mediada pela repressão catabólica. Este processo foi extensamente estudado em *E. coli*, cuja fonte preferencial de carbono é a glicose. Em suma, a repressão catabólica nesta bactéria ocorre em dois níveis depententes do sistema de fosfotransferência (PTS), que acopla a entrada de glicose com a sua fosforilação. Quando glicose é ativamente transportada e convertida em glicose-6-fosfato, uma das enzimas do sistema PTS, $EIIA^{Glc}$, específica na fosforilação de glicose, tem baixos níveis da sua forma fosforilada. Quando desfosforilada, $EIIA^{Glc}$ interage com transportadores de diversos açúcares que independem do sistema PTS, tais como lactose, maltose e melobiose, e inibe as suas atividades. O bloqueio da entrada destes açúcares na célula reprime a transcrição dos genes responsáveis pelo catabolismo dos mesmos. Esta repressão é aliviada quando a glicose é depletada do meio, uma vez que a forma fosforilada de $EIIA^{Glc}$ prevalece nas células nesta condição e a entrada de açúcares não-preferenciais é liberada, induzindo parcialmente os genes catabólicos cognatos. A indução total depende do ativador transcricional CRP ligado a cAMP, cuja síntese é estimulada pela interação da forma fosforilada de $EIIA^{Glc}$ com a adenilato ciclise, ativando-a (revisado em Deutscher, 2008). Portanto, em *E. coli*, o metabolismo de

diversos carboidratos é regulado pela exclusão de indutores das células e pelo controle dos níveis de cAMP, ambos processos mediados pelo sistema PTS.

Ao contrário do que acontece em *E. coli*, a repressão catabólica em *Pseudomonas* não é centrada em glicose. De fato, as fontes preferenciais de carbono para *Pseudomonas* são ácidos orgânicos e aminoácidos, em detrimento de glicose (Collier *et al.*, 1996). Em contraste ao observado em *E. coli*, o processo de repressão catabólica independe de sistemas PTS em *Pseudomonas* e, portanto, não é acoplado a variações nos níveis de cAMP. A hierarquização de fontes de carbono em *P. aeruginosa* é mediada pela proteína de repressão catabólica Crc (Collier *et al.*, 1996). Este processo ocorre pela repressão da tradução de mRNAs contendo o motivo de ligação de Crc. O sRNA CrcZ alivia a repressão pela titulação da proteína Crc (Sonnleitner *et al.*, 2009), num mecanismo similar ao sistema Gac/Rsm mencionado na **Introdução**. Em suma, o sRNA CrcZ tem alta afinidade a Crc e, quando presente, desloca a ligação de Crc ligado aos mRNA-alvos para um complexo formado entre CrcZ e Crc. Os níveis de CrcZ variam conforme a disponibilidade de fontes de carbono, sendo baixos quando a célula cresce na presença de fontes preferenciais, como succinato, e aumentando conforme a preferência pelo carbono decresce (Sonnleitner *et al.*, 2009). Glicose é uma fonte de carbono de preferência intermediária em *P. aeruginosa* e, portanto, os níveis de CrcZ são moderados em células que crescem na presença deste açúcar. A expressão de CrcZ é controlada pelo sistema de dois componentes CbrAB (Sonnleitner *et al.*, 2009). Na presença de glicose, portanto, este sistema está moderadamente ativo, mantendo níveis medianos de CrcZ. O sistema CbrAB modula diferentes comportamentos, dentre eles a motilidade *swarming*. A inativação deste sistema diminui drasticamente o diâmetro das as colônias de *swarming* de *P. aeruginosa* PA14 (Yeung *et al.*, 2011). Em adição, a deleção de *crc* também afeta negativamente o *swarming* de *P. aeruginosa* (Linares *et al.*, 2010), indicando que a otimização

da utilização de fontes de carbono no meio de cultura é importante para o *swarming*. É possível racionalizar que a maior atividade do sistema CbrAB, frente a adição de glicose no meio, possa atuar positivamente no *swarming*, por uma via de regulação ainda desconhecida e dependente da proteína Crc.

A motilidade *swarming* pode, portanto, ser modulada positivamente pela adição de cloreto de cálcio e de glicose ao meio de cultura. Este efeito pode ser observado tanto na linhagem parental quanto em Δ*PA14_00800*, com colônias de *swarming* maiores na suplementação do meio CAA com cálcio e glicose, quando comparada àquelas crescidas em meio CAA **(Figura 9).** No entanto, a reversão do fenótipo de Δ*PA14_00800* pela adição de cloreto de cálcio e glicose ao meio de cultura não pode ser explicada por dados da literatura. Para compreensão deste fenótipo, seria interessante uma análise de expressão gênica em larga escala da linhagem Δ*PA14_00800* cultivada em apenas CAA e em CAA suplementado com cloreto de cálcio e/ou glicose.

4.4. PA14_00800 contribui para o perfil de fluorescência de colônias de *P. aeruginosa*

P. aeruginosa, assim como outros membros do gênero *Pseudomonas*, possui como característica uma fluorescência natural, conferida pela habilidade de sintetizar, primariamente, pioverdina, um pigmento fluorescente sob luz UV (revisado em Schalk and Guillon, 2013). A literatura associa diferenças de fluorescência sob luz UV entre linhagens com a habilidade de produção de pioverdina (Cornelis *et al.*, 1992; Koedam *et al.*, 1994; Visaggio *et al.*, 2015). As análises feitas neste trabalho se basearam inicialmente no pressuposto de que a fluorescência emitida por culturas de *P. aeruginosa* PA14 era oriunda da presença de pioverdina.

4.4.1. PA14_00800 regula a produção de pioverdina dependente de contato com uma superfície

Como mencionado anteriormente, a deleção de *PA14_00800* altera o perfil de fluorescência de colônias de *swarming* de *P. aeruginosa* **(Figura 10A)**. A complementação parcial do fenótipo de Δ*PA14_00800* pela expressão em *trans* de *PA14_00800* no plasmídeo pDN19-PA14_00800 confirma a relação dessa proteína com a produção de pioverdina **(Figura 10A)**. Não há variação na produção desse sideróforo entre as linhagens PA14, Δ*prlC*, Δ*PA14_00800* e Δoperon em meio líquido **(Figura 10B)**, o que indica que a regulação da produção de pioverdina por PA14_00800 é dependente de contato com uma superfície. Corroborando nossa observação, a correlação positiva entre c-di-GMP e a síntese de pioverdina foi recentemente demonstrada (Chen *et al.*, 2015). Níveis elevados de c-di-GMP favorecem a agregação célula-célula e este sinal parece ser necessário para estimular a produção de pioverdina (Visaggio *et al.*, 2015). É plausível, portanto, que o efeito de PA14_00800 seja restrito a condições nas quais a agregação célula-célula seja favorecida (meio semissólido e sólido). Outra possibilidade é que o próprio contato com a superfície seja um sinal para a produção de pioverdina.

Para verificar esta hipótese, a produção de pioverdina em meio sólido foi avaliada. O ensaio foi realizado com M9 modificado solidificado com 1% de ágar, em contraponto à concentração de 0,5% de ágar utilizada em ensaios de *swarming*, com o mesmo tempo de secagem no centro do fluxo laminar, para minimizar as variações de fatores que possam influenciar no fenótipo. 10 µl de culturas na fase exponencial tardia foram inoculados no centro de cada poço. A placa foi incubada a 37°C por 24 horas. A variação na produção de pioverdina foi avaliada visualmente, com o auxílio de um transiluminador UV. Assim como observado para as células da colônia de *swarming*, as células crescidas em meio sólido

também apresentaram diferença na produção de pioverdina **(Figura 10C)**, indicando que este fenótipo não é modulado pela diferenciação celular que ocorre no *swarming* e sim pela percepção de contato.

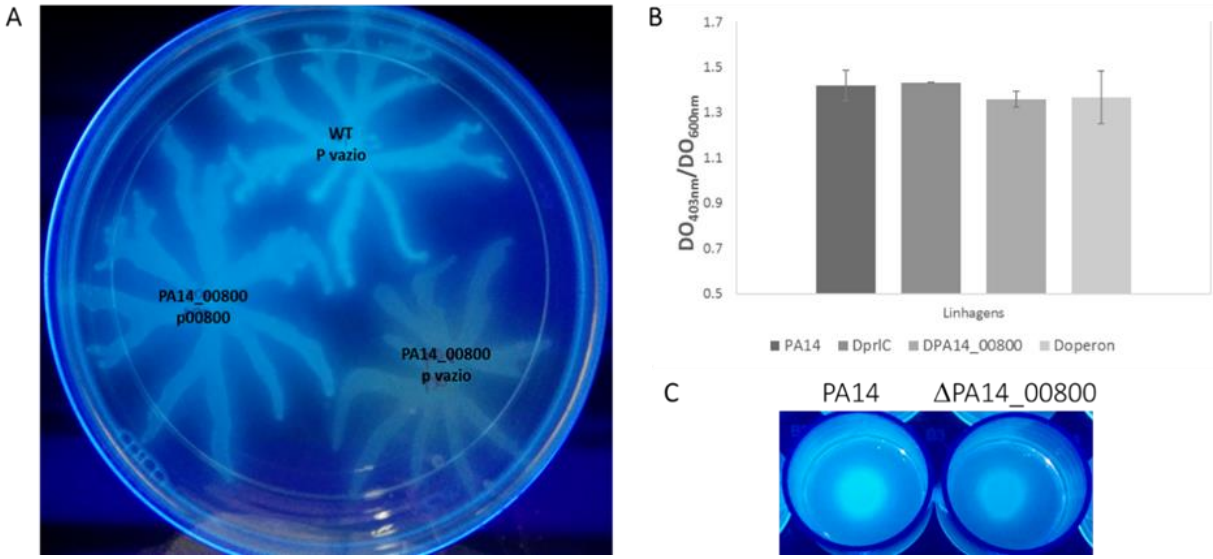

Figura 10. **PA14_00800 regula a produção de pioverdina**. (A) Ensaio de *swarming* com as linhagens PA14 pDN19 (WT p vazio), Δ*PA14_00800* pDN19 (PA14_00800 p vazio) e Δ*PA14_00800* pDN19-PA14_00800 (PA14_00800 p00800) sob luz UV. As placas foram incubadas por 16 horas a 30°C seguidas de 24 horas a 25°C. A variação na produção de pioverdina é avaliada pela intensidade de fluorescência sob luz UV. (B) Quantificação relativa da produção de pioverdina em meio M9 modificado líquido pelas linhagens PA14, Δ*prlC*, Δ*PA14_00800* e Δoperon, em culturas 24 horas após o inóculo inicial. A quantificação de pioverdina (DO_{403}) foi normalizada pela densidade celular (DO_{600}). Não houve diferença na produção de pioverdina entre as linhagens. (C) Produção de pioverdina em M9 modificado solidificado com 1% ágar. 10 µl de culturas na fase exponencial tardia foram inoculados no centro de cada poço e incubados por 24 horas a 37°C. A produção de pioverdina foi avaliada sob luz UV.

A diferença entre a colônia parental e a do mutante Δ*PA14_00800*, além de visível sob luz UV **(Figura 10C)**, também era perceptível a olho nu, sendo que as colônias de Δ*PA14_00800* não apresentam a coloração amarelo brilhante da pioverdina. A diferença de pigmentação entre as colônias, aqui atribuída como um defeito na produção de pioverdina, poderia ser explicada, alternativamente, por um defeito de crescimento entre as linhagens em questão, o que culminaria na menor densidade celular e, portanto, menor pigmentação e fluorescência. Para responder essa questão, as células crescidas em meio M9 modificado 1% ágar foram suspensas, cuidadosamente, em PBS 1x e diluídas em série, para que o número de unidades

formadoras de colônia (CFU, em inglês) pudesse ser determinada. Curvas de crescimento das linhagens em M9 modificado não indicaram diferenças de crescimento em tubos (não mostrado), assim como não houve diferença no crescimento das linhagens em meio sólido **(Figura 11).** Portanto, a diferença de pigmentação e fluorescência observadas entre as linhagens não se justifica por diferenças nas taxas de crescimento e reforça a ideia de PA14_00800 regular a produção de pioverdina dependente de contato.

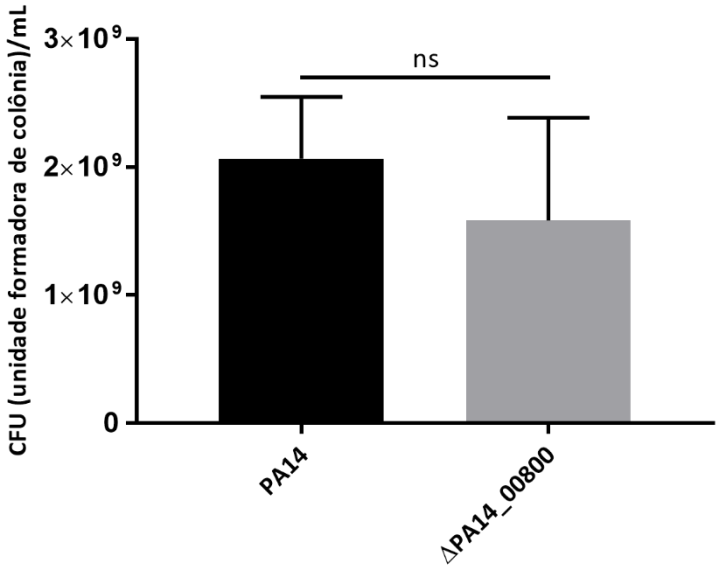

Figura 11. **A deleção de *PA14_00800* não altera o crescimento em meio sólido.** Células crescidas em M9 modificado 1% de ágar, em placas de 6 poços, por 24h a 37°C foram suspensas em PBS 1x e diluídas em série. A determinação de unidades formadoras de colônia (CFU)/mL indica que não há diferenças na taxa de crescimento das linhagens PA14 e Δ*PA14_00800* em meio sólido. O gráfico representa a média e o desvio padrão das amostras. Teste T não paramétrico foi utilizado para avaliar se a variação era estatisticamente significativa entre as amostras, valor-p = 0,079. Ns = não significativa.

Uma hipótese para explicar o envolvimento de PA14_00800 na produção de pioverdina dependente de contato, e não em meio líquido, seria a regulação da expressão de *PA14_00800*. A capacidade de *P. aeruginosa* responder a estímulos mecânicos, tal como a percepção de superfícies, modulando o seu comportamento em função do estímulo inicial é conhecida não só pela regulação da motilidade (Burrows, 2012; Partridge and Harshey, 2013), mas também nas vias de sinalização por c-di-GMP (Güvener and Harwood, 2007; O'Connor *et*

al., 2012) e na ativação da virulência deste patógeno por cAMP (Siryaporn *et al.*, 2014; Persat *et al.*, 2015).

Para avaliar se a transcrição de *PA14_00800* e *prlC* é estimulada por contato, o RNA total da linhagem parental foi extraído no início da fase exponencial (DO_{600} = 1) em meio líquido e após 24 horas de crescimento em meio sólido, nas mesmas condições utilizadas para verificação da produção de pioverdina. qRT-PCR foi utilizado para a comparação dos níveis de mRNA entre as duas condições e nenhuma variação significativa foi encontrada **(Figura 12)**. Portanto, a regulação diferencial de pioverdina em meio sólido, em comparação ao meio líquido, não ocorre devido a diferenças nos níveis de trancritos de *PA14_00800* e *prlC* nestas condições. Esses resultados concordam com dados da literatura, sendo que variações na expressão de *PA14_00800* e de *prlC* em resposta a estímulos mecânicos não foram encontradas em estudos de transcrição em larga escala (Siryaporn *et al.*, 2014).

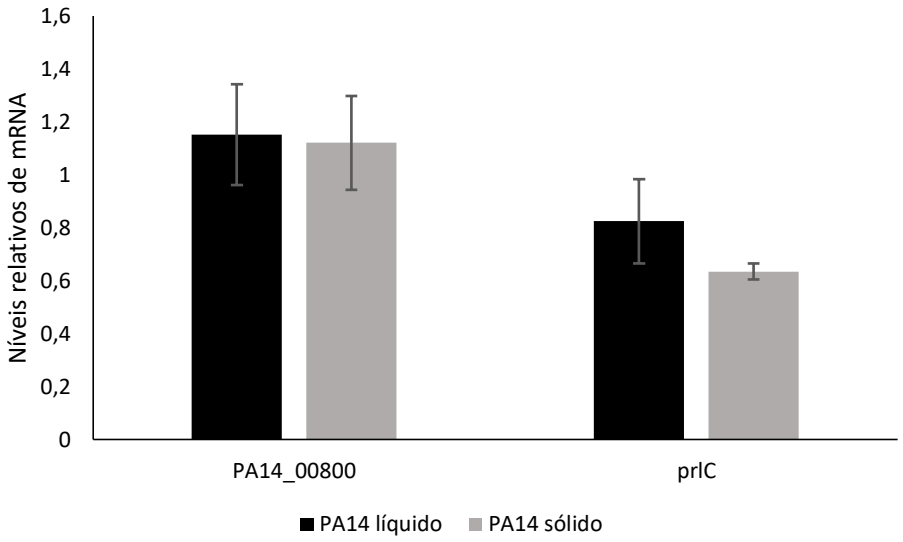

Figura 12. **Níveis de mRNA de *PA14_00800* e *prlC* não são modulados por contato**. Análise de RT-PCR quantitativa dos alvos *PA14_00800* e *prlC*. RNA total foi extraído de culturas da linhagem parental (PA14) na fase exponencial inicial de crescimento em meio M9 modificado (líquido) e após 24 horas de crescimento em placa (sólido). Os níveis de mRNA foram normalizados pela expressão do gene endógeno *nadB*. A análise foi feita por ΔΔCt. Dado representativo de três réplicas biológicas.

Os trabalhos científicos para compreensão dos sinais e vias responsivos ao contato ainda são recentes e um estudo mais compreensivo dos processos desencadeados pelo contato célula-célula e/ou com superfícies precisa ser desenvolvido. Recentemente, a produção de c-di-GMP, segundo mensageiro envolvido na regulação gênica em diferentes níveis, foi relatada como responsiva ao contato das células com superfícies (Luo *et al.*, 2015). Os níveis intracelulares deste segundo mensageiro modulam a expressão gênica pós-transcricionalmente, como relado pelo nosso grupo para *P. aeruginosa* (Nicastro *et al.*, 2014). É possível, portanto, que a variação nos níveis de c-di-GMP em resposta ao contato altere os níveis de PA14_00800 e/ou PrlC, culminando na regulação diferencial dos níveis destas proteínas em células planctônicas e sésseis. Outra alternativa seria ainda uma mudança conformacional dessas proteínas por mecanismos ainda desconhecidos em resposta ao contato, resultando em interações com proteínas relacionadas à síntese de pioverdina. Essas hipóteses permanecem abertas, podendo ser exploradas mais a fundo em trabalhos posteriores.

4.4.2. A fluorescência de *P. aeruginosa* não depende somente de pioverdina

Um dos fenótipos mais marcantes da linhagem Δ*PA14_00800* em relação à linhagem parental é a redução da fluorescência das suas colônias sob luz UV, observada inicialmente em transiluminadores rotineiramente usados para a visualização de ácidos nucléicos corados com brometo de etídeo. Como previamente mencionado, essa deficiência foi atribuída a um defeito na produção de pioverdina pelas células, culminando em menor pigmentação amarela e fluorescência nas colônias de Δ*PA14_00800*. As propriedades físicas das moléculas de pioverdina, tais como o seu perfil de excitação e emissão são bem estabelecidas (Elliott, 1958; Meyer and Abdallah, 1978). As propriedades de fluorescência desta molécula podem, portanto, serem exploradas para uma melhor caracterização da linhagem mutante em

PA14_00800 em relação a linhagem parental. O scanner Typhoon, capaz de identificar fluorescência nas amostras, foi utilizado como método alternativo na visualização de fluorescência nas colônias de *swarming*, junto com a luz UV. No entanto, o sistema do Typhoon FLA 9500 não permite que o usuário altere os padrões do equipamento e, portanto, os parâmetros utilizados foram os que mais se aproximavam dos experimentalmente estabelecidos para pioverdina. As amostras foram excitadas em 473 nm, apesar da excitação ótima de pioverdina acontecer em 398 nm, e um filtro para a emissão, BPG1, cujo intervalo de comprimento de onda varia entre 560-580 nm foi utilizado, ao invés de 455 nm. Apesar dos parâmetros de fluorescência utilizados serem distantes do ideal, a fluorescência da colônia de *swarming* de PA14 diferiu grandemente da observada no mutante em *PA14_00800* **(Figura 13)**, assim como o observado sob luz UV. A linhagem *pvdA* foi utilizada como controle negativo, uma vez que esta linhagem é incapaz de sintetizar pioverdina, já que PvdA é responsável por catalisar a hidroxilação de L-ornitina, modificação essencial na produção do sideróforo (Visca *et al.*, 1994; Imperi *et al.*, 2009). Surpreendentemente, um sinal de fluorescência foi detectado na linhagem *pvdA* que, apesar de menos intenso que o da linhagem parental, indica que o sinal de fluorescência captado no Typhoon não é totalmente dependente de pioverdina.

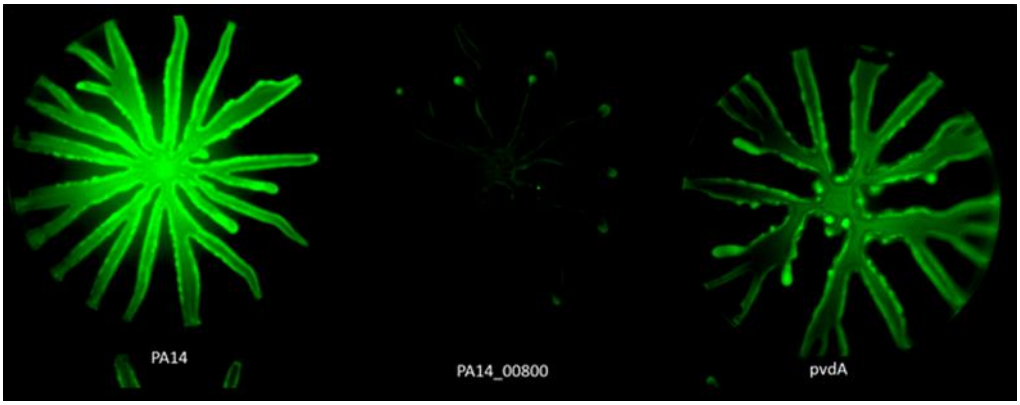

Figura 13. **Sinais de fluorescência de colônias de *swarming* detectadas no Typhoon.** Placas de *swarming* em meio M9 modificado das linhagens PA14, Δ*PA14_00800* e *pvdA* foram escaneadas após incubação de 16h à 34°C acrescidas de 8h à temperatura ambiente no equipamento Typhoon FLA 9500. Excitação em 473 nm e emissão em 560-580 nm, com o uso do filtro de emissão BPG1. A imagem foi submetida a alterações no contraste e coloração artificial.

A detecção de fluorescência no mutante *pvdA*, e a sua ausência na linhagem mutante Δ*PA14_00800*, indica que a produção de outro pigmento fluorescente ocorre no que seria o controle negativo. Mais relevante, entretanto, é a observação de que Δ*PA14_00800* é incapaz de produzir tanto a pioverdina quanto o suposto composto fluorescente produzido por *pvdA.*

Assim, a fluorescência observada no Typhoon nas linhagens em questão não poderia ser atribuída somente a presença de pioverdina, indicando um defeito na produção de outra molécula fluorescente pela linhagem Δ*PA14_00800*. Para responder essa questão, placas de *swarming* das linhagens PA14, Δ*PA14_00800* e *pvdA* foram separadas em grupos, para que a quantidade de unidades formadoras de colônia fosse determinada a partir de um grupo, e a fluorescência, relativa a presença de pioverdina, de outro. Para a quantificação de fluorescência, o meio, junto com as células, foi retirado das placas de Petri e misturado com PBS 1x, em um shaker, por 16h a 4°C. Após este período, as amostras foram centrifugadas e alíquotas do sobrenadante foram utilizadas para leitura de fluorescência no Cytation5, com os parâmetros ideais de pioverdina (excitação: 398 nm e emissão: 455 nm). A fluorescência foi normalizada pelo número total de unidades formadoras de colônia para cada linhagem. A razão de produção de pioverdina por célula confirmou que a linhagem *pvdA* não sintetiza este

sideróforo **(Figura 13)**, indicando que uma outra molécula fluorescente era responsável, pelo menos em parte, pelas diferenças na fluorescência observadas com o uso do Typhoon.

Nas condições testadas, a linhagem Δ*PA14_00800* produziu mais pioverdina por célula que a linhagem parental, o que não era esperado **(Figura 14)**. No entanto, é possível que a produção de pioverdina tenha ocorrido durante a incubação *overnight* em PBS 1x, já que as células não foram mortas antes desta etapa e estariam em meio líquido em carência de ferro, sem contato com a superfície, condição em que o mutante Δ*PA14_00800* é indistinguível da selvagem. Vale ressaltar que a diferença de pigmentação entre o meio da linhagem parental e do mutante em *PA14_00800* foi mantida durante este período, sugerindo que não houve uma variação significante na concentração de pigmentos fluorescentes entre o período inicial e final de incubação.

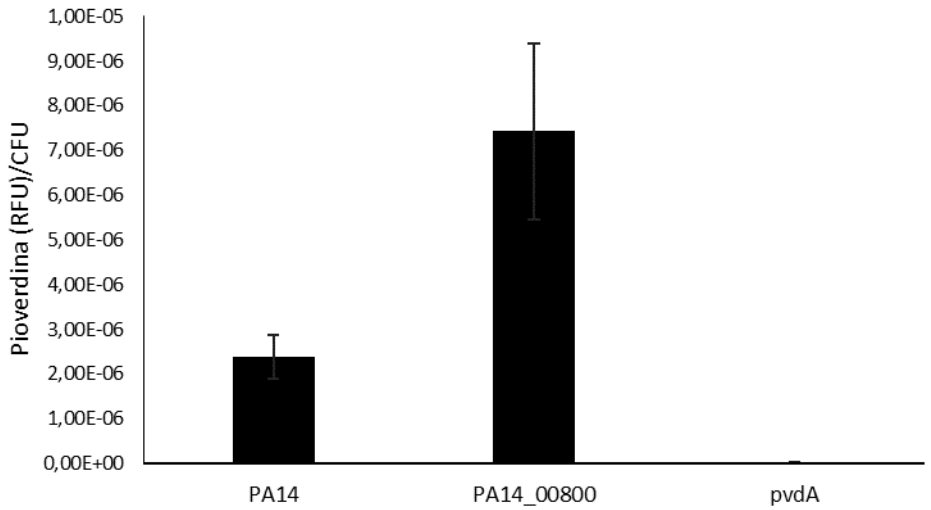

Figura 14. **PA14_00800 está envolvida na produção de pioverdina**. Razão da produção de pioverdina, em unidades relativas de fluorescência (RFU) por célula. Placas de *swarming* em M9 modificado foram usadas para determinação da fluorescência relativa e de unidades formadoras de colônia para cada linhagem. A leitura de fluorescência foi realizada no Cytation5 (BioTek), com excitação em 398 nm e emissão em 455 nm. *pvdA*, controle negativo. Experimento representativo de três réplicas biológicas.

4.4.2.1. A fluorescência das colônias é parcialmente dependente de PQS

Apesar de a fluorescência de *P. aeruginosa* ser associada, primariamente, à produção de pioverdina, esta não é a única molécula naturalmente fluorescente sintetizada por este patógeno. PQS, uma das 4-hidroxi-2-alquilquinolonas (HAQ) produzidas por *Pseudomonas*, que faz parte do sistema de percepção de quórum e atua sobre a expressão de diversos fatores de virulência, também é fluorescente e as suas propriedades físicas já foram estudadas (Palmer *et al.*, 2011). O sinal de fluorescência captado no Typhoon em colônias de *P. aeruginosa* pode, portanto, ser parcialmente dependente da presença de PQS. A fim de investigar esta hipótese, duas linhagens incapazes de sintetizar PQS foram utilizadas, *pqsA pqsH* e *pqsH*. A diferença-chave entre as suas linhagens é a ausência de precursores de PQS, como HHQ, molécula biologicamente ativa (Xiao *et al.*, 2006), na linhagem *pqsA pqsH*, uma vez que PqsA é responsável pela entrada do ácido antranílico na via de biossíntese de PQS (Coleman *et al.*, 2008). PqsH, por sua vez, converte HHQ em PQS na presença de oxigênio (Schertzer *et al.*, 2010), logo linhagens *pqsH* não são capazes de sintetizar PQS, mas sintetizam o precursor HHQ, não fluorescente. Estas linhagens foram utilizadas para que a interferência dos precursores de PQS na fluorescência observada no Typhoon fosse descartada completamente. O sinal de fluorescência no Typhoon das linhagens deficientes em PQS foi mais fraco do que o da linhagem parental, e a mutação dupla *pqsA pqsH* parece afetar mais a fluorescência que o mutante simples *pqsH* **(Figura 15)**. Assim como para pioverdina, o sinal de fluorescência não pode ser completamente atribuído ao PQS, uma vez que linhagens deficientes na sua produção ainda são fluorescentes nessa situação e pode ser atribuído à produção de pioverdina.

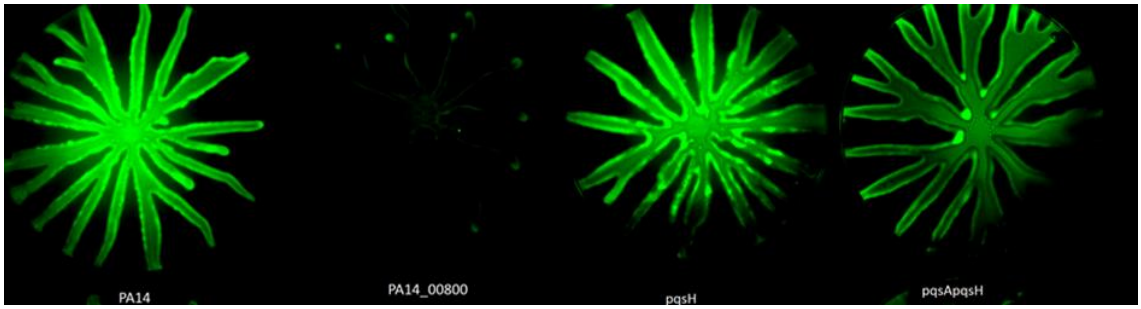

Figura 15. **Sinais de fluorescência de colônias de *swarming* detectadas no Typhoon.** Placas de *swarming* em meio M9 modificado das linhagens PA14, Δ*PA14_00800*, *pqsH* e *pqsA pqsH* foram escaneadas após incubação de 16h à 34°C acrescidas de 8h à temperatura ambiente no equipamento Typhoon FLA 9500. Excitação em 473 nm e emissão em 560-580 nm, com o uso do filtro de emissão BPG1. A imagem foi submetida a alterações no contraste e coloração artificial.

Como previamente citado, PQS faz parte do sistema de percepção de quórum em *P. aeruginosa*. Juntamente com os sistemas baseados em *N*-acilhomoserina lactonas (AHL), Las e Rhl, *P. aeruginosa* coordena a expressão de genes em nível populacional, modulando, por exemplo, sua virulência e motilidade. O sistema de percepção de quórum é organizado hierarquicamente em *P. aeruginosa*, com o sistema Las iniciando a cascata de ativação desse sistema. O fator responsável por desencadear as cascatas de regulação é a ligação de moléculas sinalizadoras, conhecidas como autoindutores, aos seus reguladores cognatos. A ligação acontece quando níveis suficientemente elevados de autoindutores estão presentes dentro das células, numa maneira dependente da densidade populacional. A molécula sinalizadora do sistema Las, *N*-3-(oxo-dodecanoil)-L-homoserina lactona (3-oxo-C_{12}-HSL), quando ligada a LasR, atua na ativação da transcrição dos genes necessários para a síntese do autoindutor do sistema Rhl, *N*-butanoil-L-homoserina lactona (C_4-HSL), e do regulador cognato RhlR, além do regulador do sistema PQS, MvfR (ou PqsR) (Pesci *et al.*, 1997; Déziel *et al.*, 2004, 2005; Lee and Zhang, 2015).

O putativo envolvimento de PQS na fluorescência de colônias de *swarming* de *P. aeruginosa*, principalmente no mutante Δ*PA14_00800*, poderia sugerir que os níveis dos

autoindutores do sistema de percepção de quórum estivessem alterados nesta linhagem. Portanto, ensaios para a quantificação dessas moléculas foram conduzidos.

As moléculas sinalizadoras foram extraídas de colônias crescidas em meio M9 modificado 1% ágar por 24h à 37°C das linhagens PA14 e Δ*PA14_00800*. As concentrações de HHQ e de PQS foram cerca de três vezes menores na linhagem mutante em *PA14_00800* que em PA14 **(Figura 16)**. Portanto, PA14_00800 deve alterar, de alguma forma, aspectos da comunicação entre as células bacterianas, por reduzir os níveis de PQS e HHQ.

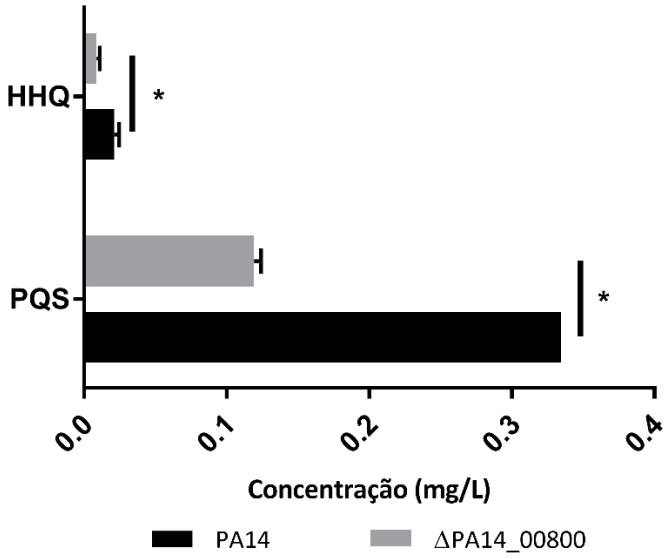

Figura 16. **PA14_00800 é importante para a síntese de PQS e HHQ.** A concentração das moléculas sinalizadoras PQS e HHQ foi determinada a partir de extração por metanol de colônias crescidas em M9 por 24h à 37°C. A quantificação foi feita por LC/MS no modo de ionização *electrospray* em modo positivo (ESI+), em relação a um controle interno. As diferenças nas concentrações de HHQ e PQS são estatisticamente signitifativas, com valor-p=0,286 para ambas em teste t não paramétrico.

4.4.2.2. Fluorescência de *P. aeruginosa* em meio sólido

Como os trabalhos encontrados na literatura se referem à produção de pioverdina em meio líquido e o fenótipo do mutante Δ*PA14_00800* é evidenciado apenas em placas, uma colaboração com o Professor Erick Bastos, especialista na química de pigmentos naturais do Instituto de Química – USP, foi estabelecida para estudar a produção deste e de outros pigmentos fluorescentes em resposta ao contato com a superfície, assim como avaliar

hipóteses alternativas que justificassem os fenótipos observados para a linhagem Δ*PA14_00800*.

Para tal, algumas linhagens foram construídas, além da complementação da mutação em PA14_00800 pela integração do gene selvagem no sítio ctx do cromossomo, mais estável que a complementação plasmidial, em cópia única e com o promotor endógeno. O ensaio, que utiliza fluorescência sincronizada, consegue distinguir as moléculas fluorescentes sintetizadas pelas colônias por fazer uma varredura do espectro destas moléculas as excitando em diferentes comprimentos de onda e detectando o perfil de emissão em cada um deles. Foram analisadas as linhagens PA14, Δ*prlC*, Δ*PA14_00800*, Δoperon, Δ*PA14_00800*::p*00800*, Δ*pqsA*, *pvdA*, Δ*pqsA*Δ*PA14_00800*, Δ*psqApvdA*, Δ*PA14_00800pvdA* e Δ*pqsA*Δ*PA14_00800pvdA*. Resultados preliminares mostraram a presença de três picos de emissão na linhagem selvagem, que desaparecem no mutante em *pvdA*, indicando que os três picos estão relacionados, de alguma forma, a biossíntese de pioverdina. No mutante Δ*PA14_00800*, a amissão de um dos picos parece estar descolada. Análises mais detalhadas dos dados ainda estão em andamento.

4.5. Perfil transcriptômico da linhagem Δ*PA14_00800*

Uma estratégia transcritômica através do sequenciamento de nova geração (NSG), RNASeq, foi utilizada na tentativa de compreender o papel de PA14_00800 na fisiologia de *P. aeruginosa*, principalmente em relação a produção de moléculas fluorescentes em resposta ao contato com superfícies. Para tal, colônias das linhagens PA14 e Δ*PA14_00800* foram crescidas em meio M9 modificado com 1% de ágar e incubadas à 37°C por 24 horas. A intensidade de fluorescência das colônias das linhagens em estudo é diferente nessa condição e justifica sua escolha **(Figura 10C).**

Para compreensão do perfil de resposta fisiológica na linhagem Δ*PA14_00800*, em comparação à linhagem parental, foi realizada uma classificação funcional dos genes diferencialmente expressos, usando a anotação genômica PseudoCap (*Pseudomonas aeruginosa* Community Annotation Project)(Winsor *et al.*, 2005) **(Figura 17)**.

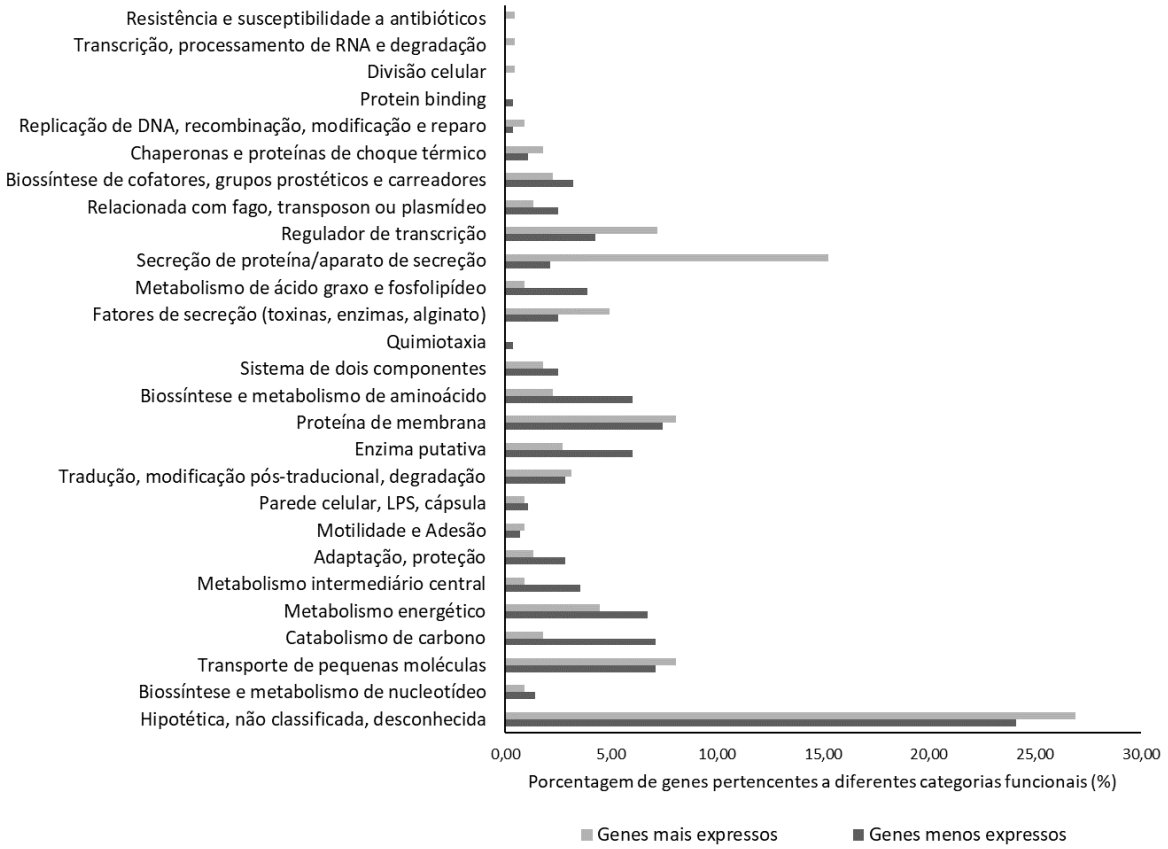

Figura 17. **Caracterização funcional dos genes diferencialmente expressos na linhagem Δ*PA14_00800***, em comparação com PA14. Os genes foram categorizados em grupos funcionais com base na anotação PseudoCap e as barras refletem a frequência de cada grupo dentro dos genes mais ou menos expressos na linhagem Δ*PA14_00800* comparada com PA14.

Tabela 3. Seleção de genes diferencialmente expressos na linhagem Δ*PA14_00800* comparado com PA14. Os genes diferencialmente expressos foram subcategorizados em genes cuja expressão é regulada por MvfR, aos relacionados ao sistema de secreção do tipo VI (T6SS), ao sistema de secreção do tipo III (T3SS), ao transporte de açúcares e ao catabolismo de glicose.

PA14 id	PAO1 id	Gene	Razão	Descrição
Genes regulados por MvfR				
PA14_51420	*PA0997*	*pqsB*	0,50	2-heptyl-4(1H)-quinolone synthase subunit PqsB
PA14_51410	*PA0998*	*pqsC*	0,50	2-heptyl-4(1H)-quinolone synthase subunit PqsC
PA14_51390	*PA0999*	*pqsD*	0,55	3-oxoacyl-ACP synthase
PA14_51380	*PA1000*	*pqsE*	0,56	Quinolone signal response protein
PA14_51430	*PA0996*	*pqsA*	0,58	Anthranilate-coenzyme A ligase
PA14_51360	*PA1001*	*phnA*	0,62	Anthranilate synthase component I
PA14_51350	*PA1002*	*phnB*	0,69	Anthranilate synthase component II
Genes relacionados ao T6SS				
PA14_34110	*PA2362*	*dotU3*	0,65	Type IV / VI secretion system, DotU
PA14_33990	*PA2371*	*clpV3*	0,68	ClpV3
PA14_34130	*PA2361*	*icmF3*	0,69	IcmF3
Genes relacionados ao T3SS				
PA14_42310	*PA1719*	*pscF*	6,39	Type III secretion system, needle-like filament
PA14_42570	*PA1697*	*pscN*	8,29	Type III secretion system, ATPase
PA14_42250	*PA1725*	*pscL*	4,22	Type III secretion system
PA14_42440	*PA1709*	*popD*	7,07	Translocator outer membrane protein PopD precursor
PA14_42450	*PA1708*	*popB*	6,94	Translocator protein PopB
PA14_42470	*PA1706*	*pcrV*	6,44	Type III secretion protein PcrV
PA14_42390	*PA1713*	*exsA*	2,44	Transcriptional regulator ExsA
PA14_42430	*PA1710*	*exsC*	3,32	Type III secretion system, anti-anti-activator
PA14_51520		*spcU*	2,31	Type III secretion system, chaperone
PA14_00560	*PA0044*	*exoT*	6,11	Exoenzyme T
PA14_51530		*exoU*	2,93	Cytotoxin ExoU
PA14_36345	*PA2191*	*exoY*	4,35	Adenylate cyclase, ExoY
Genes relacionados ao transporte de açúcar				
PA14_37250	*PA2114*	*PA14_37250*	0,21	Major facilitator transporter (sugar transport proteins signature2)
PA14_22980	*PA3190*	*PA14_22980*	0,25	Sugar ABC transporter substrate-binding protein
PA14_22940	*PA3192*	*gltR*	0,35	Two-component response regulator GltR
Genes relacionados ao catabolismo de glicose				
PA14_22930	*PA3193*	*glk*	0,49	Glucokinase
PA14_23070	*PA3183*	*zwf*	0,21	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase
PA14_23080	*PA3182*	*pgl*	0,25	6-phosphogluconolactonase
PA14_22910	*PA3194*	*edd*	0,34	Phosphogluconate dehydratase

Tabela 3 (Continuação). Seleção de genes diferencialmente expressos na linhagem Δ*PA14_00800* comparado com PA14. Os genes diferencialmente expressos foram subcategorizados em genes cuja expressão é regulada por MvfR, aos relacionados ao sistema de secreção do tipo VI (T6SS), ao sistema de secreção do tipo III (T3SS), ao transporte de açúcares e ao catabolismo de glicose.

Genes relacionados ao catabolismo de glicose				
PA14_23090	*PA3181*	*eda*	0,36	Keto-hydroxyglutarate-aldolase/keto-deoxy-phosphogluconate aldolase
PA14_23060	*PA3184*	*hexR*	0,63	DNA-binding transcriptional regulator HexR

A análise de expressão diferencial indicou 382 genes, dentre eles 173 regulados positivamente e 209 regulados negativamente na linhagem Δ*PA14_00800* quando comparada com a linhagem parental **(Apêndice 1)**. Os genes mais expressos foram agrupados em 25 categorias funcionais, enquanto os menos expressos em 24 categorias. A categoria mais representada em ambos os grupos foi a de proteínas hipotéticas e de proteínas com função desconhecida. Os genes relacionados com a biossíntese e/ou exportação de pioverdina não foram encontrados na análise de diferença de expressão, indicando que não há diferença na transcrição destes genes entre a linhagem parental e Δ*PA14*_00800 na condição testada. Portanto, o efeito putativo de PA14_00800 sobre a produção/exportação de pioverdina não ocorre no nível de transcrição. Este dado não descarta a possibilidade de PA14_00800 atuar pós-transcionalmente na biossíntese deste sideróforo, seja direta ou indiretamente. Essa possibilidade não foi investigada neste trabalho e, uma vez explorada, pode auxiliar na compreensão de mecanismos de regulação de pioverdina em *Pseudomonas* fluorescentes.

4.5.1. Sistema de secreção do tipo III

Duas categorias relacionadas com a secreção de proteínas (Fatores de secreção e Secreção de proteína/Aparato de secreção), foram enriquecidas no grupo dos genes induzidos na linhagem Δ*PA14_00800*. Este enriquecimento está relacionado à indução do T3SS, um dos determinantes de virulência utilizados por *P. aeruginosa* para o estabelecimento de infecções.

Este aparato de secreção é utilizado para injetar proteínas efetoras em células eucarióticas, culminando na morte destas. Para que o sistema funcione adequadamente, há necessidade de: (1) um complexo-agulha, que transporta substratos do citosol bacteriano ao meio externo através das duas membranas e do espaço periplasmático; (2) um complexo de translocação, que medeia a secreção das proteínas efetoras nas células eucarióticas; (3) proteínas regulatórias, centrais no processo de ativação/bloqueio do funcionamento do T3SS; (4) chaperonas cognatas a algumas das proteínas secretadas pelo T3SS, que são necessárias para que a secreção máxima destas proteínas ocorra; e (5), as proteínas efetoras em si (revisado por (Hauser, 2009). Dentre os genes induzidos na linhagem Δ*PA14_00800*, houve representação de genes requeridos para todas as etapas citadas acima **(Tabela 3)**, indicando um possível envolvimento entre PA14_00800 e o funcionamento do T3SS.

Para confirmar o envolvimento sugerido por análise de RNASeq entre o T3SS, central na virulência de *P. aeruginosa*, e PA14_00800, cDNA foi obtido pela reação de transcrição reversa a partir do RNA total extraído de colônias de PA14 e Δ*PA14_00800*, nas mesmas condições usadas para o RNASeq. RT-PCR quantitativo foi utilizado para avaliar os níveis transcricionais relativos de genes do T3SS. PA14_00800 altera a expressão de alguns destes genes **(Figura 18)**, como indicado pela análise do RNASeq. No entanto, alguns destes alvos, cuja expressão foi induzida signifitivamente no RNASeq, tal como *pcsN* (8,29x) e *popD* (7,07x), não foram confirmados por qRT-PCR **(Figura 18)**. A regulação do T3SS ocorre tanto no nível transcricional quanto em resposta ao início de secreção. O regulador de transcrição ExsA induz a transcrição dos genes que constituem o T3SS, incluindo a sua própria transcrição. No entanto, quando as células estão em condições não indutoras, tal como no meio de cultura utilizado nos ensaios, a transcrição dos genes do T3SS é inibida pela interação de ExsA com ExsD, seu anti-ativador. Nestas condições, ExsC – o anti-anti-ativador do sistema, interage com

ExsE. A interconexão entre o processo de secreção e a ativação transcricional é mediada pela secreção de ExsE pelo T3SS ao meio extracelular ou às células hospedeiras. Em condições indutoras, a concentração de ExsE decai nas bactérias; uma vez livre, ExsC desloca a interação de ExsA com ExsD, ligando-se ao último. Este processo culmina na indução transcricional do T3SS pela ação de ExsA. É plausível, portanto, que a indução do T3SS na linhagem Δ*PA14_00800* seja devido à regulação positiva de ExsA, culminando na indução dos outros genes que fazem parte deste sistema de secreção.

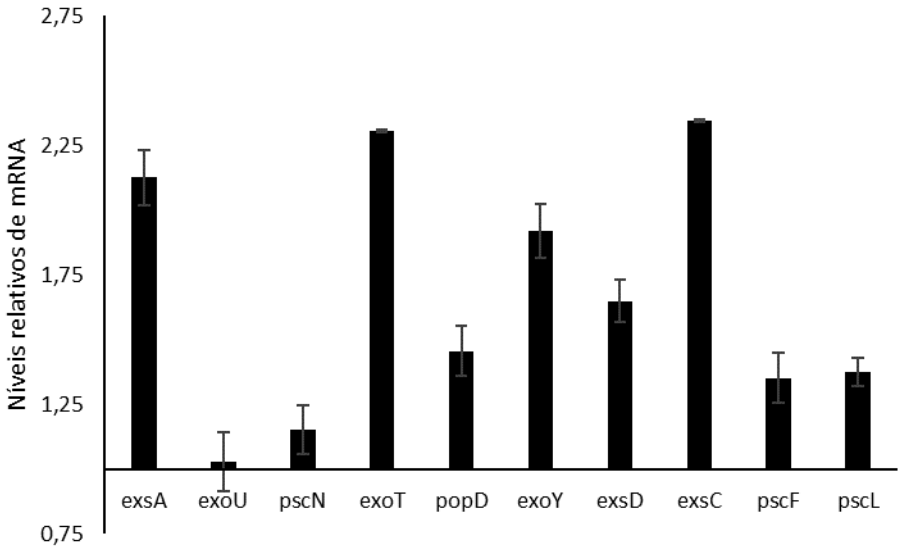

Figura 18. **PA14_00800 altera a expressão de genes relacionados ao T3SS.** RT-PCR quantitativo de genes relacionados ao sistema de secreção do tipo III que apareceram na análise de expressão diferencial do RNASeq. O cDNA obtido pela reação de transcrição reversa do RNA total de PA14 ou Δ*PA14_00800* crescidas em M9 modificado solidificado com 1% de ágar por 24 horas a 37°C. Os resultados são valores relativos em comparação a linhagem parental PA14, considerada como 1. Os valores são representativos de pelo menos duas duplicatas biológicas.

Além dos mecanismos de regulação do T3SS mencionados acima, este sistema também é regulado por uma via de sinalização dependente do segundo mensageiro cAMP e do fator transcricional que se liga a cAMP, Vfr (Wolfgang *et al.*, 2003). Os sinais ambientais que modulam os níveis de cAMP ainda são elusivos, mas, como mencionado na **Introdução**, o contato, via T4P, é capaz de elevar os níveis intracelulares deste nucleotídeo cíclico. Vfr é um fator de transcrição que responde ao aumento dos níveis de cAMP, ativando a expressão de

seu regulon, que inclui os genes do T3SS e outros genes relacionados à virulência de *P. aeruginosa* (Wolfgang *et al.*, 2003; Coggan and Wolfgang, 2012). A homeostase neste sistema é dependente da fosfodiesterase CpdA, que atua na redução dos níveis de cAMP pela sua hidrólise (Fuchs *et al.*, 2010). Recentemente, o mecanismo de indução do T3SS por Vfr-cAMP foi elucidado e consiste na regulação positiva de *exsA*, culminando na ativação transcricional do T3SS (Marsden *et al.*, 2016). Portanto, o contato pode modular a expressão do T3SS por elevar os níveis intracelulares de cAMP, favorecendo a transcrição de *exsA* e, globalmente, dos outros genes deste sistema de secreção. Nossas análises transcritômicas indicam a regulação negativa de *cpdA* na linhagem Δ*PA14_00800* quando comparado à linhagem parental **(Tabela A1)**, que resultaria numa concentração intracelular maior de cAMP na linhagem mutante do que em PA14. Este dado seria capaz de explicar a indução de *exsA* e, como consequência, do T3SS na linhagem Δ*PA14_00800*, uma vez que a via de sinalização dependente de cAMP e Vfr estaria mais ativa nesta linhagem. Dados preliminares indicam que os níveis intracelulares de cAMP de colônias de Δ*PA14_00800* são superiores aos da linhagem parental, corroborando o envolvimento de PA14_00800 com o T3SS via Vfr-cAMP.

4.5.2. Genes da via de biossíntese de PQS

O envolvimento de PA14_00800 na percepção de quórum, evidenciado pela menor concentração das moléculas de sinalização HHQ e PQS **(Figura 16)**, foi corroborado na análise transcritômica. O operon *pqsABCDE*, requerido para a síntese das moléculas biologicamente ativas HHQ e PQS, está entre os genes menos expressos na linhagem Δ*PA14_00800* comparada à linhagem selvagem. Além das proteínas necessárias na síntese destes derivados de alquilquinolonas, o operon também codifica PqsE, um regulador da virulência de *P. aeruginosa* cuja expressão independe do regulador transcricional MvfR (Farrow *et al.*, 2008). Estes genes foram regulados negativamente, cerca de duas vezes, em Δ*PA14_00800*

comparada a linhagem parental **(Tabela 3)**. O nível de transcrição de MvfR, o regulador cognato destas moléculas que atua numa alça de retroalimentação positiva para a síntese de PQS e HHQ, não foi alterado entre as linhagens, sugerindo que os efeitos na transcrição estariam restritos à redução da sua atividade. Poucos genes sabidamente regulados por MvfR foram encontrados diferencialmente expressos na análise do RNASeq realizada durante este trabalho. Dentre eles estão *phnAB*, genes da biossíntese de piocianina, que também estão moderadamente regulados negativamente **(Tabela 3)** (Déziel *et al.*, 2004).

A diferença da intensidade de fluorescência das colônias das linhagens PA14 e Δ*PA14_00800*, atribuída a produção de pioverdina e PQS, pode ser relacionada, no nível transcricional, pela regulação negativa dos genes da via de biossíntese de PQS. A menor expressão destes genes pode ser responsável pela menor concentração de HHQ e PQS produzidos pela colônia de Δ*PA14_00800* em relação à linhagem parental, corroborando os resultados de dosagem de PQS e HHQ **(Figura 16)**. PQS também afeta a produção de pioverdina. A adição exógena de PQS em meio líquido estimula a agregação celular e este sinal aumenta a produção de pioverdina, como mencionado na **Introdução** (Kang *et al.*, 2017). A maior produção de PQS pela linhagem parental pode, portanto, induzir a produção de pioverdina por esta via, culminando numa fluorescência mais intensa quando comparada à linhagem Δ*PA14_00800*.

4.5.3. Genes de transporte e catabolismo de glicose

Como previamente mencionado, glicose não é fonte preferencial de carbono para bactérias do gênero *Pseudomonas*, mas atua como fonte de carbono de preferência intermediária e é metabolizada prontamente por estas bactérias. O catabolismo de glicose, assim como o de outros carboidratos, ocorre numa versão cíclica da via Entner-Doudoroff em *Pseudomonas*, e tem como substrato inicial 6-fosfogluconato, produto da via fosforilativa de

glicose **(Figura 19)** (Conway, 1992; Hager *et al.*, 2000). Os genes envolvidos na via Entner-Doudoroff, responsável pela catabolização de glicose a gliceraldeído-3-fosfato e piruvato, são regulados coordenadamente e induzidos quando as células são cultivadas em glicerol, manitol, glicose ou gluconato (Hager *et al.*, 2000). Os genes requeridos para a via Entner-Doudoroff, assim como os da via fosforilativa da glicose, estão reprimidos na análise transcritômica da linhagem Δ*PA14_00800* em comparação à linhagem parental **(Figura 19** e **Tabela 3)**, indicando um possível desequilíbrio na metabolização de glicose e outros carboidratos na linhagem Δ*PA14_00800*.

Dois reguladores de trancrição que regulam a expressão dos genes de catabolismo de glicose estão diferencialmente expressos em Δ*PA14_00800* em relação a PA14 **(Tabela 4)**. Assim como os genes das enzimas das vias de catabolismo, o regulador de resposta GltR, que atua posivitamente no transporte de glicose para às células (Sage *et al.*, 1996), teve sua expressão reprimida na linhagem Δ*PA14_00800* em comparação à linhagem parental. HexR, um dos repressores transcricionais do sistema (Daddaoua *et al.*, 2009), também teve a sua expressão regulada negativamente, de encontro ao esperado.

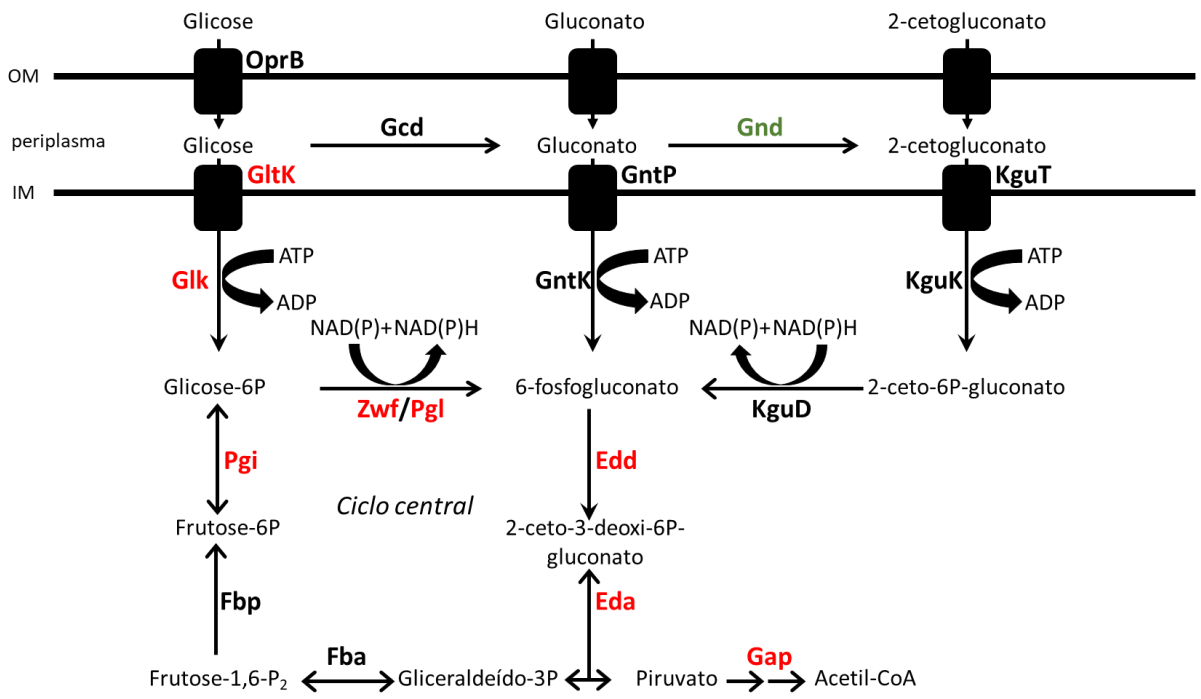

Figura 19. **Representação simplificada do metabolismo de glicose em *Pseudomonas*.** As enzimas metabólicas da via fosforilativa de glicose e da via Entner-Doudoroff cíclica estão indicadas. Em vermelho, proteínas cujos genes foram menos expressos; em verde, mais expressos; em preto, não diferencialmente expressos na análise de RNASeq da linhagem Δ*PA14_00800* em comparação à linhagem parental. OM, membrana externa (outer membrane); IM, membrana interna (inner membrane); OprB, porina seletiva para açúcares; Gcd, glicose desidrogenase; Gnd, gluconate desidrogenase; GltK, transportador de glicose; GntP, permease de gluconato; KguT, transportador de 2-cetogluconato; Glk, glicoquinase; GntK, gluconoquinase; KguK, 2-cetogluconato quinase; Zwf, glicose-6-fosfato 1-desidrogenase; Pgl, 6-fosfogluconolactonase; KguD, 2-cetogluconato redutase; Edd, 6-fosfogluconato desidratase; Eda, 2-ceto-3-deoxi gluconato aldolase; Gap, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; Fba, frutose 1,6-bifosfato aldolase; Fbp, frutose 1,6-bifosfatase; Pgi, fosfoglicoisomerase. Figura modificada de (Temple *et al.*, 1998; Hager *et al.*, 2000; Daddaoua *et al.*, 2009, 2017).

É importante lembrar que as culturas utilizadas para análise do RNASeq foram feitas em meio M9 modificado 1% ágar, que contém aminoácidos e glicose como fontes de carbono. Nessa condição, as células usam preferencialmente os aminoácidos como fonte de carbono e energia, não havendo diferenças na taxa de crescimento entre as linhagens. A repressão catabólica, ativa nesta situação, diminui a utilização de glicose, mas isso não significa que o catabolismo deste açúcar não ocorra em paralelo com a utilização de aminoácidos em meio M9 modificado, mesmo que em níveis mínimos. Talvez por este motivo, a repressão dos genes envolvidos no metabolismo de glicose não é fator limitante para o crescimento das células da linhagem mutante nesta situação **(Figura 11)**. Em meio CAA, no entanto, a presença de apenas

aminoácidos como fonte de carbono e energia não é suficiente para que a linhagem Δ*PA14_00800* apresente capacidade de *swarming*. A adição de glicose ao meio pode servir tanto como um sinal químico quanto como uma fonte adicional de carbono e energia que, juntamente com os íons cálcio, suprime o fenótipo mutante. Apesar dos ensaios de expressão não terem sido realizados em CAA ou CAA suplementado com glicose e cálcio, a menor área de *swarming* da linhagem Δ*PA14_00800* sugere uma relação entre o catabolismo de glicose e a motilidade do tipo *swarming*. O requerimento de glicose e cálcio não foi observado em outros tipos de motilidade celular para a linhagem Δ*PA14_00800* (dados não mostrados).

Para confirmar a relação entre estes dados, seria importante avaliar os níveis relativos dos transcritos relacionados às vias de catabolismo de glicose em células de Δ*PA14_00800* e PA14 crescidas em meio CAA e em meio CAA suplementado com glicose. Nestas condições seria mais fácil compreender o efeito da adição de glicose na motilidade destas linhagens e avaliar se há relação direta entre este comportamento e a catabolismo de glicose. Além das linhagens de interesse deste trabalho, seria interessante avaliar, no mesmo ensaio, o comportamento do mutante de deleção de *crc*, que codifica o regulador do catabolismo de carbono, e do sistema de dois componentes *cbrAB* (mencionados em **Resultados e Discussão,** subseção **4.3.2.1)**.

Além da relação entre estes genes no catabolismo de glicose, CbrA regula positivamente a expressão dos genes da biossíntese de pioverdina em células em superfície semissólida (Yeung *et al.*, 2011). A deleção de *crc* reduz pela metade a produção de pioverdina em *P. aeruginosa*, além de afetar drasticamente a coloração da colônia de *swarming* (Linares *et al.*, 2010). Dados preliminares indicam a ausência de sinal de fluorescência no scanner Typhoon para o mutante de *crc*, similar ao observado na linhagem Δ*PA14_00800*, reforçando a relação entre PA14_00800 e o catabolismo de carbono.

4.6. PA14_00800 tem efeito positivo na expressão de RsmZ

A mudança no perfil de infecção, entre o agudo e o crônico, é regulada pelo sistema Gac/Rsm, como mencionado na **Introdução**. A variação neste perfil está associada à ativação de diferentes sistemas de secreção, que ocorre em situações antagônicas, dentre outros fatores. A atividade do T3SS confere a infecção um perfil agudo de citotoxicidade e, ao longo da infecção, o T6SS se torna ativo, estando relacionado com a cronicidade. Outras diferenças entre os estados agudo e crônico da infecção são a inibição dos sistemas de percepção de quórum e a ativação de genes responsáveis pelo crescimento em forma de biofilme. Como também comentado na **Introdução**, a produção de pioverdina é restrita aos estágios iniciais da infecção, em que o sistema Gac/Rsm encontra-se inativo.

Na análise do RNASeq, dentre os genes diferencialmente expressos entre as linhagens PA14 e Δ*PA14_00800* estão os genes relacionados aos T3SS e T6SS. Como o esperado pela regulação inversa destes pelo sistema Gac, enquanto T3SS é regulado negativamente por PA14_00800, T6SS é regulado positivamente **(Tabela 3)**. Para observar se a regulação destes sistemas de virulência era mediada pelos níveis de RsmY e RsmZ, a análise da expressão destes pequenos RNAs foi feita com base na atividade do gene repórter *lacZ* fusionado aos promotores dos genes *rsmY* e *rsmZ*. As construções foram cedidas pelo Prof Stephen Lory (Brencic *et al.*, 2009) e inseridas nas linhagens PA14, Δ*PA14_00800* e *gacA*. *gacA* foi usada como controle negativo, uma vez que a expressão de *rsmY* e *rsmZ* é dependente de GacA. A inativação desse gene, conforme o esperado, reduziu drasticamente a expressão tanto de RsmY quanto de RsmZ em relação a PA14 **(Figura 20)**. PA14_00800 tem efeito positivo exclusivamente na expressão de RsmZ, não tendo influência nos níveis de RsmY **(Figura 20)**. Esse dado sugere, portanto, que o efeito de PA14_00800 sobre a expressão de RsmZ ocorre de maneira independente do sistema Gac e esta hipótese ainda necessita de confirmação.

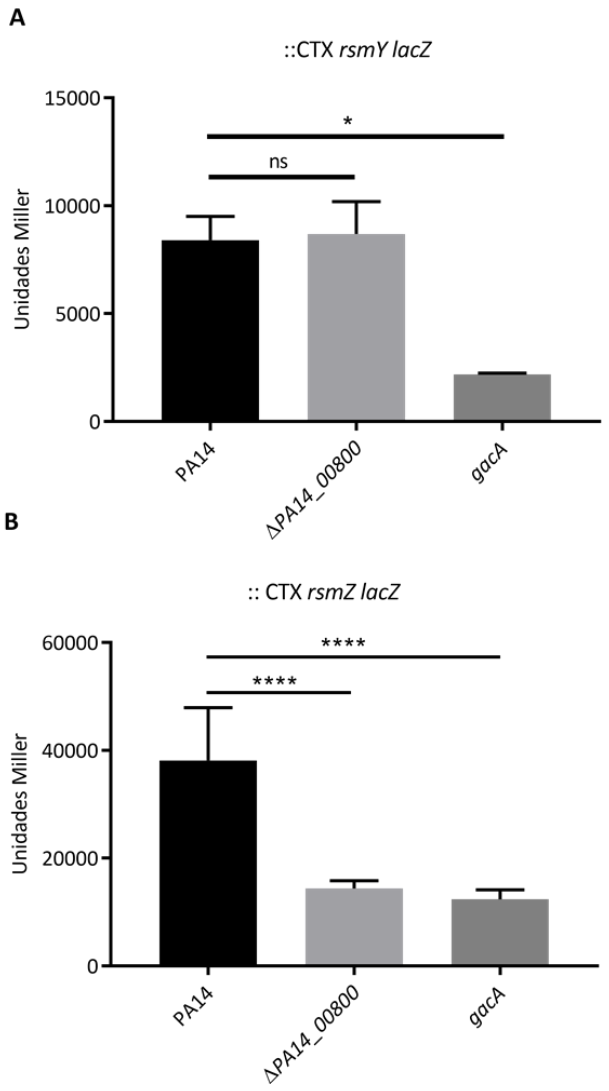

Figura 20. **PA14_00800 regula a expressão do pequeno RNA RsmZ.** Ensaios de expressão baseados na atividade de *lacZ* sob o controle dos promotores de *rsmY* e *rsmZ* foram feitos com células crescidas em meio M9 modificado 1% ágar por 24h à 37°C das linhagens PA14, Δ*PA14_00800* e *gacA*. A atividade promotora de *rsmY* e *rsmZ* está indicada em unidades Miller. Teste T foi utilizado como ferramente estatística; ns, não significativo; *, valor-p < 0,05; ****, valor-p < 0,0001.

A redução dos níveis de RsmZ na linhagem Δ*PA14_00800* favorece a forma livre de RsmA, que atua na indução do T3SS, regulado positivamente na linhagem Δ*PA14_00800* comparada a linhagem parental **(Tabela 3)**. A atuação de PA14_00800 sobre a expressão deste sistema de virulência pode, portanto, ser mediada parcialmente pelos níveis de RsmZ e a compreensão do mecanismo pelo qual essa regulação ocorre permanece elusiva. O envolvimento de PA14_00800 com o T3SS pode, então, acontecer tanto no nível da modulação dos níveis de cAMP quanto na regulação de RsmZ e resta saber se o mecanismo

de ação de PA14_00800 é acoplado a esses dois fatores em conjunto ou se esta proteína age, independentemente, em duas vias distintas que coordenam o mesmo comportamento celular.

A diferença entre condições de crescimento, em meio líquido e células em superfície, altera diversos perfis de expressão. Recentemente, num esforço de melhor compreender a regulação que rege o *swarming*¸ foi observada pelo grupo do nosso colaborador E. Déziel a regulação diferencial dos pequenos RNAs RsmY e RsmZ em células em superfície, inclusive naquelas de *swarming* (Jean-Pierre *et al.*, 2017). HptB, uma proteína de transferência de fosforila previamente caracterizada na regulação exclusiva de RsmY (Bordi *et al.*, 2010), regula negativamente a expressão de RsmY/Z em culturas líquidas e em células de *swarming* de PA14 (Jean-Pierre *et al.*, 2017). A regulação positiva dos pequenos RNAs no mutante de *hptB* foi abolida em culturas líquidas do mutante duplo *hptBgacA*, como o esperado na deleção do principal regulador positivo de RsmY/Z. No entanto, em células em superfície, o efeito da mutação dupla só foi observada para RsmY e a regulação positiva de RsmZ se manteve (Jean-Pierre *et al.*, 2017), indicando que algum outro regulador transcricional positivo, além de GacA, e ativo em resposta ao contato das células a superfícies, é responsável pela manutenção dos níveis de RsmZ nestas condições.

Em adição ao papel de GacA na regulação de RsmY/Z, outros reguladores globais foram descritos como moduladores da expressão destes RNAs em culturas planctônicas. MvaT e MvaU, proteínas HN-S de ligação ao DNA (*histone-like nucleoid structuring proteins*), foram identificadas como reguladores negativos da expressão de RsmZ, não afetando a expressão de RsmY (Castang *et al.*, 2008). O regulador BswR, inicialmente caracterizado como regulador de motilidade e de formação de biofilme, é capaz de deslocar MvaT do promotor de *rmsZ*, aliviando a repressão da expressão de RsmZ (Wang *et al.*, 2014). O papel destes reguladores,

assim como a interação entre estas proteínas que culminam na modulação de RmsZ no nível transcricional, ainda não está completamente elucidado. No entanto, o envolvimento destas vias na atuação positiva de PA14_00800 na expressão exclusiva do pequeno RNA RsmZ deve ser explorada mais intensamente.

4.7. Considerações finais

Estudos para a compreensão da modulação fisiológica em resposta a estímulos mecânicos são recentes e, ainda assim, complexos. A percepção de contato por *P. aeruginosa* é um dos fatores que influenciam, direta e indiretamente, a expressão diversos fatores de virulência, tais como a produção de pioverdina e a ativação do T3SS (Dasgupta *et al.*, 2006; Visaggio *et al.*, 2015). De fato, células de *P. aeruginosa* em contato com uma superfície são mais virulentas que células planctônicas num modelo de infecção em *Dictyostelium discoideum* (Siryaporn *et al.*, 2014). As vias responsáveis pela percepção do sinal mecânico, assim como a identidade deste sinal, permanecem elusivas, apesar do envolvimento dos segundo-mensageiros cAMP e c-di-GMP nesta via já ser estabelecido (Luo *et al.*, 2015).

Este trabalho relacionou a proteína PA14_00800 com respostas celulares que ocorrem após a percepção de contato. PA14_00800 contém o domínio conservado DUF2387, presente em outras gamaproteobactérias e este trabalho pode auxiliar na compreensão do papel fisiológico dos homólogos de PA14_00800. A fluorescência de colônias crescidas em meio pobre em ferro é modulada por PA14_00800 e envolve tanto a produção de pioverdina quanto de PQS, moléculas naturalmente fluorescentes sintetizadas por *P. aeruginosa*. Enquanto a regulação de PQS acontece no nível transcricional, a de pioverdina acontece pós-transcricionalmente. A atuação de PA14_00800 em diferentes níveis de regulação pode indicar que ela ocorre indiretamente, pela interação com outras proteínas regulatórias, ou pela interação com RNA, num mecanismo similar ao descrito para o sistema Gac/Rsm, que

atua tanto no nível de transcrição quanto no pós-transcricional. A interação proteína-proteína foi explorada num projeto paralelo desenvolvido por Caio Rosa, aluno vinculado ao programa de Iniciação Científica em nosso grupo, por ensaio de duplo-híbrido em bactérias (BACTH, Bacterial Adenylate Cyclase-based Two Hybrid system) e interações fortes com proteínas regulatórias ainda não foram encontradas e, portanto, esta possibilidade não poder ser excluída. A interação proteína-RNA ainda não foi explorada, mas é um assunto interessante uma vez que PA14_00800 apresenta um motivo *zinc ribbon*, presente em proteínas que se ligam a nucleotídeos e ácidos nucleicos.

Além do mecanismo pelo qual PA14_00800 atua na regulação da fluorescência de colônias de *P. aeruginosa*, um dos desafios que permanece aberto é compreender como esta proteína altera a natureza dos compostos fluorescentes produzidos por células crescidas em meio sólido. Em colaboração com o Prof. Dr. Erick Bastos, do Instituto de Química da USP, o perfil de fluorescência de colônias de algumas linhagens de *P. aeruginosa* PA14 foi analisado, incluindo o da linhagem parental, mutantes de deleção de *prlC*, *PA14_00800* e controles negativos de fluorescência (mencionadas em **Resultados e Discussão**, subseção 4.4.2.2). Dados preliminares indicam a presença de três picos de emissão de luz em faixas de emissão similares às descritas para pioverdina na linhagem parental. Esses picos desaparecem no controle negativo *pvdA*, indicando que os três picos correspondem, provavelmente, a formas modificadas de pioverdina. Em linhagens de deleção de *PA14_00800*, o primeiro destes picos de emissão é deslocado para um comprimento de onda maior. A deleção de *prlC* tem o perfil de fluorescência similar ao de PA14, corroborando o fato desse gene não participar da modulação deste fenótipo em *P. aeruginosa* PA14. Estes dados são importantes para a compreensão do fenótipo de fluorescência de colônias de *swarming* observados no Typhoon e ainda estão sendo analisados. O desaparecimento da fluorescência na linhagem

Δ*PA14_00800* naquelas condições pode ser um artefato, uma vez que o deslocamento de um dos picos de fluorescência pode fazer com que o sinal seja obscurecido pelo filtro de emissão BPG1 e, assim, desaparecer. Hipóteses alternativas, tal como a interferência de diversos sinais de fluorescência com picos de emissão muito próximos, também são possíveis e, portanto, mais experimentos serão necessários para a compreensão do que realmente ocorre na deleção de *PA14_00800* em relação à fluorescência das colônias.

A locomoção do tipo *swarming* da linhagem Δ*PA14_00800* requer a presença de glicose e cloreto de cálcio, diferente da linhagem parental. Esse requerimento deve ocorrer pela supressão da desregulação de vias de sinalização que respondem a estes estímulos e/ou por questões energéticas. O envolvimento de PA14_00800 com o metabolismo de glicose é reforçado pelo seu efeito positivo na expressão de genes que codificam proteínas do metabolismo deste açúcar em *Pseudomonas*. Análise do transcritoma de Δ*PA14_00800* em meio CAA e meio CAA suplementado de cálcio e/ou glicose, comparado com a linhagem parental nas mesmas condições, é uma das alternativas para compreensão das alterações transcricionais que ocorrem em resposta a estes componentes.

A presença de PA14_00800 na célula também é importante para modulação de sistemas de secreção, tendo efeito num dos mecanismos centrais de virulência de *P. aeruginosa*. PA14_00800 regula negativamente, provavelmente de forma indireta, a transcrição dos genes envolvidos no T3SS, associado a virulência da bactéria em células eucarióticas. Resta saber se a linhagem Δ*PA14_00800*, em que os genes deste sistema de virulência são mais expressos, é mais virulenta que a linhagem parental em modelos de infecção *in vitro*. Para responder essa pergunta, uma colaboração com a Profa. Dra. Flávia Meotti, que trabalha com modelos de infecção de *P. aeruginosa* em neutrófilos e macrófagos humanos seria interessante, mas ainda não teve início. O desenvolvimento dessa questão tem

o potencial de relacionar um domínio ainda não caracterizado presente somente em bactérias com a virulência de um patógeno de relevância clínica, podendo servir de base teórica pra o desenvolvimento de novas drogas anti-infectivas.

A predição de estrutura terciária *in silico* por bioinformática não apresentou estruturas confiáveis para PA14_00800, uma vez que não há proteínas similares cuja estrutura foi resolvida, como mencionado na **Introdução** deste trabalho. No entanto, a informação estrutural é importante, já que PA14_00800 deve apresentar similaridade conformacional com proteínas já caracterizadas, o que auxiliaria a determinação da função desta proteína em *P. aeruginosa*. Sabendo disso, em colaboração com o laboratório do Prof. Dr. Roberto Salinas, o aluno Caio Rosa está trabalhando na obtenção da estrutura de PA14_00800, uma proteína pequena de apenas 91 aminoácidos, por ressonância magnética nuclear (NMR, em inglês). Após a obtenção da estrutura de PA14_00800, há pretensão de investigar a interação putativa entre PA14_00800 e PrlC, que teve indícios de ocorrer em ensaio BACTH. Ainda em colaboração com o Prof. Salinas, há esforços para a identificação do ligante de PA14_00800, que confere coloração rosada à solução da proteína recombinante purificada.

5. Conclusões

- Conforme as predições de bioinformática, os genes *prlC* e *PA14_00800* formam um operon e, portanto, a regulação no nível transcricional destes genes está sob a atuação dos mesmos reguladores.
- PrlC e PA14_00800 não modulam os primeiros estágios de formação de biofilme;
- A motilidade do tipo *swarming* da linhagem Δ*PA14_00800* em meio CAA é dependente da presença de glicose e cloreto de cálcio, num processo provavelmente dependente de alterações metabólicas ou sinalização celular;
- PA14_00800 altera a intensidade de fluorescência de colônias de *P. aeruginosa*, enquanto não exerce influência nesta característica em culturas planctônicas. O fenótipo provavelmente depende, portanto, do contato com uma superfície.
- A fluorescência das colônias é parcialmente dependente da produção de pioverdina e de PQS.
- PA14_00800 não tem influência sobre a transcrição dos genes envolvidos na produção de pioverdina, sugerindo um mecanismo pós-transcricional de regulação de sua produção em meio sólido.
- PA14_00800 atua positivamente na expressão de genes da via de biossíntese de PQS, tendo efeito direto na síntese desta molécula e do seu precursor HHQ.
- PA14_00800 atua de maneira inversa na expressão dos sistemas de virulência do tipo III e do tipo VI, provavelmente por atuar positivamente na expressão do pequeno RNA RsmZ.
- O mutante Δ*PA14_00800* apresenta diferenças na expressão de genes de catabolismo de glicose em relação à linhagem selvagem, o que pode indicar uma menor eficiência no uso desse carboidrato como fonte de carbono e energia.

6. Referências Bibliográficas

Almblad, H., Harrison, J.J., Rybtke, M., Groizeleau, J., Givskov, M., Parsek, M.R., and Tolker-Nielsen, T. (2015) The cyclic AMP-Vfr signaling pathway in *Pseudomonas aeruginosa* is inhibited by cyclic di-GMP. *J. Bacteriol.* **197**: 2190–2200.

Andersen, S.B., Marvig, R.L., Molin, S., Krogh Johansen, H., and Griffin, A.S. (2015) Long-term social dynamics drive loss of function in pathogenic bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**: 10756–10761.

Ankenbauer, R.G. (1992) Cloning of the outer membrane high-affinity Fe(III)-pyochelin receptor of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **174**: 4401–4409.

Apidianakis, Y. and Rahme, L.G. (2009) *Drosophila melanogaster* as a model host for studying *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Nat. Protoc.* **4**: 1285–1294.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. eds. (2001) Current Protocols in Molecular Biology John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.

Banin, E., Vasil, M.L., and Greenberg, E.P. (2005) Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**: 11076–11081.

Beatson, S.A., Whitchurch, C.B., Sargent, J.L., Levesque, R.C., and Mattick, J.S. (2002) Differential regulation of twitching motility and elastase production by Vfr in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **184**: 3605–3613.

Bodey, G.P., Bolivar, R., Fainstein, V., and Jadeja, L. (1983) Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Infect. Dis.* **5**: 279–313.

Bordi, C., Lamy, M., Ventre, I., Termine, E., Hachani, A., Fillet, S., et al. (2010) Regulatory RNAs and the HptB/RetS signalling pathways fine-tune *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Mol. Microbiol.* **76**: 1427–1443.

Brandel, J., Humbert, N., Elhabiri, M., Schalk, I.J., Mislin, G.L.A., and Albrecht-Gary, A.-M. (2012) Pyochelin, a siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*: Physicochemical characterization of the iron(iii), copper(ii) and zinc(ii) complexes. *Dalt. Trans.* **41**: 2820.

Brencic, A. and Lory, S. (2009) Determination of the regulon and identification of novel mRNA targets of *Pseudomonas aeruginosa* RsmA. *Mol. Microbiol.* **72**: 612–632.

Brencic, A., McFarland, K.A., McManus, H.R., Castang, S., Mogno, I., Dove, S.L., and Lory, S. (2009) The GacS/GacA signal transduction system of *Pseudomonas aeruginosa* acts exclusively through its control over the transcription of the RsmY and RsmZ regulatory small RNAs. *Mol. Microbiol.* **73**: 434–445.

Broder, U.N., Jaeger, T., and Jenal, U. (2016) LadS is a calcium-responsive kinase that induces acute-to-chronic virulence switch in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat. Microbiol.* **2**: 16184.

Burrowes, E., Baysse, C., Adams, C., and O'Gara, F. (2006) Influence of the regulatory protein RsmA on

cellular functions in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, as revealed by transcriptome analysis. *Microbiology* **152**: 405–418.

Burrows, L.L. (2012) *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: Type IV Pili in Action. *Annu. Rev. Microbiol.* **66**: 493–520.

Cartron, M.L., Maddocks, S., Gillingham, P., Craven, C.J., and Andrews, S.C. (2006) Feo – Transport of Ferrous Iron into Bacteria. *BioMetals* **19**: 143–157.

Castang, S., McManus, H.R., Turner, K.H., and Dove, S.L. (2008) H-NS family members function coordinately in an opportunistic pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 18947–18952.

Chambonnier, G., Roux, L., Redelberger, D., Fadel, F., Filloux, A., Sivaneson, M., et al. (2016) The hybrid histidine kinase LadS forms a multicomponent signal transduction system with the GacS/GacA two-component system in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS Genet.* **12**: e1006032.

Chen, W.P. and Kuo, T.T. (1993) A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* **21**: 2260.

Chen, Y., Yuan, M., Mohanty, A., Yam, J.K.H., Liu, Y., Chua, S.L., et al. (2015) Multiple diguanylate cyclase-coordinated regulation of pyoverdine synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol. Rep.* **7**: 498–507.

Chua, S.L., Tan, S.Y.-Y., Rybtke, M.T., Chen, Y., Rice, S.A., Kjelleberg, S., et al. (2013) Bis-(3'-5')-cyclic dimeric GMP regulates antimicrobial peptide resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**: 2066–2075.

Coggan, K.A. and Wolfgang, M.C. (2012) Global regulatory pathways and cross-talk control *Pseudomonas aeruginosa* environmental lifestyle and virulence phenotype. *Curr. Issues Mol. Biol.* **14**: 47–70.

Coleman, J.P., Hudson, L.L., McKnight, S.L., Farrow, J.M., Calfee, M.W., Lindsey, C.A., and Pesci, E.C. (2008) *Pseudomonas aeruginosa* PqsA is an anthranilate-coenzyme A ligase. *J. Bacteriol.* **190**: 1247–1255.

Collier, D.N., Hager, P.W., and Phibbs, P. V (1996) Catabolite repression control in the Pseudomonads. *Res. Microbiol.* **147**: 551–561.

Conway, T. (1992) The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. *FEMS Microbiol. Lett.* **103**: 1–28.

Cornelis, P. (2010) Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**: 1637–1645.

Cornelis, P., Anjaiah, V., Koedam, N., Delfosse, P., Jacques, P., Thonart, P., and Neirinckx, L. (1992) Stability, frequency and multiplicity of transposon insertions in the pyoverdine region in the chromosomes of different fluorescent pseudomonads. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 1337–1343.

Cornelis, P. and Bodilis, J. (2009) A survey of TonB-dependent receptors in fluorescent pseudomonads.

Environ. Microbiol. Rep. **1**: 256–262.

Cornelis, P. and Dingemans, J. (2013) *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **3**: 75.

Cornelis, P., Matthijs, S., and Van Oeffelen, L. (2009) Iron uptake regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *BioMetals* **22**: 15–22.

Costerton, J.W., Stewart, P.S., and Greenberg, E.P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**: 1318–1322.

Cramer, N., Klockgether, J., Wrasman, K., Schmidt, M., Davenport, C.F., and Tümmler, B. (2011) Microevolution of the major common *Pseudomonas aeruginosa* clones C and PA14 in cystic fibrosis lungs. *Environ. Microbiol.* **13**: 1690–1704.

Daddaoua, A., Corral-Lugo, A., Ramos, J.-L., and Krell, T. (2017) Identification of GntR as regulator of the glucose metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* **19**: 3721–3733.

Daddaoua, A., Krell, T., and Ramos, J.-L. (2009) Regulation of glucose metabolism in *Pseudomonas*: the phosphorylative branch and entner-doudoroff enzymes are regulated by a repressor containing a sugar isomerase domain. *J. Biol. Chem.* **284**: 21360–21368.

Dasgupta, N., Ashare, A., Hunninghake, G.W., and Yahr, T.L. (2006) Transcriptional induction of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system by low Ca2+ and host cell contact proceeds through two distinct signaling pathways. *Infect. Immun.* **74**: 3334–3341.

Dean, C.R. and Poole, K. (1993) Cloning and characterization of the ferric enterobactin receptor gene (*pfeA*) of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **175**: 317–324.

Demange, P., Wendenbaum, S., Linget, C., Mertz, C., Cung, M.T., Dell, A., and Abdallah, M.A. (1990) Bacterial siderophores : structure and NMR assignment of pyoverdins Pa, siderophores of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692. *Biol. Met.* **3**: 155–170.

Deutscher, J. (2008) The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**: 87–93.

Déziel, E., Gopalan, S., Tampakaki, A.P., Lépine, F., Padfield, K.E., Saucier, M., et al. (2005) The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting *lasRI*, *rhlRI* or the production of *N*-acyl- l-homoserine lactones. *Mol. Microbiol.* **55**: 998–1014.

Déziel, E., Lépine, F., Milot, S., He, J., Mindrinos, M.N., Tompkins, R.G., and Rahme, L.G. (2004) Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 1339–1344.

Déziel, E., Lépine, F., Milot, S., and Villemur, R. (2000) Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP. *Biochim. Biophys. Acta* **1485**: 145–152.

Déziel, E., Lépine, F., Milot, S., and Villemur, R. (2003) *rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology* **149**: 2005–2013.

Dominguez, D.C. (2004) Calcium signalling in bacteria. *Mol. Microbiol.* **54**: 291–297.

Dorrestein, P.C., Poole, K., and Begley, T.P. (2003) Formation of the chromophore of the pyoverdine siderophores by an oxidative cascade. *Org. Lett.* **5**: 2215–2217.

Drenkard, E. (2003) Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect.* **5**: 1213–1219.

Dumas, Z., Ross-Gillespie, A., and Kümmerli, R. (2013) Switching between apparently redundant iron-uptake mechanisms benefits bacteria in changeable environments. *Proceedings. Biol. Sci.* **280**: 20131055.

Edgar, R.J., Hampton, G.E., Garcia, G.P.C., Maher, M.J., Perugini, M.A., Ackerley, D.F., and Lamont, I.L. (2017) Integrated activities of two alternative sigma factors coordinate iron acquisition and uptake by *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **106**: 891–904.

Elias, S., Degtyar, E., and Banin, E. (2011) FvbA is required for vibriobactin utilization in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **157**: 2172–2180.

Elliott, R.P. (1958) Some properties of pyoverdine, the water-soluble fluorescent pigment of the pseudomonads. *Appl. Microbiol.* **6**: 241–246.

Farrow, J.M., Sund, Z.M., Ellison, M.L., Wade, D.S., Coleman, J.P., and Pesci, E.C. (2008) PqsE functions independently of PqsR-Pseudomonas quinolone signal and enhances the *rhl* quorum-sensing system. *J. Bacteriol.* **190**: 7043–7051.

Frangipani, E., Visaggio, D., Heeb, S., Kaever, V., Cámara, M., Visca, P., and Imperi, F. (2014) The Gac/Rsm and cyclic-di-GMP signalling networks coordinately regulate iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* **16**: 676–688.

Frank, D. (1997) The exoenzyme S regulon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **26**: 621–629.

Friedman, L. and Kolter, R. (2004a) Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Mol. Microbiol.* **51**: 675–690.

Friedman, L. and Kolter, R. (2004b) Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *J. Bacteriol.* **186**: 4457–4465.

Fuchs, E.L., Brutinel, E.D., Klem, E.R., Fehr, A.R., Yahr, T.L., and Wolfgang, M.C. (2010) *In vitro* and *in vivo* characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* cyclic AMP (cAMP) phosphodiesterase CpdA, required for cAMP homeostasis and virulence factor regulation. *J. Bacteriol.* **192**: 2779–2790.

Ganne, G., Brillet, K., Basta, B., Roche, B., Hoegy, F., Gasser, V., and Schalk, I.J. (2017) Iron release from

the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* involves three new actors: FpvC, FpvG, and FpvH. *ACS Chem. Biol.* **12**: 1056–1065.

Ghysels, B., Dieu, B.T.M., Beatson, S.A., Pirnay, J.-P., Ochsner, U.A., Vasil, M.L., and Cornelis, P. (2004) FpvB, an alternative type I ferripyoverdine receptor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **150**: 1671–1680.

Ghysels, B., Ochsner, U., MÃ¶llman, U., Heinisch, L., Vasil, M., Cornelis, P., and Matthijs, S. (2005) The *Pseudomonas aeruginosa pirA* gene encodes a second receptor for ferrienterobactin and synthetic catecholate analogues. *FEMS Microbiol. Lett.* **246**: 167–174.

Gode-Potratz, C.J., Chodur, D.M., and McCarter, L.L. (2010) Calcium and iron regulate swarming and type III secretion in *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* **192**: 6025–6038.

Guerinot, M.L. (1994) Microbial iron transport. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**: 743–772.

Guragain, M., King, M.M., Williamson, K.S., Pérez-Osorio, A.C., Akiyama, T., Khanam, S., et al. (2016) The *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 two-component regulator CarSR regulates calcium homeostasis and calcium-induced virulence factor production through its regulatory targets CarO and CarP. *J. Bacteriol.* **198**: 951–963.

Guragain, M., Lenaburg, D.L., Moore, F.S., Reutlinger, I., and Patrauchan, M.A. (2013) Calcium homeostasis in *Pseudomonas aeruginosa* requires multiple transporters and modulates swarming motility. *Cell Calcium* **54**: 350–361.

Güvener, Z.T. and Harwood, C.S. (2007) Subcellular location characteristics of the *Pseudomonas aeruginosa* GGDEF protein, WspR, indicate that it produces cyclic-di-GMP in response to growth on surfaces. *Mol. Microbiol.* **66**: 1459–1473.

Haas, B., Kraut, J., Marks, J., Zanker, S.C., and Castignetti, D. (1991) Siderophore presence in sputa of cystic fibrosis patients. *Infect. Immun.* **59**: 3997–4000.

Hager, P.W., Calfee, M.W., and Phibbs, P. V (2000) The *Pseudomonas aeruginosa devB*/SOL homolog, *pgl*, is a member of the *hex* regulon and encodes 6-phosphogluconolactonase. *J. Bacteriol.* **182**: 3934–3941.

Hannauer, M., Yeterian, E., Martin, L.W., Lamont, I.L., and Schalk, I.J. (2010) An efflux pump is involved in secretion of newly synthesized siderophore by *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett.* **584**: 4751–4755.

Hauser, A.R. (2009) The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**: 654–665.

He, J., Baldini, R.L., Déziel, E., Saucier, M., Zhang, Q., Liberati, N.T., et al. (2004) The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 2530–2535.

Heiniger, R.W., Winther-Larsen, H.C., Pickles, R.J., Koomey, M., and Wolfgang, M.C. (2010) Infection of

human mucosal tissue by *Pseudomonas aeruginosa* requires sequential and mutually dependent virulence factors and a novel pilus-associated adhesin. *Cell. Microbiol.* **12**: 1158–1173.

Heinrichs, D.E., Young, L., and Poole, K. (1991) Pyochelin-mediated iron transport in *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of a high-molecular-mass outer membrane protein. *Infect. Immun.* **59**: 3680–3684.

Henrichsen, J. (1972) Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol. Rev.* **36**: 478–503.

Heurlier, K., Williams, F., Heeb, S., Dormond, C., Pessi, G., Singer, D., et al. (2004) Positive control of swarming, rhamnolipid synthesis, and lipase production by the posttranscriptional RsmA/RsmZ system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* **186**: 2936–2945.

Hmelo, L.R., Borlee, B.R., Almblad, H., Love, M.E., Randall, T.E., Tseng, B.S., et al. (2015) Precision-engineering the *Pseudomonas aeruginosa* genome with two-step allelic exchange. *Nat. Protoc.* **10**: 1820–1841.

Hoang, T.T., Karkhoff-Schweizer, R.R., Kutchma, A.J., and Schweizer, H.P. (1998) A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* **212**: 77–86.

Hoang, T.T., Kutchma, A.J., Becher, A., and Schweizer, H.P. (2000) Integration-proficient plasmids for *Pseudomonas aeruginosa*: site-specific integration and use for engineering of reporter and expression strains. *Plasmid* **43**: 59–72.

Imperi, F., Tiburzi, F., and Visca, P. (2009) Molecular basis of pyoverdine siderophore recycling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 20440–20445.

Jain, R. and Chan, M.K. (2007) Support for a potential role of *E. coli* oligopeptidase A in protein degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **359**: 486–490.

Jean-Pierre, F., Tremblay, J., and Déziel, E. (2017) Broth versus surface-grown cells: differential regulation of RsmY/Z small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* by the Gac/HptB system. *Front. Microbiol.* **7**: 2168.

Jeong, J.-Y., Yim, H.-S., Ryu, J.-Y., Lee, H.S., Lee, J.-H., Seen, D.-S., and Kang, S.G. (2012) One-step sequence- and ligation-independent cloning as a rapid and versatile cloning method for functional genomics studies. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 5440–5443.

Jimenez, P., Koch, G., Thompson, J.A., Xavier, K.B., Cool, R.H., and Quax, W.J. (2012) The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **76**: 46–65.

Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y., and Morishima, K. (2017) KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res.* **45**: D353–D361.

Kang, D., Turner, K., Kirienko, N., Kang, D., Turner, K.E., and Kirienko, N. V. (2017) PqsA promotes pyoverdine production via biofilm formation. *Pathogens* **7**: 3.

Kearns, D.B. (2010) A field guide to bacterial swarming motility. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**: 634–644.

Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., and Sternberg, M.J.E. (2015) The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat. Protoc.* **10**: 845–858.

Koedam, N., Wittouck, E., Gaballa, A., Gillis, A., Höfte, M., and Cornelis, P. (1994) Detection and differentiation of microbial siderophores by isoelectric focusing and chrome azurol S overlay. *Biometals* **7**: 287–291.

Köhler, T., Curty, L.K., Barja, F., van Delden, C., and Pechère, J.C. (2000) Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J. Bacteriol.* **182**: 5990–5996.

Kuchma, S.L., Ballok, A.E., Merritt, J.H., Hammond, J.H., Lu, W., Rabinowitz, J.D., and O'Toole, G.A. (2010) Cyclic-di-GMP-mediated repression of swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa*: the *pilY1* gene and its impact on surface-associated behaviors. *J. Bacteriol.* **192**: 2950–2964.

Lai, S., Tremblay, J., and Déziel, E. (2009) Swarming motility: a multicellular behaviour conferring antimicrobial resistance. *Environ. Microbiol.* **11**: 126–136.

Lamont, I.L., Beare, P.A., Ochsner, U., Vasil, A.I., and Vasil, M.L. (2002) Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 7072–7077.

Lee, D.G., Urbach, J.M., Wu, G., Liberati, N.T., Feinbaum, R.L., Miyata, S., et al. (2006) Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biol.* **7**: R90.

Lee, J. and Zhang, L. (2015) The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell* **6**: 26–41.

Lee, M.J.Y., Schep, D., McLaughlin, B., Kaufmann, M., and Jia, Z. (2014) Structural analysis and identification of PhuS as a heme-degrading enzyme from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Mol. Biol.* **426**: 1936–1946.

Lee, M.J.Y., Wang, Y., Jiang, Y., Li, X., Ma, J., Tan, H., et al. (2017) Function coupling mechanism of PhuS and HemO in heme degradation. *Sci. Rep.* **7**: 11273.

Lépine, F. and Déziel, E. (2011) Liquid chromatography/mass spectrometry for the detection and quantification of *N*-acyl-L-homoserine lactones and 4-hydroxy-2-alkylquinolines. *Methods Mol. Biol.* **692**: 61–69.

Lépine, F., Déziel, E., Milot, S., and Villemur, R. (2002) Liquid chromatographic/mass spectrometric detection of the 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanoic acid precursors of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa* cultures. *J. Mass Spectrom.* **37**: 41–46.

Lesic, B., Lépine, F., Déziel, E., Zhang, J., Zhang, Q., Padfield, K., et al. (2007) Inhibitors of pathogen

intercellular signals as selective anti-infective compounds. *PLoS Pathog.* **3**: e126.

Letunic, I. and Bork, P. (2018) 20 years of the SMART protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res.* **46**: D493–D496.

Liberati, N.T., Urbach, J.M., Miyata, S., Lee, D.G., Drenkard, E., Wu, G., et al. (2006) An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 2833–2838.

Linares, J.F., Moreno, R., Fajardo, A., Martínez-Solano, L., Escalante, R., Rojo, F., and Martínez, J.L. (2010) The global regulator Crc modulates metabolism, susceptibility to antibiotics and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* **12**: 3196–3212.

Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the -2DDCt method. *Methods* **25**: 402–408.

Loubens, I., Peng, W.-T., Storey, D.G., and Hunt, T.A. (2002) The *Pseudomonas aeruginosa* alternative sigma factor PvdS controls exotoxin A expression and is expressed in lung infections associated with cystic fibrosis. *Microbiology* **148**: 3183–3193.

Luo, Y., Zhao, K., Baker, A.E., Kuchma, S.L., Coggan, K.A., Wolfgang, M.C., et al. (2015) A hierarchical cascade of second messengers regulates *Pseudomonas aeruginosa* surface behaviors. *MBio* **6**: e02456-14.

Lyczak, J.B., Cannon, C.L., and Pier, G.B. (2000) Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect.* **2**: 1051–1060.

Magoc, T., Wood, D., and Salzberg, S. (2013) EDGE-pro: Estimated Degree of Gene Expression in Prokaryotic Genomes. *Evol. Bioinforma.* **9**: 127–136.

Mao, F., Dam, P., Chou, J., Olman, V., and Xu, Y. (2009) DOOR: a database for prokaryotic operons. *Nucleic Acids Res.* **37**: D459–D463.

Marsden, A.E., Intile, P.J., Schulmeyer, K.H., Simmons-Patterson, E.R., Urbanowski, M.L., Wolfgang, M.C., and Yahr, T.L. (2016) Vfr directly activates *exsA* transcription to regulate expression of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *J. Bacteriol.* **198**: 1442–1450.

Meyer, J.-M., Stintzi, A., De Vos, D., Cornelis, P., Tappe, R., Taraz, K., and Budzikiewicz, H. (1997) Use of siderophores to type Pseudomonads: the three *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine systems. *Microbiology* **143**: 35–43.

Meyer, J.M. and Abdallah, M.A. (1978) The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *J. Gen. Microbiol.* **107**: 319–328.

Meyer, J.M., Neely, A., Stintzi, A., Georges, C., and Holder, I.A. (1996) Pyoverdin is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **64**: 518–23.

Mikkelsen, H., McMullan, R., and Filloux, A. (2011) The *Pseudomonas aeruginosa* reference strain PA14 displays increased virulence due to a mutation in *ladS*. *PLoS One* **6**: e29113.

Miller, J.H. (1972) Experiments in molecular genetics Cold Spring Harbor Laboratory.

Minandri, F., Imperi, F., Frangipani, E., Bonchi, C., Visaggio, D., Facchini, M., et al. (2016) Role of iron uptake systems in *Pseudomonas aeruginosa* virulence and airway infection. *Infect. Immun.* **84**: 2324–2335.

Morris, E.R., Hall, G., Li, C., Heeb, S., Kulkarni, R. V., Lovelock, L., et al. (2013) Structural rearrangement in an RsmA/CsrA ortholog of *Pseudomonas aeruginosa* creates a dimeric RNA-binding protein, RsmN. *Structure* **21**: 1659–1671.

Moscoso, J., Mikkelsen, H., Heeb, S., Williams, P., and Filloux, A. (2011) The *Pseudomonas aeruginosa* sensor RetS switches type III and type VI secretion via c-di-GMP signalling. *Environ. Microbiol.* **13**: 3128–3138.

Mulcahy, H., O'Callaghan, J., O'Grady, E., Maciá, M., Borrell, N., Gómez, C., et al. (2008) *Pseudomonas aeruginosa* RsmA plays an important role during murine infection by influencing colonization, virulence, persistence, and pulmonary inflammation. *Infect. Immun.* **76**: 632–638.

Nicastro, G.G., Kaihami, G.H., Pereira, T.O., Meireles, D.A., Groleau, M.-C., Déziel, E., and Baldini, R.L. (2014) Cyclic-di-GMP levels affect *Pseudomonas aeruginosa* fitness in the presence of imipenem. *Environ. Microbiol.* **16**: 1321–1333.

Novak, P. and Dev, I.K. (1988) Degradation of a signal peptide by protease IV and oligopeptidase A. *J. Bacteriol.* **170**: 5067–5075.

O'Connor, J.R., Kuwada, N.J., Huangyutitham, V., Wiggins, P.A., and Harwood, C.S. (2012) Surface sensing and lateral subcellular localization of WspA, the receptor in a chemosensory-like system leading to c-di-GMP production. *Mol. Microbiol.* **86**: 720–729.

O'Toole, G.A. and Wong, G.C. (2016) Sensational biofilms: surface sensing in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **30**: 139–146.

Ochsner, U. a, Snyder, A., Vasil, A.I., and Vasil, M.L. (2002) Effects of the twin-arginine translocase on secretion of virulence factors, stress response, and pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 8312–8317.

Ochsner, U.A., Johnson, Z., and Vasil, M.L. (2000) Genetics and regulation of two distinct haem-uptake systems, *phu* and *has*, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **146**: 185–198.

Ochsner, U.A., Snyder, A., Vasil, A.I., and Vasil, M.L. (2002) Effects of the twin-arginine translocase on secretion of virulence factors, stress response, and pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**: 8312–8317.

Ochsner, U.A., Wilderman, P.J., Vasil, A.I., and Vasil, M.L. (2002) GeneChip® expression analysis of the iron starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*: identification of novel pyoverdine biosynthesis genes. *Mol. Microbiol.* **45**: 1277–1287.

Overhage, J., Bains, M., Brazas, M.D., and Hancock, R.E.W. (2008) Swarming of *Pseudomonas*

aeruginosa is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance. *J. Bacteriol.* **190**: 2671–2679.

Palmer, G.C., Schertzer, J.W., Mashburn-Warren, L., and Whiteley, M. (2011) Quantifying *Pseudomonas aeruginosa* quinolones and examining their interactions with lipids. *Methods Mol. Biol.* **692**: 207–217.

Parkins, M., Ceri, H., and Storey, D. (2001) *Pseudomonas aeruginosa* GacA, a factor in multihost virulence, is also essential for biofilm formation. *Mol. Microbiol.* **40**: 1215–1226.

Partridge, J.D. and Harshey, R.M. (2013) Swarming: flexible roaming plans. *J. Bacteriol.* **195**: 909–918.

Patrauchan, M.A., Sarkisova, S.A., and Franklin, M.J. (2007) Strain-specific proteome responses of *Pseudomonas aeruginosa* to biofilm-associated growth and to calcium. *Microbiology* **153**: 3838–3851.

Persat, A., Inclan, Y.F., Engel, J.N., Stone, H.A., and Gitai, Z. (2015) Type IV pili mechanochemically regulate virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**: 7563–7568.

Pesci, E.C., Pearson, J.P., Seed, P.C., and Iglewski, B.H. (1997) Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **179**: 3127–3132.

Pessi, G., Williams, F., Hindle, Z., Heurlier, K., Holden, M., Cámara, M., et al. (2001) The global posttranscriptional regulator RsmA modulates production of virulence determinants and *N*-acylhomoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **183**: 6676–6683.

Potvin, E., Lehoux, D.E., Kukavica-Ibrulj, I., Richard, K.L., Sanschagrin, F., Lau, G.W., and Levesque, R.C. (2003) *In vivo* functional genomics of *Pseudomonas aeruginosa* for high-throughput screening of new virulence factors and antibacterial targets. *Environ. Microbiol.* **5**: 1294–1308.

Rahme, L.G., Ausubel, F.M., Cao, H., Drenkard, E., Goumnerov, B.C., Lau, G.W., et al. (2000) Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 8815–8821.

Rahme, L.G., Stevens, E.J., Wolfort, S.F., Shao, J., Tompkins, R.G., and Ausubel, F.M. (1995) Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* **268**: 1899–1902.

Rahme, L.G., Tan, M.W., Le, L., Wong, S.M., Tompkins, R.G., Calderwood, S.B., and Ausubel, F.M. (1997) Use of model plant hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**: 13245–50.

Ratledge, C. and Dover, L.G. (2000) Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 881–941.

Rawlings, N.D., Barrett, A.J., Thomas, P.D., Huang, X., Bateman, A., and Finn, R.D. (2018) The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res.* **46**: D624–D632.

Raymond, K.N. and Carrano, C.J. (1979) Coordination chemistry and microbial iron transport. *Acc. Chem. Res.* **12**: 183–190.

Reis, R.S., Pereira, A.G., Neves, B.C., and Freire, D.M.G. (2011) Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa* – A review. *Bioresour. Technol.* **102**: 6377–6384.

Robinson, M., McCarthy, D., and Smyth, G. (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**: 139–140.

Sage, A.E., Proctor, W.D., and Phibbs, P. V (1996) A two-component response regulator, *gltR*, is required for glucose transport activity in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* **178**: 6064–6066.

Sakai, M., Futamata, H., and Kanazawa, S. (2003) Effects of high concentrations of inorganic salts on swarming ability in fluorescent *Pseudomonas* strains. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**: 1479–1484.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. *Mol. cloning a Lab. manual.*

Sarkisova, S., Patrauchan, M.A., Berglund, D., Nivens, D.E., and Franklin, M.J. (2005) Calcium-induced virulence factors associated with the extracellular matrix of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J. Bacteriol.* **187**: 4327–4337.

Schalk, I.J. and Guillon, L. (2013) Pyoverdine biosynthesis and secretion in *Pseudomonas aeruginosa* : implications for metal homeostasis. *Environ. Microbiol.* **15**: 1661–1673.

Schalk, I.J., Hennard, C., Dugave, C., Poole, K., Abdallah, M.A., and Pattus, F. (2001) Iron-free pyoverdin binds to its outer membrane receptor FpvA in *Pseudomonas aeruginosa*: a new mechanism for membrane iron transport. *Mol. Microbiol.* **39**: 351–360.

Schertzer, J.W., Brown, S.A., and Whiteley, M. (2010) Oxygen levels rapidly modulate *Pseudomonas aeruginosa* social behaviours via substrate limitation of PqsH. *Mol. Microbiol.* **77**: 1527–1538.

Schroth, M.N., Cho, J.J., Green, S.K., Kominos, S.D., and Publishing, M.S. (2018) Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in agricultural areas. *J. Med. Microbiol.* **67**: 1191–1201.

Simon, R., Priefer, U., and Pühler, A. (1983) A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology* **1**: 784–791.

Siryaporn, A., Kuchma, S.L., O'Toole, G.A., and Gitai, Z. (2014) Surface attachment induces *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**: 16860–16865.

Smith, E.E., Sims, E.H., Spencer, D.H., Kaul, R., and Olson, M. V (2005) Evidence for diversifying selection at the pyoverdine locus of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **187**: 2138–2147.

Snouwaert, J.N., Brigman, K.K., Latour, A.M., Malouf, N.N., Boucher, R.C., Smithies, O., and Koller, B.H. (1992) An animal model for cystic fibrosis made by gene targeting. *Science* **257**: 1083–1088.

Sonnleitner, E., Abdou, L., and Haas, D. (2009) Small RNA as global regulator of carbon catabolite repression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 21866–21871.

De Soyza, A., Hall, A.J., Mahenthiralingam, E., Drevinek, P., Kaca, W., Drulis-Kawa, Z., et al. (2013) Developing an international *Pseudomonas aeruginosa* reference panel. *Microbiologyopen* **2**: 1010–1023.

Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrener, P., Hickey, M.J., et al. (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**: 959–964.

Szklarczyk, D., Franceschini, A., Wyder, S., Forslund, K., Heller, D., Huerta-Cepas, J., et al. (2015) STRING v10: protein–protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res.* **43**: D447–D452.

Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D.L., et al. (2018) Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.* **18**: 318–327.

Takase, H., Nitanai, H., Hoshino, K., and Otani, T. (2000) Impact of siderophore production on *Pseudomonas aeruginosa* infections in immunosuppressed mice. *Infect. Immun.* **68**: 1834–9.

Tan, M.W., Mahajan-Miklos, S., and Ausubel, F.M. (1999) Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 715–20.

Temple, L., Sage, A., Schweizer, H., and Phipps, P. (1998) Carbohydrate catabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. In, Montie,T. (ed), *Pseudomonas (Biotechnology Handbooks)*. Springer, pp. 35–72.

Tremblay, J. and Déziel, E. (2010) Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility. *BMC Genomics* **11**: 587.

Tremblay, J., Richardson, A.-P., Lépine, F., and Déziel, E. (2007) Self-produced extracellular stimuli modulate the *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility behaviour. *Environ. Microbiol.* **9**: 2622–2630.

Ueda, A. and Wood, T.K. (2009) Connecting quorum sensing, c-di-GMP, Pel polysaccharide, and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* through tyrosine phosphatase TpbA (PA3885). *PLoS Pathog.* **5**: e1000483.

Valverde, C., Heeb, S., Keel, C., and Haas, D. (2003) RsmY, a small regulatory RNA, is required in concert with RsmZ for GacA-dependent expression of biocontrol traits in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol. Microbiol.* **50**: 1361–1379.

Vasil, M.L. and Ochsner, U.A. (1999) The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics, biochemistry and virulence. *Mol. Microbiol.* **34**: 399–413.

Vimr, E.R., Green, L., and Miller, C.G. (1983) Oligopeptidase-deficient mutants of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **153**: 1259–1265.

Visaggio, D., Pasqua, M., Bonchi, C., Kaever, V., Visca, P., and Imperi, F. (2015) Cell aggregation

promotes pyoverdine-dependent iron uptake and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* **6**: 902.

Visca, P. (2004) Iron regulation and siderophore signalling in virulence by *Pseudomonas aeruginosa*. In, *Pseudomonas*. Springer US, Boston, MA, pp. 69–123.

Visca, P., Ciervo, A., and Orsi, N. (1994) Cloning and nucleotide sequence of the *pvdA* gene encoding the pyoverdin biosynthetic enzyme L-ornithine N5-oxygenase in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **176**: 1128–1140.

Visca, P., Imperi, F., and Lamont, I.L. (2007) Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends Microbiol.* **15**: 22–30.

Wang, C., Ye, F., Kumar, V., Gao, Y.-G., and Zhang, L.-H. (2014) BswR controls bacterial motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* through modulation of the small RNA *rsmZ*. *Nucleic Acids Res.* **42**: 4563–4576.

Wang, Y., Wilks, J.C., Danhorn, T., Ramos, I., Croal, L., and Newman, D.K. (2011) Phenazine-1-Carboxylic acid promotes bacterial biofilm development via ferrous iron acquisition. *J. Bacteriol.* **193**: 3606–3617.

West, S.E., Sample, A.K., and Runyen-Janecky, L.J. (1994) The *vfr* gene product, required for *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and protease production, belongs to the cyclic AMP receptor protein family. *J. Bacteriol.* **176**: 7532–7542.

Wiehlmann, L., Munder, A., Adams, T., Juhas, M., Kolmar, H., Salunkhe, P., and Tümmler, B. (2007) Functional genomics of *Pseudomonas aeruginosa* to identify habitat-specific determinants of pathogenicity. *Int. J. Med. Microbiol.* **297**: 615–623.

Winsor, G.G.L., Griffiths, E.E.J., Lo, R., Dhillon, B.K.B., Shay, J.J.A., and Brinkman, F.F.S.L. (2016) Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database. *Nucleic Acids Res.* **44**: D646-653.

Winsor, G.L., Lo, R., Ho Sui, S.J., Ung, K.S.E., Huang, S., Cheng, D., et al. (2005) *Pseudomonas aeruginosa* Genome Database and PseudoCAP: facilitating community-based, continually updated, genome annotation. *Nucleic Acids Res.* **33**: 338–343.

Wolfgang, M.C., Lee, V.T., Gilmore, M.E., and Lory, S. (2003) Coordinate regulation of bacterial virulence genes by a novel adenylate cyclase-dependent signaling pathway. *Dev. Cell* **4**: 253–263.

Xiao, G., Déziel, E., He, J., Lépine, F., Lesic, B., Castonguay, M.-H., et al. (2006) MvfR, a key *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity LTTR-class regulatory protein, has dual ligands. *Mol. Microbiol.* **62**: 1689–1699.

Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., and Zhang, Y. (2015) The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat. Methods* **12**: 7–8.

Yeterian, E., Martin, L.W., Guillon, L., Journet, L., Lamont, I.L., and Schalk, I.J. (2010) Synthesis of the

siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* involves a periplasmic maturation. *Amino Acids* **38**: 1447–1459.

Yeung, A.T.Y., Bains, M., and Hancock, R.E.W. (2011) The sensor kinase CbrA is a global regulator that modulates metabolism, virulence, and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **193**: 918–931.

Yeung, A.T.Y., Torfs, E.C.W., Jamshidi, F., Bains, M., Wiegand, I., Hancock, R.E.W., and Overhage, J. (2009) Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is controlled by a broad spectrum of transcriptional regulators, including MetR. *J. Bacteriol.* **191**: 5592–5602.

Yoon, S.S., Hennigan, R.F., Hilliard, G.M., Ochsner, U.A., Parvatiyar, K., Kamani, M.C., et al. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis. *Dev. Cell* **3**: 593–603.

Apêndice

Tabela A1. Genes reprimidos na linhagem Δ*PA14_00800* em comparação com a linhagem selvagem (PA14), segundo análise de RNAseq.

PA14 locus	PAO1 locus	Gene	Razão	FDR	Descrição
PA14_00800	*PA0068*	*PA14_00800*	0,04	2,67E-65	Probable metal-binding protein (DUF2387)
PA14_37210	*PA2116*	*PA14_37210*	0,20	4,45E-18	Uncharacterised protein 105amily UPF0317
PA14_37250	*PA2114*	*PA14_37250*	0,21	5,33E-18	Major facilitator transporter (sugar transport proteins signature2)
PA14_23070	*PA3183*	*zwf*	0,21	2,09E-25	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase
PA14_23080	*PA3182*	*pgl*	0,25	1,06E-20	6-phosphogluconolactonase
PA14_22980	*PA3190*	*PA14_22980*	0,25	3,78E-11	Sugar ABC transporter substrate-binding protein
PA14_31150		*PA14_31150*	0,29	5,37E-19	Hypothetical protein
PA14_31290	*PA2570*	*pa1L*	0,30	1,55E-15	PA-I galactophilic lectin
PA14_17710	*PA3600*	*rpmJ*	0,31	1,84E-07	50S ribosomal protein L36
PA14_68440	*PA5181*	*PA14_68440*	0,31	3,19E-14	Oxidoreductase
PA14_22890	*PA3195*	*gapA*	0,32	1,55E-15	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
PA14_18140	*PA3569*	*mmsB*	0,34	8,16E-08	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase
PA14_22350	*PA3234*	*actP*	0,34	2,14E-09	Acetate permease
PA14_22910	*PA3194*	*edd*	0,34	3,12E-13	Phosphogluconate dehydratase
PA14_67350	*PA5100*	*hutU*	0,34	1,89E-08	Urocanate hydratase
PA14_62390	*PA4714*	*PA14_62390*	0,35	2,82E-13	Hypothetical protein
PA14_22940	*PA3192*	*gltR*	0,35	9,67E-10	Two-component response regulator GltR
PA14_17700	*PA3601*	*rpmE2*	0,35	0,00014478	50S ribosomal protein L31
PA14_32250	*PA2506*	*PA14_32250*	0,36	0,001625737	Hypothetical protein
PA14_23090	*PA3181*	*PA14_23090*	0,36	8,15E-13	Keto-hydroxyglutarate-aldolase/keto-deoxy- phosphogluconate aldolase

Tabela A1. Genes reprimidos na linhagem Δ*PA14_00800* em comparação com a linhagem selvagem (PA14), segundo análise de RNAseq.

PA14 locus	PAO1 locus	Gene	Razão	FDR	Descrição
PA14_10360	*PA4141*	*PA14_10360*	0,37	1,07E-12	Hypothetical protein
PA14_55750	*PA4290*	*PA14_55750*	0,38	0,002133042	Chemotaxis transducer
PA14_53250	*PA0852*	*cpbD*	0,38	2,09E-06	Chitin-binding protein CbpD
PA14_68900	*PA5217*	*PA14_68900*	0,39	6,70E-12	Iron ABC transporter substrate-binding protein
PA14_53940	*PA0796*	*prpB*	0,39	0,000217323	2-methylisocitrate lyase
PA14_22880		*PA14_22880*	0,39	4,80E-10	Fe-S protein
PA14_34870	*PA2300*	*chiC*	0,39	1,04E-07	Chitinase
PA14_33870	*PA2381*	*PA14_33870*	0,39	0,000343575	Hypothetical protein
PA14_55940	*PA4306*	*PA14_55940*	0,39	0,001237965	Hypothetical protein (Flp/Fap pilin component)
PA14_13130	*PA3923*	*PA14_13130*	0,39	4,59E-09	Hypothetical protein
PA14_52800	*PA0887*	*acsA*	0,40	1,01E-05	Acetyl-CoA synthetase
PA14_32985	*PA2446*	*gcvH2*	0,40	0,000169135	glycine cleavage system protein H
PA14_53920	*PA0797*	*PA14_53920*	0,40	0,000267196	transcriptional regulator
PA14_22340	*PA3235*	*PA14_22340*	0,41	0,022058681	Hypothetical protein
PA14_18120	*PA3570*	*mmsA*	0,41	1,17E-06	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase
PA14_07990	*PA0614*	*PA14_07990*	0,41	0,004978827	Hypothetical protein
PA14_26020	*PA2939*	*PA14_26020*	0,41	1,73E-06	Aminopeptidase (peptidase M28)
PA14_31510	*PA2554*	*PA14_31510*	0,41	0,002235472	Short-chain dehydrogenase
PA14_08280	*PA0640*	*PA14_08280*	0,42	0,000199409	Bacteriophage protein
PA14_40290	*PA1871*	*lasA*	0,42	0,000167388	LasA protease
PA14_08180	*PA0630*	*PA14_08180*	0,42	0,00762561	Hypothetical protein
PA14_16250	*PA3724*	*lasB*	0,42	3,69E-05	Elastase LasB

Tabela A1. Genes reprimidos na linhagem Δ*PA14_00800* em comparação com a linhagem selvagem (PA14), segundo análise de RNAseq.

PA14 locus	PAO1 locus	Gene	Razão	FDR	Descrição
PA14_63940	*PA4836*	*PA14_63940*	0,42	0,000132703	Hypothetical protein
PA14_08260	*PA0638*	*PA14_08260*	0,42	0,001848426	Minor tail protein L
PA14_68430	*PA5180*	*PA14_68430*	0,43	1,58E-09	Formate dehydrogenase accessory protein FdhD
PA14_53950	*PA0795*	*prpC*	0,43	8,49E-05	Methylcitrate synthase
PA14_14060	*PA3860*	*PA14_14060*	0,43	8,80E-07	AMP-binding protein
PA14_31530	*PA2553*	*PA14_31530*	0,43	9,68E-06	Acyl-CoA thiolase
PA14_60960	*PA4607*	*PA14_60960*	0,44	0,002432718	Hypothetical protein
PA14_08100	*PA0624*	*PA14_08100*	0,44	0,028346544	Hypothetical protein (bacteriophage tail protein Gp41, putative)
PA14_31540	*PA2552*	*PA14_31540*	0,45	1,16E-06	Acyl-CoA dehydrogenase
PA14_09540	*PA4205*	*mexG*	0,45	0,04743934	Hypothetical protein
PA14_34880	*PA2299*	*PA14_34880*	0,45	1,79E-06	GntR 107amily transcriptional regulator
PA14_33000	*PA2445*	*gcvP2*	0,46	2,32E-05	Glycine dehydrogenase
PA14_09900	*PA4175*	*prpL*	0,46	6,59E-07	Pvds-regulated endoprotease, lysyl class
PA14_05840	*PA0447*	*gcdH*	0,46	7,05E-05	Glutaryl-CoA dehydrogenase
PA14_11320	*PA4063*	*PA14_11320*	0,46	0,002747207	Hypothetical protein
PA14_54540	*PA0754*	*PA14_54540*	0,46	0,000351045	Hypothetical protein (tripartite tricarboxylate transporter 107amily receptor)
PA14_65740	*PA4973*	*thiC*	0,46	0,000473115	Thiamine biosynthesis protein ThiC
PA14_63960	*PA4837*	*PA14_63960*	0,46	0,003029463	Outer membrane protein
PA14_33860	*PA2382*	*lldA*	0,46	0,000484425	L-lactate dehydrogenase
PA14_47010	*PA1333*	*PA14_47010*	0,46	7,16E-05	Hypothetical protein
PA14_08230	*PA0635*	*PA14_08230*	0,46	0,014230011	Hypothetical protein
PA14_40280	*PA1872*	*PA14_40280*	0,47	7,19E-05	Hypothetical protein (EcsC protein family)

Tabela A1. Genes reprimidos na linhagem Δ*PA14_00800* em comparação com a linhagem selvagem (PA14), segundo análise de RNAseq.

PA14 locus	PAO1 locus	Gene	Razão	FDR	Descrição
PA14_38530	*PA2008*	*fahA*	0,47	0,026143668	Fumarylacetoacetase
PA14_30050	*PA2634*	*PA14_30050*	0,47	0,000194143	Isocitrate lyase
PA14_09520	*PA4207*	*mexI*	0,48	0,000776734	RND efflux transporter
PA14_71100	*PA5383*	*PA14_71100*	0,48	0,001215836	Hypothetical protein
PA14_13140	*PA3922*	*PA14_13140*	0,48	1,88E-06	Hypothetical protein
PA14_18150	*PA3568*	*PA14_18150*	0,48	3,13E-05	Acetyl-coa synthetase
PA14_22960	*PA3191*	*PA14_22960*	0,48	4,49E-06	Two-component sensor GtrS
PA14_35520	*PA2248*	*bkdA2*	0,48	0,004981088	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta
PA14_37200	*PA2117*	*PA14_37200*	0,49	9,69E-05	Hypothetical protein
PA14_73280	*PA5557*	*atpH*	0,49	0,000296908	F0F1 ATP synthase subunit delta
PA14_38190	*PA2036*	*PA14_38190*	0,49	0,0471021	Hypothetical protein
PA14_22930	*PA3193*	*glk*	0,49	5,23E-06	Glucokinase
PA14_39780	*PA1914*	*PA14_39780*	0,49	4,98E-05	Hypothetical protein
PA14_08160	*PA0629*	*PA14_08160*	0,49	0,010564635	Lytic enzyme
PA14_22380	*PA3232*	*PA14_22380*	0,49	0,000202389	DNA polymerase III subunit epsilon
PA14_10350	*PA4142*	*PA14_10350*	0,50	6,34E-05	Secretion protein
PA14_51420	*PA0997*	*pqsB*	0,50	0,001215836	PqsB
PA14_38550	*PA2007*	*maiA*	0,50	0,009070937	Maleylacetoacetate isomerase
PA14_54870		*PA14_54870*	0,50	0,000115362	Hypothetical protein
PA14_27630		*PA14_27630*	0,50	0,002011021	Protein associated with synthesis and assembly of refractile inclusion bodies
PA14_35490	*PA2250*	*lpdV*	0,50	0,00089768	Dihydrolipoamide dehydrogenase
PA14_67320	*PA5098*	*hutH*	0,51	0,000378525	Histidine ammonia-lyase

Tabela A1. Genes reprimidos na linhagem Δ*PA14_00800* em comparação com a linhagem selvagem (PA14), segundo análise de RNAseq.

PA14 locus	PAO1 locus	Gene	Razão	FDR	Descrição
PA14_34070	*PA2365*	*hsiB3*	0,51	0,002599233	Protein of unknown function (DUF770)
PA14_00450	*PA0036*	*trpB*	0,51	1,30E-05	Tryptophan synthase subunit beta
PA14_10340	*PA4143*	*PA14_10340*	0,51	0,00171196	Toxin transporter
PA14_35500	*PA2249*	*bkdB*	0,51	0,011608028	Branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase subunit E2
PA14_51410	*PA0998*	*pqsC*	0,51	8,99E-05	PqsC
PA14_35530	*PA2247*	*bkdA1*	0,51	0,003334026	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha
PA14_67340	*PA5099*	*PA14_67340*	0,52	0,001154587	Cytosine/purines uracil thiamine allantoin permease
PA14_39420	*PA1942*	*PA14_39420*	0,52	0,048073633	Hypothetical protein
PA14_73290	*PA5558*	*atpF*	0,52	0,001835058	F0F1 ATP synthase subunit B
PA14_13110	*PA3924*	*PA14_13110*	0,53	8,55E-05	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase
PA14_54520	*PA0755*	*PA14_54520*	0,53	0,007109724	Porin
PA14_03510	*PA0270*	*PA14_03510*	0,53	0,022247682	Hypothetical protein
PA14_32590	*PA2478*	*PA14_32590*	0,54	4,81E-05	Thiol:disulfide interchange protein
PA14_60480	*PA4570*	*PA14_60480*	0,54	0,012971775	Hypothetical protein
PA14_23010	*PA3187*	*gltK*	0,54	0,001877564	ABC transporter ATP-binding protein
PA14_61400	*PA4640*	*mqoB*	0,54	0,000102621	Malate:quinone oxidoreductase
PA14_71890	*PA5445*	*PA14_71890*	0,54	0,000302149	Coenzyme A transferase
PA14_49200	*PA1178*	*oprH*	0,54	0,000366759	PhoP/Q and low Mg2+ inducible outer membrane protein
PA14_38460	*PA2014*	*gnyB*	0,54	0,020568327	Acyl-CoA carboxyltransferase subunit beta
PA14_38470	*PA2013*	*gnyH*	0,54	0,003375749	Gamma-carboxygeranoyl-CoA hydratase
PA14_34050	*PA2366*	*hsiC3*	0,54	0,007109724	Protein of unknown function (DUF877)
PA14_00630	*PA0050*	*PA14_00630*	0,55	0,032018259	Hypothetical protein

Tabela A1. Genes reprimidos na linhagem Δ*PA14_00800* em comparação com a linhagem selvagem (PA14), segundo análise de RNAseq.

PA14 locus	PAO1 locus	Gene	Razão	FDR	Descrição
PA14_66880	*PA5061*	*PA14_66880*	0,55	0,006688917	Hypothetical protein
PA14_08270	*PA0639*	*PA14_08270*	0,55	0,025983067	Hypothetical protein
PA14_00440	*PA0035*	*trpA*	0,55	0,000401718	Tryptophan synthase subunit alpha
PA14_40270	*PA1873*	*PA14_40270*	0,55	0,000518086	Cation transporter (CorA-like Mg2+ transporter protein)
PA14_51390	*PA0999*	*pqsD*	0,55	0,00062815	3-oxoacyl-ACP synthase
PA14_16370	*PA3712*	*PA14_16370*	0,55	0,000302149	Hypothetical protein
PA14_29470	*PA2679*	*PA14_29470*	0,55	0,021323035	Hypothetical protein (S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase)
PA14_51380	*PA1000*	*pqsE*	0,56	0,00171196	Quinolone signal response protein
PA14_54640	*PA0745*	*PA14_54640*	0,56	0,021440412	Enoyl-CoA hydratase
PA14_17570	*PA3614*	*PA14_17570*	0,56	0,000653638	Hypothetical protein (metallo-beta-lactamase superfamily)
PA14_55110	*PA0713*	*PA14_55110*	0,56	0,017221074	Hypothetical protein
PA14_27070	*PA2864*	*PA14_27070*	0,57	0,000416637	Hypothetical rotein (uncharacterised protein family YphA)
PA14_38480	*PA2012*	*gnyA*	0,57	0,001033483	Alpha subunit of geranoyl-CoA carboxylase, GnyA
PA14_34030	*PA2367*	*hcp3*	0,57	0,029267112	Hcp3 (type VI secretion system effector, Hcp)
PA14_55740	*PA4289*	*PA14_55740*	0,57	0,001136324	Chromate transmembrane transporter activity
PA14_55890	*PA4302*	*PA14_55890*	0,57	0,008634704	Type II secretion system protein
PA14_06290	*PA0482*	*glcB*	0,57	0,001422801	Malate synthase G
PA14_09880	*PA4177*	*PA14_09880*	0,57	0,018583085	Hypothetical protein
PA14_10330	*PA4144*	*PA14_10330*	0,57	0,006481158	Outer membrane efflux protein
PA14_73300	*PA5559*	*atpE*	0,57	0,005074509	F0F1 ATP synthase subunit C
PA14_33010	*PA2444*	*glyA2*	0,57	0,000458754	Serine hydroxymethyltransferase
PA14_38970	*PA1976*	*PA14_38970*	0,58	0,021297851	Two-component sensor

Tabela A1. Genes reprimidos na linhagem Δ*PA14_00800* em comparação com a linhagem selvagem (PA14), segundo análise de RNAseq.

PA14 locus	PAO1 locus	Gene	Razão	FDR	Descrição
PA14_34900	*PA2298*	*PA14_34900*	0,58	0,000208983	Oxidoreductase
PA14_66850	*PA5059*	*PA14_66850*	0,58	0,001172026	TetR 111amily transcriptional regulator
PA14_51430	*PA0996*	*pqsA*	0,58	0,011461497	PqsA
PA14_73260	*PA5556*	*atpA*	0,58	0,002021592	F0F1 ATP synthase subunit alpha
PA14_01180	*PA0097*	*PA14_01180*	0,58	0,002811214	Hypothetical protein
PA14_21700	*PA3271*	*PA14_21700*	0,58	0,020568327	Two-component sensor
PA14_28980		*PA14_28980*	0,58	0,036893371	Fe2+-dicitrate sensor
PA14_33910	*PA2377*	*PA14_33910*	0,58	0,000476815	Hypothetical protein
PA14_09500	*PA4208*	*opmD*	0,59	0,002900967	Outer membrane protein
PA14_38800	*PA1987*	*pqqC*	0,59	0,00274952	Pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein PqqC
PA14_13210		*PA14_13210*	0,59	0,002506924	Hypothetical protein
PA14_60750	*PA4590*	*pra*	0,59	0,010286198	Protein activator
PA14_68890	*PA5216*	*PA14_68890*	0,59	0,00291166	Iron ABC transporter, permease
PA14_35160	*PA2274*	*PA14_35160*	0,59	0,013545479	Hypothetical protein (antibiotic biosynthesis monooxygenase-like domain)
PA14_17720	*PA3599*	*PA14_17720*	0,59	0,027049289	LuxR 111amily transcriptional regulator
PA14_73250	*PA5555*	*atpG*	0,59	0,003507572	F0F1 ATP synthase subunit gamma
PA14_66840	*PA5058*	*phaC2*	0,59	0,042223344	Poly(3-hydroxyalkanoic acid) synthase 2
PA14_34010	*PA2369*	*hsiG3*	0,59	0,018280765	HsiG3 (type VI secretion system)
PA14_01490	*PA0122*	*PA14_01490*	0,59	0,013545479	Hemolysin
PA14_05510	*PA0423*	*PA14_05510*	0,59	0,001400412	Hypothetical protein
PA14_58330	*PA4495*	*PA14_58330*	0,60	0,00135625	Hypothetical protein
PA14_07870	*PA0604*	*PA14_07870*	0,60	0,028346544	ABC transporter substrate-binding protein

Tabela A1. Genes reprimidos na linhagem Δ*PA14_00800* em comparação com a linhagem selvagem (PA14), segundo análise de RNAseq.

PA14 locus	PAO1 locus	Gene	Razão	FDR	Descrição
PA14_45100	*PA1494*	*PA14_45100*	0,60	0,001575095	Hypothetical protein (regulation of polysaccharide biosynthetic process)
PA14_22370	*PA3233*	*PA14_22370*	0,60	0,001427726	Hypothetical protein (cAMP/cGMP binding motif profile)
PA14_05820	*PA0446*	*PA14_05820*	0,60	0,008141972	Hypothetical protein
PA14_02550	*PA0208*	*mdcA*	0,60	0,010608644	Malonate decarboxylase subunit alpha
PA14_08240	*PA0636*	*PA14_08240*	0,61	0,025293451	Hypothetical protein
PA14_28970		*PA14_28970*	0,61	0,025293451	RNA polymerase sigma factor
PA14_59220	*PA0985*	*PA14_59220*	0,61	0,018268326	Pyocin S5
PA14_13150	*PA3921*	*PA14_13150*	0,61	0,006344509	Transcriptional regulator
PA14_00650	*PA0052*	*PA14_00650*	0,61	0,027021671	Hypothetical protein
PA14_38490	*PA2011*	*gnyL*	0,61	0,014687378	Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase
PA14_65690	*PA4969*	*cpdA*	0,61	0,002603492	3’,5’-cyclic-AMP phosphodiesterase activity, CpdA
PA14_08130	*PA0626*	*PA14_08130*	0,61	0,014739227	Hypothetical protein
PA14_33040	*PA2442*	*gcvT2*	0,62	0,003910142	Glycine cleavage system protein T2
PA14_27480	*PA2830*	*htpX*	0,62	0,003029463	heat shock protein HtpX
PA14_00820	*PA0070*	*PA14_00820*	0,62	0,004727508	Hypothetical protein
PA14_24650	*PA3049*	*rmf*	0,62	0,017329755	Ribosome modulation factor
PA14_51360	*PA1001*	*phnA*	0,62	0,004009884	Anthranilate synthase 112amily112se112 I
PA14_48750	*PA1203*	*PA14_48750*	0,62	0,026601867	Hypothetical protein
PA14_72550	*PA5498*	*PA14_72550*	0,62	0,013454788	Adhesin
PA14_62400	*PA4715*	*PA14_62400*	0,62	0,01275412	Aminotransferase
PA14_71970	*PA5452*	*wbpW*	0,63	0,003224089	GDP-mannose pyrophosphorylase
PA14_23060	*PA3184*	*hexR*	0,63	0,004824533	DNA-binding transcriptional regulator HexR

Tabela A1. Genes reprimidos na linhagem Δ*PA14_00800* em comparação com a linhagem selvagem (PA14), segundo análise de RNAseq.

PA14 locus	PAO1 locus	Gene	Razão	FDR	Descrição
PA14_28170	*PA2777*	*PA14_28170*	0,63	0,042699612	Formate/nitrate transporter
PA14_73230	*PA5553*	*atpC*	0,63	0,004054874	F0F1 ATP synthase subunit epsilon
PA14_08120	*PA0625*	*PA14_08120*	0,63	0,016846944	Tail length determinator protein
PA14_43610	*PA1617*	*PA14_43610*	0,63	0,023083926	AMP-binding protein
PA14_71990	*PA5453*	*gmd*	0,63	0,003526219	GDP-mannose 4,6-dehydratase
PA14_73240	*PA5554*	*atpD*	0,64	0,006485822	F0F1 ATP synthase subunit beta
PA14_00960	*PA0080*	*tssJ1*	0,64	0,015113844	Lipoprotein
PA14_32600	*PA2477*	*PA14_32600*	0,64	0,03663666	Thiol:disulfide interchange protein
PA14_10370	*PA4140*	*PA14_10370*	0,64	0,006282977	Hypothetical protein
PA14_38825	*PA1985*	*pqqA*	0,64	0,040459496	Coenzyme PQQ synthesis protein
PA14_38820	*PA1986*	*pqqB*	0,64	0,022268324	Pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein
PA14_72540	*PA5497*	*PA14_72540*	0,64	0,013381533	Ribonucleotide reductase
PA14_40550	*PA1853*	*PA14_40550*	0,64	0,031579158	LysR 113amily transcriptional regulator
PA14_71590	*PA5424*	*PA14_71590*	0,64	0,03663666	Hypothetical protein
PA14_72930	*PA5528*	*PA14_72930*	0,65	0,01366383	Hypothetical protein
PA14_34110	*PA2362*	*dotU3*	0,65	0,040461424	Type IV / VI secretion system, DotU
PA14_61410		*PA14_61410*	0,65	0,022058681	Hypothetical protein
PA14_58320	*PA4494*	*PA14_58320*	0,65	0,043202246	Two-component sensor, RoxS
PA14_40260	*PA1874*	*PA14_40260*	0,65	0,042700194	Hypothetical protein
PA14_01030	*PA0085*	*hcp1*	0,65	0,019130512	Hypothetical protein
PA14_40310	*PA1869*	*PA14_40310*	0,65	0,026628474	Hypothetical protein (type VI secretion system effector, Hcp)
PA14_53970	*PA0794*	*PA14_53970*	0,65	0,0350379	Aconitate hydratase

Tabela A1. Genes reprimidos na linhagem Δ*PA14_00800* em comparação com a linhagem selvagem (PA14), segundo análise de RNAseq.

PA14 locus	PAO1 locus	Gene	Razão	FDR	Descrição
PA14_28400	*PA2760*	*PA14_28400*	0,65	0,021323035	Outer membrane OprD family porin, OprQ
PA14_07430	*PA0572*	*PA14_07430*	0,66	0,025983067	Hypothetical protein
PA14_33030	*PA2443*	*sdaA*	0,66	0,016793277	L-serine dehydratase
PA14_49180	*PA1179*	*phoP*	0,66	0,026754739	Two-component response regulator
PA14_32610	*PA2476*	*dsbG*	0,66	0,049305442	Disulfide isomerase/thiol-disulfide oxidase
PA14_72520	*PA5496*	*PA14_72520*	0,68	0,022382026	Hypothetical protein
PA14_33990	*PA2371*	*clpV3*	0,68	0,037916309	ClpV3
PA14_00480	*PA0039*	*PA14_00480*	0,68	0,03663666	Hypothetical protein
PA14_39800	*PA1912*	*PA14_39800*	0,68	0,043202246	ECF subfamily RNA polymerase sigma-70 factor, FemI
PA14_50520	*PA1074*	*braC*	0,68	0,0471021	Branched-chain amino acid transport protein BraC
PA14_49800	*PA1127*	*PA14_49800*	0,69	0,043589899	Oxidoreductase
PA14_51350	*PA1002*	*phnB*	0,69	0,039405218	Anthranilate synthase 114amily114se114 II
PA14_34130	*PA2361*	*icmF3*	0,69	0,042223344	IcmF3

Tabela A2. Genes induzidos na linhagem Δ*PA14_00800* em comparação com a linhagem selvagem (PA14), segundo análise de RNAseq.

PA14 locus	PAO1 locus	Gene	Razão	FDR	Descrição
PA14_23890	*PA3110*	*PA14_23890*	1,44	0,043202	Hypothetical protein
PA14_31000		*PA14_31000*	1,45	0,044003	Hypothetical protein
PA14_20970	*PA3331*	*cyp23*	1,46	0,044303	Cytochrome P450
PA14_01720	*PA0140*	*ahpF*	1,47	0,042055	Alkyl hydroperoxide reductase
PA14_07840	*PA0601*	*PA14_07840*	1,47	0,035382	Two-component response regulator, AgtR
PA14_09195	*PA4233*	*PA14_09195*	1,48	0,040461	Major facilitador superfamily transporter
PA14_65940	*PA4986*	*PA14_65940*	1,49	0,047091	Oxidoreductase
PA14_29930	*PA2643*	*nuoH*	1,49	0,045415	NADH dehydrogenase subunit H
PA14_42030	*PA1740*	*PA14_42030*	1,49	0,042223	Hypothetical protein
PA14_51950		*PA14_51950*	1,49	0,023911	Hypothetical protein
PA14_40670	*PA1843*	*metH*	1,49	0,025293	B12-dependent methionine synthase
PA14_15850	*PA3755*	*PA14_15850*	1,49	0,024634	Hypothetical protein
PA14_12780	*PA3948*	*PA14_12780*	1,50	0,043634	Two-component response regulator, RocA1
PA14_06950	*PA0533*	*PA14_06950*	1,50	0,041982	LuxR 115amily transcriptional regulator
PA14_57040	*PA4388*	*PA14_57040*	1,51	0,017084	Hypothetical protein
PA14_10940	*PA4094*	*PA14_10940*	1,51	0,026417	AraC 115amily transcriptional regulator
PA14_27980	*PA2795*	*PA14_27980*	1,52	0,023383	tRNA-dihydrouridine synthase A
PA14_29860	*PA2648*	*nuoM*	1,53	0,014265	NADH dehydrogenase subunit M
PA14_20890	*PA3337*	*rfaD*	1,53	0,039066	ADP-L-glycero-D-manno-heptose-6-epimerase
PA14_29880	*PA2647*	*nuoL*	1,53	0,01138	NADH dehydrogenase subunit L
PA14_04320	*PA0331*	*ilvA1*	1,53	0,013295	Threonine dehydratase
PA14_58170	*PA4482*	*gatC*	1,54	0,02144	Aspartyl/glutamyl-tRNA amidotransferase subunit C

Tabela A2. Genes induzidos na linhagem Δ*PA14_00800* em comparação com a linhagem selvagem (PA14), segundo análise de RNAseq.

PA14 locus	PAO1 locus	Gene	Razão	FDR	Descrição
PA14_18710	*PA3527*	*pyrC*	1,54	0,010473	Dihydroorotase
PA14_20900	*PA3336*	*PA14_20900*	1,55	0,019186	Major facilitator superfamily transporter
PA14_16990	*PA3662*	*PA14_16990*	1,55	0,044003	Hypothetical protein
PA14_24350	*PA3077*	*PA14_24350*	1,55	0,039684	Two-component response regulator, CprR
PA14_19800	*PA3423*	*PA14_19800*	1,55	0,040461	AraC 116amily transcriptional regulator
PA14_26000	*PA2941*	*PA14_26000*	1,55	0,047091	Magnesium chelatase
PA14_49630	*PA1142*	*PA14_49630*	1,56	0,049065	Transcriptional regulator
PA14_64190	*PA4853*	*fis*	1,56	0,037264	DNA-binding protein Fis
PA14_03300		*PA14_03300*	1,56	0,032292	Hypothetical protein
PA14_28570	*PA2749*	*endA*	1,56	0,035382	DNA-specific endonuclease I
PA14_51510	*PA0988*	*PA14_51510*	1,57	0,013382	Hypothetical protein (thioesterase superfamily)
PA14_35290	*PA2265*	*gnd*	1,57	0,026782	Gluconate dehydrogenase
PA14_19160	*PA3473*	*PA14_19160*	1,57	0,009982	Hypothetical protein
PA14_42100	*PA1735*	*PA14_42100*	1,58	0,022059	Hypothetical protein (putative 116amily116se)
PA14_30140	*PA2627*	*PA14_30140*	1,58	0,025293	Hypothetical protein
PA14_62430	*PA4718*	*PA14_62430*	1,58	0,021334	Hypothetical protein
PA14_11420	*PA4054*	*ribB*	1,59	0,029817	Bifunctional 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase/GTP cyclohydrolase II-like protein
PA14_68360	*PA5174*	*PA14_68360*	1,59	0,01395	Beta-ketoacyl synthase
PA14_44060	*PA1581*	*sdhC*	1,59	0,036898	Succinate dehydrogenase, cytochrome b556 subunit
PA14_61110		*PA14_61110*	1,59	0,023171	Hypothetical protein (MobA-like protein)
PA14_60200	*PA4543*	*PA14_60200*	1,59	0,011611	Hypothetical protein
PA14_55320	*PA0696*	*PA14_55320*	1,60	0,027581	Hypothetical protein

Tabela A2. Genes induzidos na linhagem Δ*PA14_00800* em comparação com a linhagem selvagem (PA14), segundo análise de RNAseq.

PA14 locus	PAO1 locus	Gene	Razão	FDR	Descrição
PA14_38060	*PA2045*	*PA14_38060*	1,61	0,019131	Hypothetical protein
PA14_17650	*PA3606*	*PA14_17650*	1,62	0,025983	Hypothetical protein
PA14_20960	*PA3332*	*PA14_20960*	1,63	0,013664	Isomerase
PA14_52120		*PA14_52120*	1,63	0,00521	Hypothetical protein
PA14_59750		*cupD4*	1,63	0,027603	Fimbrial subunit
PA14_16980	*PA3663*	*PA14_16980*	1,64	0,011167	Hypothetical protein (putative zinc- or iron-chelating domain)
PA14_48540	*PA1220*	*PA14_48540*	1,64	0,047102	Hypothetical protein
PA14_19750	*PA3425*	*PA14_19750*	1,64	0,021334	Hypothetical protein
PA14_10290	*PA4147*	*acoR*	1,67	0,003508	Transcriptional regulator AcoR
PA14_64660	*PA4892*	*ureF*	1,67	0,022845	Urease accessory protein UreF
PA14_30560	*PA2593*	*PA14_30560*	1,68	0,002742	Quorum threshold expression element, QteE
PA14_30020	*PA2637*	*nuoA*	1,68	0,003805	NADH dehydrogenase subunit A
PA14_21300	*PA3303*	*PA14_21300*	1,71	0,027309	Major facilitator superfamily transporter
PA14_51630	*PA0978*	*PA14_51630*	1,71	0,003266	Transposase
PA14_12360	*PA3979*	*PA14_12360*	1,71	0,003134	Hypothetical protein
PA14_48570	*PA1217*	*PA14_48570*	1,73	0,004305	2-isopropylmalate synthase
PA14_40510	*PA1856*	*ccoN-2*	1,74	0,013382	cbb3-type cytochrome c oxidase subunit I
PA14_12550	*PA3967*	*PA14_12550*	1,74	0,018322	Hypothetical protein (oxygen and iron-binding motif)
PA14_15490		*PA14_15490*	1,74	0,043202	Hypothetical protein
PA14_30010	*PA2638*	*nuoB*	1,75	0,001659	NADH dehydrogenase subunit B
PA14_40690	*PA1842*	*PA14_40690*	1,81	0,001415	Hypothetical protein
PA14_32200	*PA2510*	*catR*	1,83	0,030311	Transcriptional regulator CatR

Tabela A2. Genes induzidos na linhagem Δ*PA14_00800* em comparação com a linhagem selvagem (PA14), segundo análise de RNAseq.

PA14 locus	PAO1 locus	Gene	Razão	FDR	Descrição
PA14_10630	*PA4123*	*hpcC*	1,83	0,02792	5-carboxy-2-hydroxymuconate semialdehyde dehydrogenase
PA14_31420	*PA2560*	*PA14_31420*	1,84	0,01713	Hypothetical protein
PA14_72200	*PA5470*	*prfH*	1,86	0,033077	Peptide chain release factor-like protein
PA14_44540	*PA1539*	*PA14_44540*	1,87	0,003582	Hypothetical protein
PA14_19680	*PA3432*	*PA14_19680*	1,87	0,011058	Hypothetical protein (LrgA family protein)
PA14_32190	*PA2511*	*PA14_32190*	1,88	0,005354	Transcriptional regulator
PA14_56660	*PA4356*	*PA14_56660*	1,88	0,002022	Xenobiotic reductase
PA14_10910	*PA4096*	*PA14_10910*	1,89	0,022149	Major facilitator transporter
PA14_35270	*PA2266*	*PA14_35270*	1,90	3,20E-05	Cytochrome c precursor
PA14_00570	*PA0045*	*PA14_00570*	1,91	0,024634	Lipoprotein
PA14_69300	*PA5248*	*PA14_69300*	1,91	0,000236	Hypothetical protein (putative iron permease)
PA14_56640	*PA4355*	*PA14_56640*	1,92	2,44E-05	Major facilitator superfamily transporter
PA14_19690	*PA3431*	*PA14_19690*	1,92	0,004288	Hypothetical protein
PA14_48560	*PA1218*	*PA14_48560*	1,92	0,000863	Hypothetical protein
PA14_38580	*PA2004*	*PA14_38580*	1,94	0,000276	Hypothetical protein (citrate transporter)
PA14_56670	*PA4357*	*PA14_56670*	1,94	0,02148	Hypothetical protein
PA14_02760	*PA0226*	*PA14_02760*	1,95	0,003213	CoA transferase, subunit A
PA14_38590	*PA2003*	*bdhA*	1,96	0,000245	3-hydroxybutyrate dehydrogenase
PA14_35300	*PA2264*	*PA14_35300*	1,97	7,85E-05	Hypothetical protein (gluconate 2-dehydrogenase subunit 3)
PA14_10980		*PA14_10980*	1,97	0,019562	Hypothetical protein
PA14_49050	*PA1190*	*PA14_49050*	1,97	0,001961	Hypothetical protein
PA14_39130	*PA1964*	*PA14_39130*	1,98	0,003274	ABC transporter ATP-binding protein

Tabela A2. Genes induzidos na linhagem Δ*PA14_00800* em comparação com a linhagem selvagem (PA14), segundo análise de RNAseq.

PA14 locus	PAO1 locus	Gene	Razão	FDR	Descrição
PA14_31960	*PA2523*	*PA14_31960*	1,99	0,043386	Two-component response regulator, CzcR
PA14_32060	*PA2519*	*xylS*	2,02	0,003758	Transcriptional regulator XylS
PA14_54830	*PA0730*	*PA14_54830*	2,04	1,80E-05	Transferase
PA14_65920	*PA4985*	*PA14_65920*	2,04	0,016847	Hypothetical protein
PA14_29090	*PA2711*	*PA14_29090*	2,09	2,08E-05	Periplasmic spermidine/putrescine-binding protein
PA14_44200	*PA1568*	*PA14_44200*	2,10	0,004495	Hypothetical protein
PA14_36360	*PA2187*	*PA14_36360*	2,12	1,89E-06	Hypothetical protein
PA14_00360	*PA0030*	*PA14_00360*	2,12	0,02205	Hypothetical protein (choline binding and transport)
PA14_47810	*PA1270*	*PA14_47810*	2,12	2,80E-05	Hypothetical protein
PA14_10750	*PA4113*	*PA14_10750*	2,13	8,13E-06	Sugar efflux transporter
PA14_64650	*PA4891*	*ureE*	2,16	0,000161	Urease accessory protein UreE
PA14_17690	*PA3602*	*PA14_17690*	2,19	4,08E-06	Hypothetical protein (glutamate synthase activity)
PA14_44530	*PA1540*	*PA14_44530*	2,23	0,02001	Multidrug efflux system protein MdtI
PA14_66490	*PA5029*	*PA14_66490*	2,23	1,81E-05	LysR 119amily transcriptional regulator
PA14_44520	*PA1541*	*PA14_44520*	2,24	0,034506	
PA14_21280	*PA3305*	*PA14_21280*	2,26	0,000267	Hypothetical protein
PA14_27280	*PA2846*	*PA14_27280*	2,31	6,06E-08	LysR 119amily transcriptional regulator
PA14_51520		*spcU*	2,31	9,41E-09	Chaperone
PA14_48600	*PA1215*	*PA14_48600*	2,40	3,20E-05	AMP-binding protein
PA14_48610	*PA1214*	*PA14_48610*	2,42	0,000217	Sparagine synthase
PA14_49650	*PA1140*	*PA14_49650*	2,43	2,76E-09	Hypothetical protein
PA14_48630	*PA1212*	*PA14_48630*	2,43	0,000217	Major facilitator superfamily transporter (sugar transport proteins signature 1)

Tabela A2. Genes induzidos na linhagem Δ*PA14_00800* em comparação com a linhagem selvagem (PA14), segundo análise de RNAseq.

PA14 locus	PAO1 locus	Gene	Razão	FDR	Descrição
PA14_42390	*PA1713*	*exsA*	2,45	7,19E-06	Transcriptional regulator ExsA
PA14_48620	*PA1213*	*PA14_48620*	2,45	7,19E-05	Clavaminic acid synthetase
PA14_21290	*PA3304*	*PA14_21290*	2,51	0,004783	Hypothetical protein (HlyD family secretion protein)
PA14_19770	*PA3424*	*PA14_19770*	2,53	1,83E-10	Hypothetical protein
PA14_28470		*PA14_28470*	2,57	1,48E-09	Hypothetical protein
PA14_38730	*PA1993*	*PA14_38730*	2,59	4,13E-06	Major facilitator superfamily transporter
PA14_01990	*PA0160*	*PA14_01990*	2,59	0,000148	Hypothetical protein
PA14_20250	*PA3390*	*PA14_20250*	2,76	0,027477	Hypothetical protein
PA14_64610	*PA4888*	*PA14_64610*	2,84	0,022248	Hypothetical protein
PA14_51530		*exoU*	2,93	6,85E-13	Cytotoxin ExoU
PA14_69925	*PA5297*	*poxB*	2,96	1,67E-12	Pyruvate dehydrogenase (cytochrome)
PA14_51460	*PA0993*	*cupC2*	2,97	0,02144	Chaperone CupC
PA14_27270	*PA2847*	*PA14_27270*	3,03	7,16E-13	Hypothetical protein
PA14_36350	*PA2189*	*PA14_36350*	3,08	1,25E-11	Hypothetical protein (ClpP/crotonase-like domain)
PA14_06940	*PA0532*	*PA14_06940*	3,13	1,07E-06	Hypothetical protein
PA14_42660	*PA1690*	*pscU*	3,16	3,00E-12	Translocation protein in type III secretion
PA14_48590	*PA1216*	*PA14_48590*	3,18	6,38E-08	Hypothetical protein (S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase-like)
PA14_42490	*PA1704*	*pcrR*	3,25	8,28E-10	Transcriptional regulator protein PcrR
PA14_42430	*PA1710*	*exsC*	3,32	1,55E-15	Exoenzyme S synthesis protein C
PA14_42410	*PA1711*	*PA14_42410*	3,39	1,08E-19	Hypothetical protein
PA14_42510	*PA1702*	*PA14_42510*	3,73	1,69E-09	Hypothetical protein
PA14_42580	*PA1696*	*pscO*	3,82	7,82E-08	Translocation protein in type III secretion

Tabela A2. Genes induzidos na linhagem Δ*PA14_00800* em comparação com a linhagem selvagem (PA14), segundo análise de RNAseq.

PA14 locus	PAO1 locus	Gene	Razão	FDR	Descrição
PA14_42620	*PA1693*	*pscR*	3,86	1,56E-13	Type III secretion system protein
PA14_42500	*PA1703*	*pcrD*	3,91	2,12E-17	Type III secretory apparatus protein PcrD
PA14_42400	*PA1712*	*exsB*	4,02	2,59E-20	Exoenzyme S synthesis protein B
PA14_66520	*PA5031*	*PA14_66520*	4,15	9,18E-17	Short chain dehydrogenase
PA14_31170		*PA14_31170*	4,15	2,46E-05	Hypothetical protein
PA14_42380	*PA1714*	*PA14_42380*	4,18	4,78E-23	Hypothetical protein (negative regulator of protein secretion)
PA14_42250	*PA1725*	*pscL*	4,23	3,33E-11	Type III secretion system protein
PA14_42640	*PA1691*	*pscT*	4,32	2,63E-14	Translocation protein in type III secretion
PA14_36345	*PA2191*	*exoY*	4,35	9,23E-21	Adenylate cyclase, ExoY
PA14_42610	*PA1694*	*pscQ*	4,42	6,82E-17	Type III secretion system protein
PA14_42270	*PA1723*	*pscJ*	4,54	6,76E-14	PscJ type III export protein
PA14_42630	*PA1692*	*PA14_42630*	4,61	7,49E-08	Translocation protein in type III secretion
PA14_31160		*PA14_31160*	4,66	1,55E-10	Hypothetical protein
PA14_42600	*PA1695*	*pscP*	4,84	1,89E-20	Translocation protein in type III secretion
PA14_42530	*PA1700*	*PA14_42530*	4,86	4,81E-14	Type III secretion protein
PA14_42280	*PA1722*	*pscI*	4,86	3,64E-22	Type III export protein PscI
PA14_42520	*PA1701*	*PA14_42520*	4,89	5,68E-11	Hypothetical protein
PA14_14320		*PA14_14320*	5,25	2,20E-15	Hypothetical protein
PA14_42320	*PA1718*	*pscE*	5,29	6,44E-16	Type III export protein PscE
PA14_42350	*PA1716*	*pscC*	5,30	5,32E-17	Type III secretion outer membrane protein PscC precursor
PA14_42360	*PA1715*	*pscB*	5,30	1,73E-21	Type III export apparatus protein

Tabela A2. Genes induzidos na linhagem Δ*PA14_00800* em comparação com a linhagem selvagem (PA14), segundo análise de RNAseq.

PA14 locus	PAO1 locus	Gene	Razão	FDR	Descrição
PA14_42260	*PA1724*	*pscK*	5,53	3,50E-12	PscK type III export protein
PA14_42340	*PA1717*	*pscD*	5,53	9,67E-10	Type III export protein PscD
PA14_42290	*PA1721*	*pscH*	5,79	2,49E-21	Type III export protein PscH
PA14_42480	*PA1705*	*pcrG*	5,90	9,55E-19	Regulator in type III secretion
PA14_42300	*PA1720*	*pscG*	6,07	6,77E-21	Type III export protein PscG
PA14_00560	*PA0044*	*exoT*	6,11	3,31E-21	exoenzyme T
PA14_42310	*PA1719*	*pscF*	6,39	7,15E-21	Type III export protein PscF
PA14_52960	*PA0874*	*PA14_52960*	6,41	1,82E-10	Hypothetical protein
PA14_42470	*PA1706*	*pcrV*	6,44	3,16E-27	Type III secretion protein PcrV
PA14_42450	*PA1708*	*popB*	6,94	8,48E-30	Translocator protein PopB
PA14_42440	*PA1709*	*popD*	7,07	3,57E-31	Translocator outer membrane protein PopD precursor
PA14_42460	*PA1707*	*pcrH*	7,14	1,45E-29	Regulatory protein PcrH
PA14_42540	*PA1699*	*PA14_42540*	7,14	4,18E-11	Protein in type III secretion
PA14_42550	*PA1698*	*popN*	7,26	8,18E-42	Type III secretion outer membrane protein PopN precursor
PA14_42570	*PA1697*	*pscN*	8,29	1,55E-33	Type III secretion system ATPase
PA14_06930	*PA0531*	*PA14_06930*	8,46	5,89E-14	Glutamine amidotransferase
PA14_06920	*PA0530*	*PA14_06920*	9,22	1,81E-11	Class III pyridoxal phosphate-dependent aminotransferase
PA14_06890	*PA0529*	*PA14_06890*	9,28	2,47E-14	Hypothetical protein
PA14_14330	*PA3842*	*PA14_14330*	9,62	9,63E-32	Chaperone
PA14_06900		*PA14_06900*	9,86	5,58E-14	Hypothetical protein
PA14_66510	*PA5030*	*PA14_66510*	10,61	2,86E-50	Major facilitator superfamily (MSF) transporter

SÚMULA CURRICULAR

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Thays de Oliveira Pereira

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: São Paulo, SP

Data de nascimento: 10 de maio de 1992

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

2.1. Ensino Superior

2010 – 2014 Graduação em Ciências Biológicas

Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

2013 Graduação Sanduíche em Biotecnologia

University of Surrey, Reino Unido

Programa Ciência sem Fronteiras (CNPq)

3. OCUPAÇÃO

2015-2017 Bolsista de Mestrado, FAPESP

Bolsa no País (2015 – 2017)

Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (Jan 2017 – Jul 2017)

2013 Bolsista no Programa Ciência sem Fronteiras, CNPq

4. PUBLICAÇÕES

4.1. Artigos completos em periódicos

Kaihami, G.H., Breda, L.C.D., de Almeida, J.R.F., **de Oliveira Pereira, T**., Nicastro, G.G., Boechat, A.L., et al. (2017) The atypical response regulator AtvR is a new player in *Pseudomonas aeruginosa* response to hypoxia and virulence. *Infect. Immun*. 85: e00207-17.

Nicastro, G.G., Kaihami, G.H., **Pereira, T.O.**, Meireles, D.A., Groleau, M.-C., Déziel, E., and Baldini, R.L. (2014) Cyclic-di-GMP levels affect *Pseudomonas aeruginosa* fitness in the presence of imipenem. *Environ. Microbiol.* **16**: 1321–1333.

4.2. Resumos em congressos

DE OLIVEIRA PEREIRA, T.; KAIHAMI, GH.; NICASTRO, GG.; BALDINI, RL. A novel virulence gene related to c-di-GMP controls surface-dependent phenotypes in *Pseudomonas aeruginosa*. 62° CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 2016, Caxambu, MG.

PEREIRA, THAYS O.; NICASTRO, GIANLUCCA G. ; BALDINI, REGINA L. . O papel de c-di-GMP na expressão da porina OprD em *Pseudomonas aeruginosa* PA14. 20° SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA, 2012, Ribeirão Preto, SP.