

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

JULIANA HELENA BATISTA

**Função e biogênese de vesículas de membrana externa do patógeno
oportunista *Chromobacterium violaceum***

Ribeirão Preto
2021

JULIANA HELENA BATISTA

**Função e biogênese de vesículas de membrana externa do patógeno
oportunista *Chromobacterium violaceum***

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutora em
Ciências

Área de concentração: Biologia Celular e
Molecular

Orientador: Prof. Dr. José Freire da Silva Neto

Ribeirão Preto
2021

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

Batista, Juliana Helena

Função e biogênese de vesículas de membrana externa do patógeno oportunista *Chromobacterium violaceum*. Ribeirão Preto, 2021.

p.: 118 il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: da Silva Neto, José Freire.

1. *Chromobacterium violaceum*. 2. Vesículas de membrana externa. 3. Violaceína. 4. Sistema de transporte ABC VacJ/Yrb. 5. DsbA. 6. Virulência bacteriana. 7. Genética de bactérias.

Nome: BATISTA, Juliana Helena

Título: Função e biogênese de vesículas de membrana externa do patógeno oportunista *Chromobacterium violaceum*

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. José Freire da Silva Neto

Avaliada em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado “*Caracterização funcional de vesículas de membrana externa de Chromobacterium violaceum*”, registrado com o número **183/2017**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. José Freire da Silva Neto**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 25 de setembro de 2017.

Este Protocolo prevê a utilização de 70 camundongos C57Bl 6 fêmeas pesando 20g oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do *Campus* de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e 70 camundongos iPAF KO fêmeas pesando 20g oriundos do Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 25/09/2017 a 07/11/2021.

We certify that the Protocol *n*° 183/2017, entitled “*Functional characterization of outer membrane vesicles of Chromobacterium violaceum*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 09/25/2017. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata, subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 70 female C57Bl/6 mice weighing 20g from Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo and 70 female iPAF KO mice weighing 20g from Breeding Center of Special Mice of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 11/07/2021.

Ribeirão Preto, 25 de setembro de 2017


Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA-FMRP-USP

Aos meus pais José Mauro e
Marisa e minha irmã Natália pelo
cuidado, incentivo e amor
incondicional.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Freire da Silva Neto pela confiança, incentivo e orientação impecável ao longo desses seis anos. Além de ter se tornado minha principal referência científica, tornou-se um amigo muito querido a quem sempre irei me lembrar.

Aos amigos do laboratório Júlia, Kelly, Renato, Maristela, Bianca, Vinícius, Raquel, Gustavo, Graziela e Isadora pela amizade, convivência e muitas risadas diárias.

À Cláudia R. M. Faggion pelo suporte técnico e cuidado com nossa pesquisa.

À Gabriela B. Zamoner pela amizade e trabalho burocrático prestado por todos esses anos.

Aos docentes Dr. Dario S. Zamboni, Dr. Paulo Coelho e Dr^a Maria Cristina R. A. Barreira pela colaboração diária com o compartilhamento de equipamentos, espaço e reagentes.

Ao Dr. Fausto B. R. Almeida pela intensa colaboração com minha pesquisa.

Ao Prof. Dr. Edward Miao pela oportunidade de ter aprendido e trabalhado com seu grupo de pesquisa.

À Universidade da Carolina do Norte em Chapel Hill pela recepção e realização de um sonho.

A todos os técnicos da FMRP, principalmente aos técnicos do Depto de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos pelo comprometimento com os serviços prestados.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e ao Programa de Biologia Celular e Molecular pelo ambiente acadêmico exemplar.

Aos meus amigos Bruno e Eduardo pela longa amizade e suporte emocional e científico.

Aos meus queridos pais, José Mauro e Marisa, e amada irmã Natália pelo incentivo, amor e cuidado.

À Universidade de São Paulo pela minha transformação pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS PELO APOIO FINANCEIRO

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (Capes) – Código de Financiamento 001, pela concessão da bolsa de doutorado, além do apoio institucional ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

Ao Programa de Internacionalização da Capes (Capes-PrInt) pelo apoio financeiro ao meu intercâmbio durante o doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro com os projetos regulares que possibilitou a realização deste trabalho.

À Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da FMRP-USP (FAEPA) pelo auxílio financeiro destinado a congressos e ao Laboratório de Regulação da Expressão Gênica e Patogenicidade Bacteriana.

“O correr da vida embrulha tudo, a vida
é assim: esquenta e esfria, aperta e daí
afrouxa, sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem.”

João Guimarães Rosa

RESUMO

Batista, Juliana Helena. **Função e biogênese de vesículas de membrana externa do patógeno oportunista *Chromobacterium violaceum***. 2021. 118 p. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Vesículas de membrana externa (OMVs) são nanopartículas esféricas (20-300 nm) liberadas naturalmente para o meio extracelular a partir da membrana externa de bactérias Gram-negativas. Estudos recentes indicam que as OMVs são importantes tanto na fisiologia quanto nas interações bactéria-bactéria e bactéria-hospedeiro, atuando em patogênese, reposta bacteriana a diversos estresses e homeostase da microbiota humana. Neste trabalho, estudamos as vias de biogênese, a composição proteica, a seleção de carga e o papel *in vivo* das OMVs de *Chromobacterium violaceum*, um bacilo Gram-negativo ubíquo de vida-livre, que também é capaz de invadir e replicar-se em células eucarióticas. Quanto à biogênese de OMVs em *C. violaceum*, identificamos três mecanismos distintos, sendo estes mediados pelo sistema de transporte de fosfolípidios VacJ/YrbBCDEF, pela proteína periplasmática DsbA que auxilia no dobramento e estabilidade de proteínas secretadas e pela molécula hidrofóbica antimicrobiana violaceína. Demonstramos que a violaceína controla a vesiculação de *C. violaceum* ao induzir a sua própria secreção via OMVs, dessa forma promovendo a adaptação de *C. violaceum* frente à competição contra bactérias Gram-positivas. A taxa de vesiculação de *C. violaceum* foi controlada por *quorum sensing* via regulação da síntese de violaceína e do sistema VacJ/Yrb. O sistema VacJ/Yrb apresentou papel fundamental na homeostase da vesiculação e na manutenção da virulência de *C. violaceum*. Mutantes nulos sem os genes *vacJ* ou *yrbE* foram incapazes de invadir células epiteliais e foram completamente atenuados quanto à virulência em modelo murino, apesar de não apresentarem problemas fisiológicos e morfológicos, como demonstramos em ensaios fenotípicos e de microscopia eletrônica. Dessa maneira, estes dados favorecem um modelo no qual o aumento descontrolado da vesiculação é prejudicial para a manutenção de mecanismos de virulência que *C. violaceum* utiliza durante a invasão de células eucarióticas para o estabelecimento de seu

nicho intracelular. Por fim, descobrimos neste trabalho que a proteína DsbA é muito importante para o endereçamento e qualidade de proteínas em OMVs. Nossos dados de proteômica comparativa entre a linhagem selvagem e mutante *dsbA* revelaram que importantes fatores de virulência que bactérias geralmente utilizam durante a patogênese, como hemolisinas, proteases e lipases, são secretados via OMVs e estão diferencialmente encontrados nas OMVs da linhagem mutante em relação à selvagem. Além disso, a deleção de *dsbA* impediu que *C. violaceum* estabeleça a infecção em camundongos, indicando o importante papel de OMVs durante a patogênese *in vivo*. Portanto, neste trabalho descrevemos mecanismos de vesiculação tanto espécie-específicos, como o mediado pela violaceína, quanto mecanismos mais gerais controlados por genes altamente conservados que potencialmente são empregados por outras bactérias Gram-negativas de relevância clínica. Sendo assim, nosso estudo fortalece a ideia de utilizar sistemas que controlam a biogênese de OMVs, como VacJ/YrbBCDEF e DsbA como importantes alvos antimicrobianos.

Palavras-chave: *Chromobacterium violaceum*, vesículas de membrana externa, biogênese de vesículas, sistema de transporte ABC VacJ/Yrb, violaceína, DsbA.

ABSTRACT

Batista, Juliana Helena. **Function and biogenesis of outer membrane vesicles of the opportunistic pathogen *Chromobacterium violaceum***. 2021. 118 p. Doctorate thesis - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Outer membrane vesicles (OMVs) are spherical nanoparticles (20-300 nm) naturally released from the outer membrane of Gram-negative bacteria to the extracellular milieu. Recent studies indicated that OMVs are important to bacterial physiology, interbacterial interactions, and host-pathogen interactions, playing pivotal roles in pathogenesis, bacterial response to stresses, and human microbiota homeostasis. In this work, we studied biogenesis pathways, protein composition, cargo selection, and the *in vivo* role of OMVs of *Chromobacterium violaceum*, a free-living ubiquitous Gram-negative rod-shaped bacterium that can invade and replicate inside eukaryotic cells. Regarding OMV biogenesis in *C. violaceum*, we found three distinct mechanisms mediated by the lipid transport system VacJ/YrbBCDEF, the periplasmic protein DsbA, which assist folding and stability of secreted proteins, and by the hydrophobic antimicrobial molecule violacein. We showed that violacein controls *C. violaceum* vesiculation by inducing its own secretion through OMVs, promoting *C. violaceum* adaptation during competition against Gram-positive bacteria. The vesiculation rate of *C. violaceum* was controlled by quorum sensing via regulation of violacein synthesis and the VacJ/Yrb system. The VacJ/Yrb system showed a critical role in the homeostasis of vesiculation and maintenance of *C. violaceum* virulence. Null mutants lacking the *vacJ* or *yrbE* genes were unable to invade epithelial cells and had their virulence completely attenuated in a murine model, although the mutants did not show physiological or morphological problems, as revealed by phenotypic assays and electron microscopy. Thus, these data favor a model in which the increased uncontrolled vesiculation is harmful to the maintenance of virulence mechanisms that *C. violaceum* uses during the invasion of eukaryotic cells to establish its intracellular niche. We also found that DsbA protein is important to protein sorting and quality into OMVs. Our comparative proteomic analysis between wild-type strain and *dsbA* mutant revealed that important

virulence factors that bacteria usually use during pathogenesis, such as hemolysins, proteases, and lipases, are differentially expressed in *dsbA* mutant OMVs compared to the wild-type. Besides, *dsbA* deletion impaired *C. violaceum* establishment in mice, suggesting an important role of OMVs during pathogenesis *in vivo*. Thus, we described in this work specific (violacein) and general mechanisms of vesiculation controlled by genes highly conserved that are potentially used by other Gram-negative bacteria with clinical importance. Therefore, our study reinforces the idea to use OMVs biogenesis control systems, such as the VacJ/YrbBCDEF and DsbA, as important antimicrobial targets.

Keywords: *Chromobacterium violaceum*, outer membrane vesicles, vesicle biogenesis, VacJ/Yrb ABC transport system, violacein, DsbA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo conservado de biogênese de vesículas de membrana externa.....	21
Figura 2 - Regulação do operon <i>vioABCDE</i> pelo sistema de <i>quorum sensing</i> Cvil/CviR de <i>C. violaceum</i>	26
Figura 3 - Modelo de resolução da infecção de <i>C. violaceum</i> pelo sistema imune inato.....	27
Figura 4 - <i>Chromobacterium violaceum</i> regula a liberação de OMVs durante as fases de crescimento.....	48
Figura 5 - <i>Chromobacterium violaceum</i> secreta violaceína em OMVs.....	49
Figura 6 - Identificação de violaceína.....	51
Figura 7 - OMVs contribuem para a competição de <i>C. violaceum</i> contra <i>S. aureus</i> ao mediar a citotoxicidade da violaceína <i>in vivo</i> e à longa distância.....	53
Figura 8 - O mutante Δ <i>vioABCDE</i> apresenta crescimento regular, porém com produção reduzida de biofilme.....	54
Figura 9 - A violaceína induz a liberação de OMVs durante a fase estacionária.....	56
Figura 10 - A violaceína induz a liberação de OMVs em <i>E. coli</i>	57
Figura 11 - O conservado sistema de transporte ABC VacJ/YrbBCDEF controla a biogênese de OMVs em <i>C. violaceum</i>	59
Figura 12 - Os operons <i>yrbFEDCB/vacJ</i> e <i>vioABCDE</i> são induzidos em alta densidade celular e regulados por <i>quorum sensing</i>	61
Figura 13 - <i>Chromobacterium violaceum</i> ajusta a taxa de liberação de OMVs de maneira dependente da densidade celular para secretar violaceína contra bactérias competidoras.....	62
Figura 14 - Os mutantes Δ <i>vacJ</i> e Δ <i>yrbE</i> apresentam crescimento, viabilidade e motilidade regulares.....	64
Figura 15 - Os mutantes Δ <i>vacJ</i> e Δ <i>yrbE</i> de <i>C. violaceum</i> apresentam problemas no crescimento quando submetidos a agentes estressores de membrana.....	66
Figura 16 - Sub-localização celular e distribuição das proteínas identificadas nas OMVs de <i>C. violaceum</i> selvagem e do mutante Δ <i>yrbE</i>	68
Figura 17 - Indução de citocinas pró-inflamatórias e morte celular por OMVs de <i>C. violaceum</i> selvagem e dos mutantes Δ <i>vacJ</i> e Δ <i>yrbE</i>	74

Figura 18 - O sistema de transporte ABC VacJ/Yrb é importante para a infecção e sobrevivência de <i>C. violaceum</i> no hospedeiro.....	76
Figura 19 - A proteína DsbA é importante para a manutenção do envelope celular em <i>C. violaceum</i>	80
Figura 20 - DsbA controla a produção de OMVs de modo independente do sistema VacJ/Yrb.....	82
Figura 21 - Aprisionamento dos complexos DsbA-substratos para identificação por espectrometria de massas.....	84
Figura 22 – Sub-localização celular e distribuição das proteínas identificadas nas OMVs de <i>C. violaceum</i> selvagem e do mutante $\Delta dsbA$	88
Figura 23 – Papel de DsbA em atividade proteolítica e hemolítica de <i>C. violaceum</i>	94
Figura 24 – Indução de citocinas pró-inflamatórias e morte celular por OMVs de <i>C. violaceum</i> selvagem e do mutante $\Delta dsbA$	95
Figura 25 - DsbA é requerida para o estabelecimento da infecção de <i>C. violaceum</i>	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho.....	30
Tabela 2 - Oligonucleotídeos utilizados nesse trabalho.....	32
Tabela 3 - Plasmídeos utilizados nesse trabalho.....	35
Tabela 4 - MICs da violaceína e de OMVs contendo violaceína para as linhagens bacterianas indicadas.....	52
Tabela 5 - Lista das proteínas mais abundantes nas OMVs da linhagem mutante $\Delta yrbE$ em relação as OMVs da linhagem selvagem.....	69
Tabela 6 - Lista das proteínas menos abundantes nas OMVs da linhagem mutante $\Delta yrbE$ em relação as OMVs da linhagem selvagem.....	70
Tabela 7 - Proteínas identificadas por LC-MS/MS como possíveis alvo de DsbA de <i>C. violaceum</i>	85
Tabela 8 - Lista das proteínas mais abundantes nas OMVs da linhagem mutante $\Delta dsbA$ em relação as OMVs da linhagem selvagem.....	89
Tabela 9 - Lista das proteínas menos abundantes nas OMVs da linhagem mutante $\Delta dsbA$ em relação as OMVs da linhagem selvagem.....	91

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Vesículas de membrana externa de bactérias Gram-negativas.....	19
1.2 Modelos propostos para biogênese de OMVs.....	19
1.3 Regulação da produção de OMVs e seleção das suas cargas	20
1.4 Papel de OMVs na fisiologia e virulência bacteriana	22
1.5 <i>Chromobacterium violaceum</i>	25
2. OBJETIVOS	29
2.1 Construção de linhagens mutantes hipervesiculares.	29
2.2 Identificação da composição proteica de OMVs por análise proteômica.....	29
2.3 Caracterização fenotípica de OMVs de <i>C. violaceum</i> durante a interação bactéria-bactéria e bactéria-hospedeiro.	29
2.4 Caracterização fenotípica das linhagens mutantes por ensaios de virulência em camundongos para identificação de possíveis mecanismos de patogenicidade.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Linhagens e condições de cultivo	30
3.2 Construção de linhagens mutantes e complementadas de <i>C. violaceum</i>	31
3.3 Ensaio de viabilidade.....	36
3.4 Curvas de crescimento	36
3.5 Formação de biofilme	36
3.6 Ensaio de motilidade.....	37
3.7 Determinação de proteases e hemolisinas em OMVs	37
3.8 Concentração inibitória mínima (MIC)	37
3.9 Ensaios de competição	38
3.10 Purificação e quantificação de OMVs	38
3.11 Estimulação da liberação de OMVs em <i>E. coli</i>	39
3.12 Purificação e quantificação de violaceína	40
3.13 RT-PCR.....	40
3.14 Ensaio da quantificação da atividade de β -galactosidase	41
3.15 Microscopia eletrônica de transmissão e varredura.....	41
3.16 Co-purificação dos substratos de DsbA	41
3.17 Análises proteômicas por LC-MS/MS	42
3.18 Ensaio de virulência.....	43
3.19 Produção de anticorpo policlonal contra OMVs.....	44
3.20 Cultura de células, quantificação de citotoxicidade celular e ensaio de invasão.....	44
3.21 Quantificação de citocinas.....	45

3. 22 Entrega de efetor do T3SS por quantificação de cAMP.....	46
4. RESULTADOS	47
4.1 A produção de OMVs por <i>C. violaceum</i> muda de acordo com a fase de crescimento ..	47
4.2 As OMVs de <i>C. violaceum</i> transportam violaceína e medeiam sua atividade antimicrobiana <i>in vivo</i>	49
4.3 A violaceína induz a liberação de OMVs para sua própria secreção	55
4.4 O conservado sistema de transporte ABC VacJ/Yrb controla a biogênese de OMVs em <i>C. violaceum</i>	58
4.5 O sistema de <i>quorum sensing</i> Cvil/CviR ajusta a taxa de liberação de vesículas ao regular a biossíntese de violaceína e o sistema VacJ/Yrb.....	60
4.6 Os mutantes do sistema VacJ/Yrb, $\Delta vacJ$ e $\Delta yrbE$, apresentam desempenho regular em condições padrão de cultivo.....	63
4.7 Os genes <i>vacJ</i> e <i>yrbE</i> promovem resistência a estresses que atuam no envelope celular	65
4.8 Análise quantitativa do perfil proteômico de OMVs de <i>C. violaceum</i> selvagem e do mutante $\Delta yrbE$ indica diminuição na diversidade de proteínas secretadas	67
4.9 As OMVs de <i>C. violaceum</i> selvagem e dos mutantes $\Delta vacJ$ e $\Delta yrbE$ induzem secreção de citocinas pró-inflamatórias e citotoxicidade.....	73
4.10 O sistema de transporte ABC VacJ/Yrb contribui para invasão celular e virulência de <i>C. violaceum</i> em modelo murino	75
4.11 DsbA de <i>C. violaceum</i> apresenta o motivo conservado C ⁵¹ XXC ⁵⁴ e é importante para a homeostase do envelope celular	78
4.12 Mutação em DsbA aumenta a produção de OMVs de maneira independente do sistema de transporte ABC VacJ/Yrb	81
4.13 Identificação de alvos diretos de DsbA revela proteínas importantes para a fisiologia de <i>C. violaceum</i>	83
4.14 O mutante $\Delta dsbA$ apresenta acúmulo de proteínas de membrana externa em OMVs	87
4.15 As OMVs do mutante $\Delta dsbA$ induzem resposta pró-inflamatória normal e aumentada citotoxicidade em macrófagos	94
4.16 DsbA é importante para o estabelecimento da infecção de <i>C. violaceum</i> em modelo murino	96
5. DISCUSSÃO	98
6. CONCLUSÃO	104
7. REFERÊNCIAS	105
8. APÊNCICE.....	118

1. INTRODUÇÃO

1.1 Vesículas de membrana externa de bactérias Gram-negativas

Embora originalmente associada a eucariotos, a liberação de vesículas de membrana é um mecanismo presente em todos os domínios da vida (*Eukarya*, *Archaea* e *Bacteria*), sendo uma estratégia eficiente para secreção de material insolúvel junto com moléculas solúveis distintas (KULP; KUEHN, 2010) (DEATHERAGEA; COOKSONA, 2012). As vesículas de membrana externa (OMVs – do inglês, *Outer Membrane Vesicles*) são porções geralmente esféricas com 20-300 nm de diâmetro da membrana externa de bactérias Gram-negativas liberadas de modo deliberado e controlado para o meio extracelular (BEVERIDGE, 1999) (HAURAT; ELHENAWY; FELDMAN, 2015). Dado sua origem a partir da membrana externa, as OMVs são constituídas majoritariamente por lipopolissacarídeos (LPS), fosfolipídios e proteínas de membrana externa (OMPs), além de conteúdo solúvel do periplasma. Embora ainda não se saiba como, o conteúdo das OMVs também pode incluir proteínas da membrana plasmática e do citosol, ácidos nucleicos (DNA e RNA) e pequenas moléculas (LEE et al., 2008) (SCHWECHHEIMER; KUEHN, 2015) (JAN, 2017). Nos tópicos abaixo abordaremos aspectos relacionados a biogênese das OMVs, conteúdo e seleção da carga das OMVs, bem como seus múltiplos papéis biológicos e seu potencial para uso biotecnológico.

1.2 Modelos propostos para biogênese de OMVs

Apesar das OMVs terem sido descobertas há mais de 50 anos atrás, em estudos com sobrenadante de culturas de *Escherichia coli* (BISHOP; WORK, 1965) (KNOX; VESK; WORK, 1966), apenas recentemente surgiram modelos de biogênese dessas nanoestruturas baseados em estudos com mutantes, e pouco ainda se sabe sobre os mecanismos regulatórios de sua formação e liberação (SCHWECHHEIMER; KUEHN, 2015) (HAURAT; ELHENAWY; FELDMAN, 2015) (JAN, 2017). No processo de vesiculação, à princípio a membrana externa precisa ser desligada da camada de peptidoglicano (CPG) para que as OMVs possam brotar por fissão e serem liberadas da superfície da célula sem afetar

sua viabilidade. Sendo assim, uma das propostas é que as OMVs são formadas em regiões nas quais ocorre um enfraquecimento da interação da membrana externa com a CPG. De fato, linhagens mutantes em genes que codificam elementos importantes nesta ligação cruzada (lipoproteínas e OMPs) apresentam fenótipo de hipervesiculação, tais como mutantes *ompA*, *lpp* e *nlpI* (SCHWECHHEIMER; KUEHN, 2015).

Um segundo modelo, baseado em estudos com OMVs de *Pseudomonas aeruginosa*, propõe que mudanças de repulsão de carga decorrentes do acúmulo de LPS ou da molécula hidrofóbica de *quorum sensing* PQS (2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona), causam a formação de microdomínios e curvatura na membrana externa, levando a formação de OMVs (HAURAT; ELHENAWY; FELDMAN, 2015) (JAN, 2017). Um terceiro modelo propõe que OMVs são formadas por pressão de turgor quando acumulam-se componentes defeituosos do envelope (proteínas mal enoveladas, fragmentos da CPG), formando nanoterritórios e liberação deste material em OMVs (SCHWECHHEIMER; KUEHN, 2015). No entanto, mais recentemente, foi descrito um mecanismo inédito quanto à biogênese de OMVs que se propõe mais geral e passível de ser regulado (ROIER et al., 2016). Foi demonstrado em *Haemophilus influenzae* e *Vibrio cholerae* que o sistema de transporte ABC VacJ/Yrb, amplamente distribuído em bactérias Gram-negativas filogeneticamente distantes, está envolvido na formação de OMVs por modular a correta distribuição de fosfolipídios (Fig. 1 a), de modo que na ausência de algum componente desse sistema, há um acúmulo de fosfolipídios no folheto externo da membrana externa, o qual culmina em um aumento na produção de OMVs (Fig. 1 b).

1.3 Regulação da produção de OMVs e seleção das suas cargas

Uma das mais fortes evidências de que as OMVs são formadas de modo controlado e não aleatório foi a demonstração de que a composição de lipídeos e proteínas das OMVs difere daquela da membrana externa, com componentes sendo incluídos ou excluídos de modo seletivo. No entanto, como este empacotamento seletivo é feito ainda não está claro, havendo modelos que propõem um papel do LPS ou de um hipotético fator de seleção da carga (SCHWECHHEIMER; KUEHN, 2015) (ROIER et al., 2016).

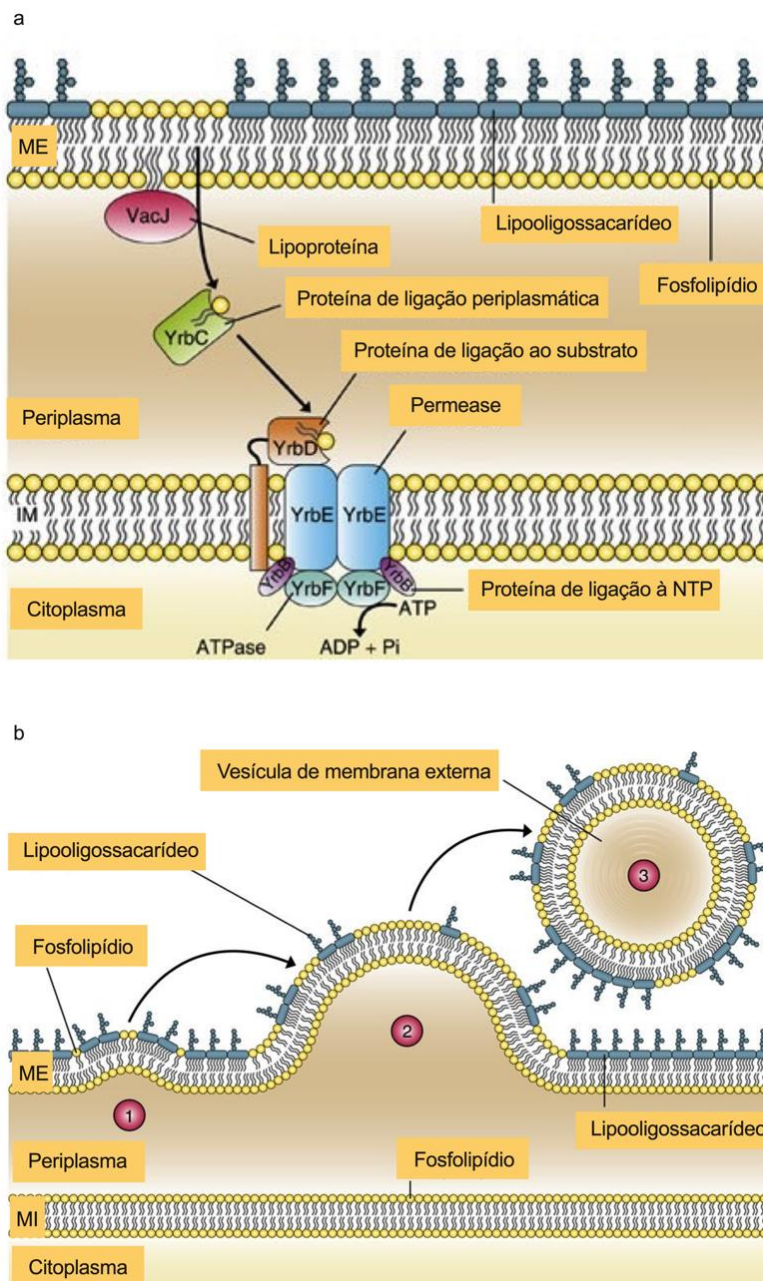


Figura 1. Modelo conservado de biogênese de vesículas de membrana externa. (a)

As proteínas VacJ/Yrb são homólogas aos membros da via Mla de *E. coli*, cuja função é manter a assimetria de lipídios na membrana externa (ME) de bactérias Gram-negativas através do tráfego retrógrado de fosfolipídios da ME para a membrana interna (MI). Este modelo é derivado do modelo proposto para a via Mla de *E. coli* por Malinverni e Silhavy, 2009. **(b)** 1 – A diminuição na expressão ou deleção dos genes *vacJ* ou *yrb* resulta no acúmulo de fosfolipídios no folheto externo da membrana externa, o que causa uma diminuição na assimetria e expansão da ME. 2 – O contínuo enriquecimento de fosfolipídios na ME leva a curvatura de ambos os folhetos, que finalmente se desligam da célula, formando uma OMV. 3 – Liberação de OMV enriquecida com fosfolipídios em ambos os folhetos. Modificado de Roier et al., 2016.

Uma via importante para o correto dobramento e estabilidade de proteínas presentes no espaço periplasmático e na membrana externa de bactérias Gram-negativas é a formação de pontes dissulfeto em um mecanismo chamado dobramento de proteínas oxidativo. O protótipo desta maquinaria é o sistema DsbAB de *E. coli*. A enzima DsbA é uma tiol-dissulfeto oxidoreductase com dobramento do tipo tiorredoxina que catalisa a formação de pontes dissulfeto entre pares de cisteínas em proteínas substrato. Já DsbB atua reoxidando DsbA para sua forma ativa (LANDETA; BOYD; BECKWITH, 2018). Embora mutações em proteínas Dsb pareçam afetar o processo de vesiculação (ROIER et al., 2016), ainda não foi investigado como este processo ocorre.

A quantidade e o conteúdo das OMVs são controlados por fatores ambientais, tais como temperatura, oxigênio, fase de crescimento, composição do meio de cultura, mudança de estilo planctônico para biofilme, exposição a antibióticos, dentre outros, indicando que devem existir mecanismos finamente regulados e influenciados pelas condições ambientais quanto à seleção da carga das OMVs (RIVERA; KUEHN, 2016). Por exemplo, foi demonstrado em *Salmonella enterica* serovar Typhimurium que, dependendo das condições de cultivo, a quantidade e conteúdo da carga de OMVs são variáveis (BAI; KIM; RYU, 2014). Uma caracterização proteômica de OMVs dessa bactéria revelou que OMVs de células cultivadas em meio de cultura padrão de laboratório são basicamente constituídas por componentes do metabolismo basal, enquanto que OMVs de células cultivadas em um meio que mimetiza o ambiente intracelular do hospedeiro são compostas além de outras proteínas, por fatores de virulência, os quais são translocados na célula hospedeira (BAI; KIM; RYU, 2014). Este papel das OMVs como um sistema para entrega de diversos fatores de virulência, sobretudo toxinas bacterianas, tem sido bem documentado, e recentemente foi proposto que as OMVs seriam o sistema de secreção tipo zero (GUERRERO-MANDUJANO et al., 2017) (JAN, 2017).

1.4 Papel de OMVs na fisiologia e virulência bacteriana

Funcionalmente, as OMVs desempenham diversos papéis fundamentais, seja na manutenção da fisiologia bacteriana (resposta a estresse), em patogênese (entrega de toxinas e outros fatores de virulência em células do

hospedeiro, imunomodulação) ou ainda em interações ecológicas envolvendo bactérias (formação de biofilme, homeostase da microbiota, aquisição de nutrientes em comunidades bacterianas) (SCHWECHHEIMER; KUEHN, 2015) (ROIER et al., 2016) (JAN, 2017).

Uma das funções melhor descritas das OMVs é a de atuar como uma resposta a estresse do envelope, sendo o aumento na produção de OMVs desencadeado sob várias condições de estresse como uma estratégia para proteção à produtos tóxicos que acumulam-se no periplasma (RIVERA; KUEHN, 2016). De fato, proteínas mal enoveladas e não reparadas devido a mutações no fator σ^E de *E. coli*, por exemplo, são exportadas por OMVs para o ambiente extracelular (MCBROOM; KUEHN, 2007). Também em *P. aeruginosa*, foi observada correlação entre maior produção de vesículas e estresse. Esta bactéria produz mais vesículas quando exposta a concentrações subinibitórias de antibióticos e toxinas cujo mecanismo de ação é na parede celular, assim como quando submetida à exposição de agentes que geram espécies reativas de oxigênio (MAREDA et al., 2012) (MACDONALD; KUEHN, 2013).

Recentemente, uma série de artigos tem demonstrado um papel importante das OMVs na aquisição de nutrientes, tanto de micronutrientes como ferro e zinco, quanto de moléculas complexas usadas como fontes de carbono e nitrogênio (SCHWECHHEIMER; KUEHN, 2015) (ROIER et al., 2016). Em alguns patógenos, a privação de ferro provoca um aumento na produção de OMVs enriquecidas com sistemas de captação de ferro (sideróforos e seus transportadores), os quais são necessários para a bactéria adquirir este metal essencial do hospedeiro (PRADOS-ROSALES et al., 2014) (ROIER et al., 2016) (LIN et al., 2017). A importância de OMVs na captação de ferro deve também refletir na mudança de um estilo de vida planctônico para biofilme, já que além deste íon ser crucial na correta organização do biofilme, foram encontradas várias proteínas relacionadas à aquisição de ferro em OMVs de biofilme de *P. aeruginosa* (SINGH et al., 2002) (TOYOFUKU et al., 2012) (RIVERA; KUEHN, 2016). Com relação aos macronutrientes, foi demonstrado que vesículas da cianobactéria *Prochlorococcus* são abundantes em ecossistemas marinhos e parecem ter papel importante no fluxo de carbono (BILLER et al., 2014). Além disto, estudos com bactérias do gênero *Bacteroides* (componentes importantes da microbiota intestinal humana) indicam a produção de OMVs enriquecidas com

enzimas hidrolases de polissacarídeos, as quais atuam como “bens públicos” a serem utilizados por outros membros da microbiota (ELHENAWY; DEBELYY; FELDMAN, 2014) (RAKOFF-NAHOUM; COYNE; COMSTOCK, 2014), indicando a importância das OMVs no processamento de nutrientes no intestino humano.

Com relação à patogenicidade, as OMVs representam uma via de secreção vantajosa para as bactérias, pois como possuem características biofísicas semelhantes ao perfil do envelope celular, podem facilmente entrar na célula hospedeira e liberar fatores de virulência e toxinas que modulam a resposta imune inata do hospedeiro, mesmo que a célula-alvo esteja longe do sítio de colonização (BOMBERGER et al., 2009) (GUERRERO-MANDUJANO et al., 2017). De fato, diversas toxinas bacterianas, tais como as toxinas Shiga, LT, VacA, Cif e ClyA, tem sido descritas como carga de OMVs (JAN, 2017). Além deste papel mais direto de entrega de fatores de virulência, as OMVs contribuem para patogênese bacteriana de outras formas como, por exemplo, favorecendo a disseminação de determinantes de resistência a antibióticos (SCHWECHHEIMER; KUEHN, 2015).

Ainda sobre a interação entre bactérias e seus hospedeiros, as OMVs medeiam a comunicação tanto em um contexto patogênico quanto simbiótico, ou seja, podem induzir ou atenuar a resposta inflamatória (KAPARAKIS-LIASKOS; FERRERO, 2015). Os MAMPs (do inglês – *Microbe Associated Molecular Patterns*) como peptidoglicano e LPS associados à OMVs induzem a ativação da via canônica de NF- κ B e da via não-canônica de ativação do inflamassoma (caspase-11), estimulando a secreção de citocinas e piroptose, um tipo de morte celular programada que induz robusta resposta inflamatória (BONHAM; KAGAN, 2014) (VANAJA et al., 2016) (JORGENSEN; RAYAMAJHI; MIAO, 2017). Por outro lado, OMVs de bactérias não patogênicas, como as associadas à microbiota, atuam de modo contrário. Em um estudo recente, foi demonstrado que OMVs de *Bacteroides vulgatus*, uma bactéria residente do intestino, atravessam a camada espessa de muco do epitélio intestinal e interagem com células dendríticas do sistema imune, prevenindo a total ativação dessas células e dessa forma inibindo a inflamação (MAERZ et al., 2017).

Devido às propriedades físico-químicas e funcionais mencionadas, cresce cada vez mais o interesse na aplicação biotecnológica de OMVs. Um dos propósitos para OMVs é utilizá-las como uma ferramenta no tratamento de

doenças como o câncer, por exemplo. O remodelamento de MAMPs associados à membrana externa, assim como a adição de moléculas sinalizadoras e drogas em OMVs, permitiu o direcionamento e liberação da carga dessas nanovesículas modificadas a células tumorais de maneira célula-específica, levando a regressão de tumores (GUJRATI et al., 2014). Além disso, uma outra aplicação atrativa para OMVs é empregá-las como uma opção alternativa na prevenção de doenças infecciosas, estabelecendo-as como uma plataforma mais rápida e barata no desenvolvimento de vacinas, já que possuem características como grande variação de antígenos na superfície, alta imunogenicidade, assim como fácil reconhecimento por células do sistema imune (ACEVEDO et al., 2014) (POL; STORK; LEY, 2016) (PRICE et al., 2016).

1.5 *Chromobacterium violaceum*

A *Chromobacterium violaceum* é uma β -proteobactéria da família *Neisseriaceae* em forma de bastonete Gram-negativo, anaeróbio facultativo e de vida livre. É um microrganismo ambiental de solo e água ubíquo, embora sua maior prevalência ocorra em regiões tropicais e subtropicais (LIMA-BITTENCOURT et al., 2007). Assim como outras espécies do gênero, *C. violaceum* produz um pigmento roxo denominado violaceína, um metabólito secundário hidrofóbico de grande interesse biotecnológico, devido a suas propriedades antiparasitárias, antibacterianas, antivirais e anticâncer (DURÁN et al., 2016). Em *C. violaceum*, a síntese da violaceína é regulada por um sistema de *quorum sensing* baseado em moléculas de acil-homoserina lactona (AHL) (MCCLEAN et al., 1997). Neste sistema, a produção de AHLs é feita pela sintase Cvil e percebida pelo receptor CviR. Uma vez que o CviR se liga a AHLs, este regulador induz a transcrição do operon *vioABCDE*, o qual codifica enzimas para a produção de violaceína (STAUFF; BASSLER, 2011) (DURÁN et al., 2016) (Fig. 2). O *quorum sensing* de *C. violaceum* é também importante para a competição desta bactéria, pois esse sistema aumenta a transcrição da bomba de efluxo CdeAB-OprM, a qual protege *C. violaceum* contra a bactobolina, um antibiótico secretado por *Burkholderia thailandensis* (EVANS, et al., 2018).

O potencial biotecnológico de *C. violaceum*, aliado ao fato desta bactéria ser um patógeno oportunista de humanos, estimulou o interesse para o

sequenciamento completo do seu genoma. Os dados do genoma forneceram subsídios para explicar a grande versatilidade dessa bactéria, ao identificar uma grande proporção de genes relacionados a vias de transdução de sinais e vários sistemas de secreção (T1SS, T2SS, T3SS, T5SS e T6SS) (VASCONCELOS et al., 2003). Dentre os sistemas de secreção preditos, apenas o sistema de secreção do tipo 3 (T3SS) foi caracterizado quanto à virulência até o momento. *C. violaceum* tem duas maquinarias T3SS, cujos genes estão localizados em duas ilhas de patogenicidade, Cpi1/1a e Cpi2 (BETTS; CHAUDHURI; PALLEN, 2004) (BATISTA; DA SILVA NETO, 2017). A Cpi1/1a, mas não a Cpi2, é o determinante majoritário para a virulência de *C. violaceum*, pois mutantes em genes da ilha Cpi1/1a, como *cilA*, *copE* e *civC*, são bastante atenuados em virulência (MIKI et al., 2010) (MIKI et al., 2011). Determinantes de virulência recentemente descritos por nosso grupo em *C. violaceum* incluem os fatores de transcrição OhrR e Fur e sideróforos do tipo catecolato (PREVIATO-MELLO et al., 2017) (BATISTA et al., 2019) (SANTOS et al., 2020).

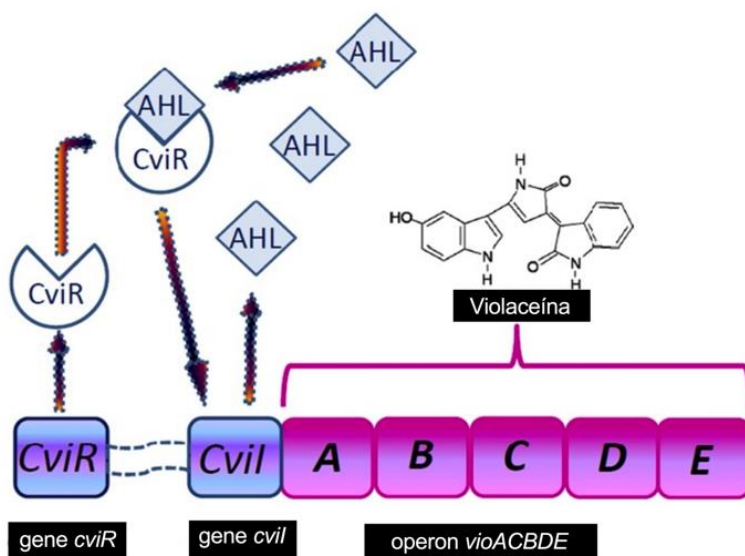


Figura 2. Regulação do operon *vioABCDE* pelo sistema de *quorum sensing* *CviI/CviR* de *C. violaceum*. Uma vez ligado a AHL, CviR ativa *cvil* e o operon *vioABCDE*, dentre outros genes. Modificado de DURÁN et al, 2016.

Os casos de infecção por *C. violaceum* são raros, embora as taxas de fatalidade sejam altas (53% de mortalidade), muitas vezes devido à demora no tratamento e a alta resistência desta bactéria a antibióticos (ANNAPURNA et al.,

1979) (DURÁN; MENCK, 2001) (YANG; LI, 2011). Acredita-se que a principal porta de entrada de *C. violaceum* sejam feridas ou tramas quando expostos a solo e água contaminada (PONTE; JENKINS, 1992). A doença começa com lesões na pele e progride rapidamente para sepse com abscesso metastático de órgãos vitais como fígado, pulmões e baço (DURÁN; MENCK, 2001) (SIRINAVIN et al., 2005) (YANG; LI, 2011). Embora muito virulenta, a infecção por *C. violaceum* é controlada em camundongos saudáveis pelo inflamassoma de NLRC4 (*Nod-like receptor domain-containing protein 4*), o qual ativa caspase-1 e desencadeia a piroptose. A eliminação do nicho intracelular da bactéria promovida pela piroptose recruta neutrófilos até o sítio de infecção, com consequente eliminação da bactéria (MALTEZ et al., 2015) (Fig. 3). Como camundongos deficientes do inflamassoma de NLRC4 são altamente susceptíveis à infecção por *C. violaceum* em uma dose muito baixa, surgiu a hipótese de que inflamassomas evoluíram como um mecanismo de defesa contra bactérias virulentas e ambientais aparentemente desprovidas de mecanismos de evasão, ou seja, que não co-evoluíram com um hospedeiro vertebrado, como é o caso de *C. violaceum* (MALTEZ; MIAO, 2016).

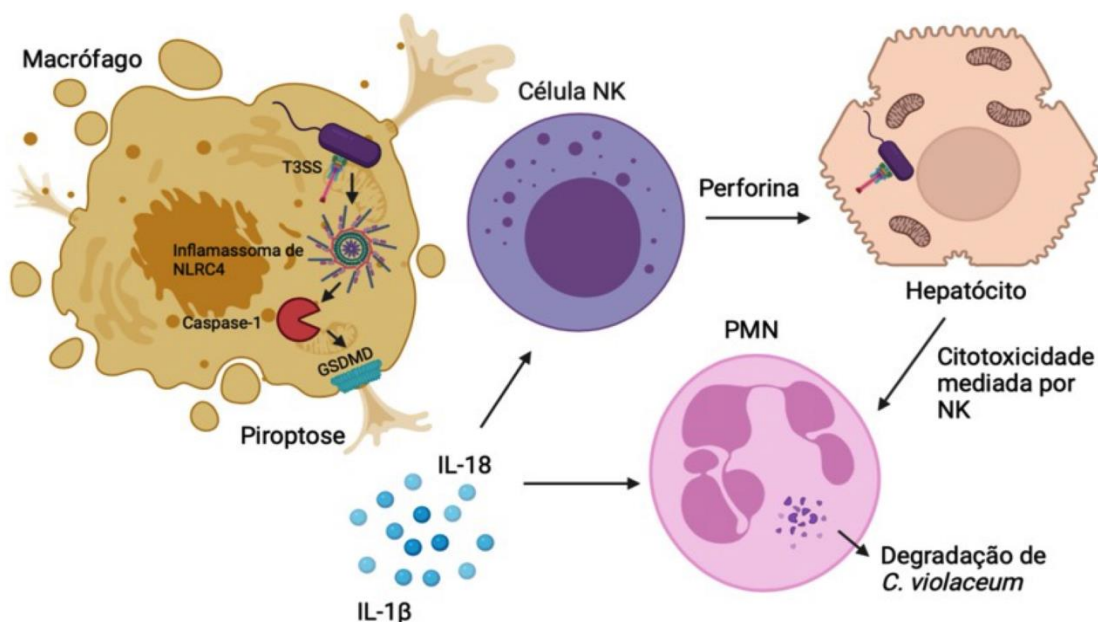


Figura 3. Modelo de resolução da infecção de *C. violaceum* pelo sistema imune inato. *C. violaceum* utiliza o T3SS para invadir e se estabelecer em células fagocíticas, como macrófagos, e células epiteliais, como hepatócitos. No entanto, o inflamassoma de NAIP-NLRC4 reconhece a proteína da agulha Cpr1 do T3SS de *C. violaceum* e leva

à ativação de caspase-1, seguido da clivagem de gasdermina-D (GSDMS) e das proformas das citocinas IL1- β e IL-18. GSDMS clivada se oligomeriza, formando um poro na membrana e desencadeando a secreção de IL1- β , IL-18 e por fim, a piroptose. Então, ocorre o recrutamento de células PMN (neutrófilos) para a resolução da infecção. Além disso, IL-18 induz secreção de perforina por células NK, levando à formação de poros em hepatócitos e consequente exposição do patógeno a células PMN. Adaptado de MALTEZ, et al., 2015.

Assim como diversos outros patógenos oportunistas, *C. violaceum* está submetida a constantes pressões seletivas e é capaz de responder e sobreviver a uma grande variedade de desafios, presentes na forma de estresses ambientais ou do hospedeiro. Já é bem estabelecido na biologia de bactérias que mudanças ambientais afetam a expressão gênica, o metabolismo e a composição celular, permitindo adaptação ao novo ambiente. De fato, há um extenso material na literatura sobre como bactérias de diferentes nichos como as patogênicas, comensais e ambientais dispõem de dispositivos que promovem adaptação. Contudo, a maioria desses estudos concentram-se em decifrar os mecanismos de transdução de sinais, como o amplamente distribuído sistema de dois componentes, e os sistemas de secreção tradicionais, como o T3SS.

No entanto, devido a atribuições anteriormente mencionadas e ao interesse emergente em compreender OMVs, podemos encontrar trabalhos que indicam que mudanças ambientais também afetam a vesiculação, assim como a composição e funções de OMVs, além de indicar um papel relevante de OMVs em interações ecológicas e patogênicas (MANNING; KUEHN, 2013) (SCHWECHHEIMER; KUEHN, 2015) (RIVERA; KUEHN, 2016). Dessa forma, considerando que *C. violaceum* apresenta ampla plasticidade fenotípica, podendo tanto viver em águas, solos, assim como no citosol de uma célula eucariótica, e que o papel geral de OMVs é promover adaptação, nós hipotetizamos que o estudo de OMVs em *C. violaceum* poderia fornecer uma nova abordagem quanto ao papel de vesículas de membrana na fisiologia, interação inter-espécies e patogenicidade de bactérias.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi caracterizar mecanismos de biogênese de vesículas de membrana externa, bem como seu papel na fisiologia, interação interbacteriana e patogenicidade de *Chromobacterium violaceum*. Para tanto, foram utilizadas as seguintes estratégias:

2.1 Construção de linhagens mutantes hipervesiculares.

2.2 Identificação da composição proteica de OMVs por análise proteômica.

2.3 Caracterização fenotípica de OMVs de *C. violaceum* durante a interação bactéria-bactéria e bactéria-hospedeiro.

2.4 Caracterização fenotípica das linhagens mutantes por ensaios de virulência em camundongos para identificação de possíveis mecanismos de patogenicidade.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagens e condições de cultivo

As linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho estão listadas na tabela 1. A linhagem selvagem utilizada foi a *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472. Para os procedimentos de clonagem e conjugação foram utilizadas as linhagens de *E. coli* DH5 α (HANAHAN, 1983) e S17-1 (SIMON; PRIEFER; PÜHLER, 1983), respectivamente. As linhagens de *C. violaceum* e de *E. coli* foram cultivadas a 37 °C, em meio Luria-Bertani (LB) ou M9 (AUSUBEL et al., 1992) suplementado com 0,1% de hidrolisado de caseína, com adição dos antibióticos ampicilina 100 μ g/ml, canamicina 50 μ g/ml e tetraciclina 12 μ g/ml, quando necessários. Os métodos de clonagem como digestão, ligação, transformação e extração de DNA, foram realizados como previamente descrito por AUSUBEL et al., 1992. Os oligonucleotídeos empregados nesse trabalho estão indicados na tabela 2 e os plasmídeos estão indicados na tabela 3.

Tabela 1 - Linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho.

Linhagem	Descrição	Referência
<i>Escherichia coli</i>		
S17-1	Utilizada para conjugação.	(SIMON; PRIEFER; PÜHLER, 1983)
DH5 α	Utilizada para clonagem.	(HANAHAN, 1983)
<i>Chromobacterium violaceum</i>		
ATCC 12472	Linhagem selvagem com genoma sequenciado.	(VASCONCELOS et al., 2003)
$\Delta vacJ$	Linhagem selvagem com o gene CV_0444 deletado.	Este trabalho
$\Delta yrbE$	Linhagem selvagem com o gene CV_0448 deletado.	Este trabalho
$\Delta yrbFEDCB/vacJ$	Linhagem selvagem com os genes CV_0444/0445/0446/0447/0448/0449 deletados.	Este trabalho
$\Delta dsbA$	Linhagem selvagem com o gene CV_3998 deletado.	Este trabalho
$\Delta cvil$	Linhagem selvagem com o gene CV_4091 deletado.	Este trabalho

$\Delta cviR$	Linhagem selvagem com o gene CV_4090 deletado.	Juliana A. Diniz
$\Delta vioABCDE$	Linhagem selvagem com os genes CV_3274/3273/3272/3271/3270 deletados.	Fernanda C. Leal
$\Delta cilA$	Linhagem selvagem com o gene CV_2640 deletado.	Miao Lab
$\Delta vacJ[vacJ]$	Mutante $\Delta vacJ$ complementado	Este trabalho
$\Delta yrbE[yrbE]$	Mutante $\Delta yrbE$ complementado	Este trabalho
$\Delta dsbA[dsbA]$	Mutante $\Delta dsbA$ complementado	Este trabalho
$\Delta dsbA[His-dsbA]$	Mutante $\Delta dsbA$ com His- <i>dsbA</i>	Este trabalho
$\Delta dsbA[His-dsbA^{C54S}]$	Mutante $\Delta dsbA$ com His- <i>dsbA</i> ^{C54S}	Este trabalho
Bactérias utilizadas em ensaios com violaceína e OMVs		
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Linhagem selvagem com genoma sequenciado.	MINOGUE et al., 2014
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	Linhagem selvagem com genoma sequenciado.	SONI et al., 2015
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	Linhagem selvagem com genoma sequenciado.	GREISEN et al., 1994
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	Linhagem selvagem com genoma sequenciado.	MACLEA et al., 2017

3.2 Construção de linhagens mutantes e complementadas de *C. violaceum*

Para avaliar o papel do sistema VacJ/Yrb, da proteína DsbA, da violaceína e do sistema de *quorum sensing* Cvil/CviR na vesiculação de *C. violaceum*, foram construídas linhagens mutantes nulas não polares, com a deleção em fase da região codificadora de genes ou operons específicos, por meio de troca alélica (Tabela 1). Para obter estes mutantes, dois fragmentos de aproximadamente 600 pb das regiões adjacentes aos genes que foram deletados, foram amplificados por PCR utilizando a DNA polimerase de alta fidelidade Phusion (Thermo Scientific) e óligos específicos contendo sítios de clivagem para enzimas de restrição (Tabela 2). Após a amplificação, os fragmentos foram digeridos pelas respectivas enzimas de restrição, clonados no vetor suicida pNPTS138 e sequenciados (Tabela 3). Após introdução em *C. violaceum* via conjugação, estas construções inseriram no genoma por meio de recombinação

homóloga. A seleção de linhagens da primeira recombinação foi realizada através da resistência à canamicina. Os mutantes foram selecionados pela resistência à sacarose (LB contendo 12% de sacarose) (segunda recombinação). Estas etapas de primeira e segunda recombinação foram confirmados por PCR (DA SILVA NETO; NEGRETTO; NETTO, 2012).

Para a complementação das linhagens mutantes, os genes *vacJ*, *yrbE* e *dsbA* foram amplificados por PCR com óligos específicos (Tabela 2) e clonados no vetor replicativo pMR20 (Tabela 3). Os clones resultantes foram confirmados por PCR e inseridos nos respectivos mutantes via conjugação com *E. coli* S17-1. O mutante $\Delta dsbA$ também foi complementado com duas versões de DsbA fusionadas com tag de histidina na porção carboxi-terminal, através da geração das linhagens $\Delta dsbA$ [His-*dsbA*] e $\Delta dsbA$ [His-*dsbA*^{C54S}]. Para isto, o gene *dsbA* foi amplificado por PCR já com a sequência que codifica a tag de histidina e clonado no vetor pGEM-T Easy. Esta construção foi utilizada como molde para o PCR com os óligos de mutagênese listados na tabela 2, utilizando o kit QuickChange Lightning site-directed mutagenesis para troca da cisteína 54 por uma serina (Agilent Technologies). Tanto o inserto para His-*dsbA* quanto o inserto para His-*dsbA*^{C54S} foram removidos por digestão do pGEM-T Easy e subclonados no vetor replicativo pMR20. As construções pMR20[His-*dsbA*] e pMR20[His-*dsbA*^{C54S}] foram introduzidas na linhagem $\Delta dsbA$ via conjugação. A mutação sítio-dirigida foi confirmada pelo sequenciamento do DNA. As linhagens confirmadas como mutantes e as respectivas complementações foram armazenadas a - 80 °C em 20% de glicerol (Tabela 1).

Tabela 2 – Oligonucleotídeos utilizados nesse trabalho.

Oligonucleotídeo	Sequência (5'→3') ^a	Descrição
Construção de linhagens mutantes (clonagem no pNPTS138)		
CV0444del1	CCTAGC <u>GGGCC</u> CCCATGACCCGCTTCAAGACC	Fragmento Apal/HindIII com 633 pb da região flaqueadora
CV0444del2	GGCCTAAAGCTT <u>GAGTTT</u> GGCGGGGCGCATG	
CV0444del3	GGCCTAAAGCTT <u>GCGT</u> CGGCCGCGCAATAAG	Fragmento HindIII/BamHI com 706 pb da região flaqueadora
CV0444del4	GGCCTAGGATCCTTCGACGCCGATCCGTTCCGG	

CV0448del1	CCTAGC <u>GGGCC</u> CCATCGCGCGGATGAGCCAAG	Fragmento Apal/HindIII com 662 pb da região flaqueadora
CV0448del2	GGCCTAAAGCTTGGCGTTGACGGTGAGGTGG	
CV0448del3	GGCCTAAAGCTTCTGACCGCTTCATGTTCTAG	Fragmento HindIII/EcoRI com 717 pb da região flaqueadora
CV0448del4	GGCCTAGAATTCTGTGTTTTTGCCGTTGTCTCTGC	
CVoperonABCdel1	CCTAGC <u>GGGCC</u> CCAATCCGACCATCATCGAGG	Fragmento Apal/HindIII com 671 pb da região flaqueadora
CVoperonABCdel2	GGCCTAAAGCTTGGACACGAAAATTCCAAACAGC	
CVoperonABCdel3	GGCCTAAAGCTTGCCTCGGCCGCGCAATAAG	Fragmento HindIII/BamH I com 706 pb da região flaqueadora
CVoperonABCdel4	GGCCTAGGATCCTTCGACGCCGATCCGTTCCGG	
CVoperonViodel1	CCTAGC <u>GGGCC</u> CGGATGGGGAACGATTCCGGC	Fragmento Apal/HindIII com 646 pb da região flaqueadora
CVoperonViodel2	GGCCTAAAGCTTCTGGCTGTAATGCTGCATCGC	
CVoperonViodel3	CCTAGCAAGCTTAGGATGGTGACCGGGGACGA	Fragmento HindIII/EcoRI com 677 pb da região flaqueadora
CVoperonViodel4	GGCCTAGAATTCCCCTACGGCTGGTGGTATGC	
CV4090-del1	GGCCTAGGATCCGGCAAACCGTGGGATCGTTC	Fragmento BamHI/HindIII com 689 pb da região flaqueadora
CV4090-del2	GGCCTAAAGCTTGAGCGGTCTTGCATTGATGGG	
CV4090-del3	GGCCTAAAGCTTGCCAATGTGATCCGCAAGCTC	Fragmento HindIII/ApaI com 657 pb da região flaqueadora
CV4090-del4	CCTAGC <u>GGGCC</u> CCGCTGCAACAAGGTGGACTG	
CV4091-del1	CCTAGC <u>GGGCC</u> CCAGCAGCTGGCTGCATTGCG	Fragmento Apal/HindIII com 743 pb da região flaqueadora
CV4091-del2	GGCCTAAAGCTTCAGTCCACCTTGTTCAGCG	
CV4091-del3	GGCCTAAAGCTTAGGCAGGCGAAAACCGAGC	Fragmento HindIII/BamH I com 650 pb
CV4091-del4	GGCCTAGGATCCCATTCTGGTATTGGGACGCC	

		da região flanqueadora
CV3998-del1	GGCCTAAAGCTTAAACGAGCGCAAGGCCGAAAC	Fragmento HindIII/BamHI I com 646 pb da região flanqueadora
CV3998-del2	GGCCTAGGATCCGCCGCTGACTGCCAGCATTAC	
CV3998-del3	GGCCTAGGATCCGCCGCCGAAAAGAAATAAGCG	Fragmento BamHI/EcoRI I com 683 pb da região flanqueadora
CV3998-del4	GGCCTAGAATTCAACACAAACATCAACGCCCGG	
Construção de linhagens complementadas (clonagem no pMR20)		
pMR200444Fw	ATCATGAGCTCGCTGACGCTGTCCGGCATC	Fragmento SacI/EcoRI com 999 pb da região codificadora
pMR200444Rv	ATCAT GAATTCGCGGGCATTGGCTCATGGC	
pMR200448Fw	ATCATGAGCTCTGCACTACAATTTCCCGCCG	Fragmento SacI/EcoRI com 915 pb da região codificadora
pMR200448Rv	ATCATGAATTCGATGCCGAGGGCGACAAAG	
pMR203998Fw	ATCATGAGCTCGCAAGACGGCATCAACGCCA	Fragmento SacI/BamHI com 843 pb da região codificadora
pMR203998Rv	ATCATGGATCCACCCCGCGTCAGAGAGGT	
pMR203998Fw	ATCATGAGCTCGCAAGACGGCATCAACGCCA	Fragmento SacI/BamHI com 843 pb da região codificadora
DsbAHis_Tag_Rv	ATTGGATCCTTAGTGATGATGATGATGATGTTTCTT TTCGGCGCGCGCCT	
Construção de linhagens com gene repórter (clonagem no pRK/lacZ290)		
ABCpLac_Fw	GGCCTAGAATTCATCAACGAAGTCTGCGCG	Fragmento EcoRI/HindIII com 402 pb da região promotora
ABCpLac_Rv	GGCCTAAAGCTTTGTCTGTGGACACGAAAATTCC	
ViopLac_Fw	GGCCTAGAATTCGGATGGGGAACGATTCCGGC	Fragmento EcoRI/HindIII com 646 pb da região promotora
ViopLac_Rv	GGCCTAAAGCTTCTGGCTGTAATGCTGCATCGC	
Construção da linhagem por mutação sítio-dirigida		
C54SFw	CTACCACTGCATCCATAGCTATGACGACGATCCGG	Fragmento com mutação da cisteína 54 por uma serina
C54SRv	CCGGATCGTCGTCATAGCTATGGATGCAGTGGTG	
Construção das linhagens com repórter CopE-CyaA		

copE_Fw	<u>GGCCTAGAGCTCGATCGGGCGCATTCCCAATG</u>	Fragmento SacI/KpnI com 1047 pb
copE_Rv	<u>GGCCTAGGTACCGGCTTGCGCCAGCCACGG</u>	
cyaA_kpn1	<u>GGCCTAGGTACCATGCAGCAATCGCATCAGGCT</u>	Fragmento KpnI/BamHI com 1221 pb
cyaA_bamh1	<u>GGCCTAGGATCCTCAGCTGTCATAGCCGGAATC</u>	

^a As letras sublinhadas indicam os sítios de reconhecimento das enzimas de restrição utilizadas para clonagem.

Tabela 3 – Plasmídeos utilizados nesse trabalho.

Plasmídeo	Descrição	Referência
pNPTS138	Vetor suicida, replicon ColE1, <i>oriT</i> , <i>npt</i> (Km ^r), <i>sacB</i>	D. Alley
pNPTCV_0444	pNPTS138 contendo as regiões flaqueadoras do gene CV_0444	Este trabalho
pNPTCV_0448	pNPTS138 contendo as regiões flaqueadoras do gene CV_0448	Este trabalho
pNPTCV_operonABC	pNPTS138 contendo as regiões flaqueadoras dos genes CV_0444 e CV_00449	Este trabalho
pNPTCV_3998	pNPTS138 contendo as regiões flaqueadoras do gene CV_3998	Este trabalho
pNPTCV_4091	pNPTS138 contendo as regiões flaqueadoras do gene CV_4091	Este trabalho
pNPTCV_4090	pNPTS138 contendo as regiões flaqueadoras do gene CV_4090	Juliana A. Diniz
pNPTCV_operonvio	pNPTS138 contendo as regiões flaqueadoras dos genes CV_3274 e CV_3270	Fernanda C. Leal
pMR20	Vetor de expressão; baixa cópia, <i>oriT</i> ; Tc ^r	ROBERTS et al., 1996
pMR20CV_0444	pMR20 com as regiões promotora e codificadora do gene CV_0444	Este trabalho
pMR20CV_0448	pMR20 com as regiões promotora e codificadora do gene CV_0448	Este trabalho
pMR20CV_3998	pMR20 com as regiões promotora e codificadora do gene CV_3998	Este trabalho
pMR20copE _{cyaA}	Vetor com repórter CopE _{CyaA} em <i>Chromobacterium</i>	Este trabalho
pMR20 _{cyaA}	Vetor com repórter CyaA em <i>Chromobacterium</i>	Este trabalho
pRKlacZ290	Vetor com o gene repórter <i>lacZ</i> ; <i>oriT</i> ; Tc ^r	GOBER; SHAPIRO, 1992
pRKlacZ290_operonABC	pRKlacZ290 contendo a região promotora do operon <i>yrbBCDEF/vacJ</i>	Este trabalho
pRKlacZ290_operonvio	pRKlacZ290 contendo a região promotora do operon <i>vioABCDE</i>	Este trabalho
<i>sspH1cyaA</i> ::pWSK29	Vetor com repórter CyaA em <i>Salmonella</i>	Miao Lab
<i>m45cyaA</i> ::pJV450	Vetor usado para amplificar <i>cyaA</i>	Zamboni lab

3.3 Ensaio de viabilidade

A linhagem *C. violaceum* ATCC 12472 e os mutantes foram submetidos ao ensaio de viabilidade em meio LB, com o intuito de quantificar a concentração de UFC/ml apresentada por cada linhagem após diferentes horas de cultivo. O ensaio de viabilidade iniciou-se com um pré-inóculo em meio líquido a 37 °C e 250 rpm, durante aproximadamente 24 horas. A partir dessa cultura, foi realizado o inóculo para uma DO₆₀₀ de 0,01, o qual foi mantido a 37 °C e 250 rpm. Assim, 1 ml da cultura resultante foi centrifugada e ressuspensa em 1 ml de PBS. Em seguida, foram feitas diluições seriadas as quais foram inoculadas em placas LB, utilizando um volume de 10 µl de cada ensaio. As placas foram mantidas a 37 °C por aproximadamente 20h e as colônias resultantes foram quantificadas [UFC/ml = nº de colônias x 1000 µL x diluição] /volume plaqueado]. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.4 Curvas de crescimento

As curvas de crescimento foram realizadas em meio LB ou M9 a partir de culturas de aproximadamente 24 h. Após o inóculo inicial de DO_{600nm} = 0,01, as culturas foram mantidas a 37°C e 250 rpm e alíquotas foram retiradas a cada uma hora para aferir a DO_{600nm}. Para as curvas de crescimento cujo objetivo foi avaliar a integridade do envelope celular, utilizamos os agentes sais biliares 0,5%, SDS/EDTA 0,05%/0,5 mM e Polimixina 200 µg/ml em meio LB.

3.5 Formação de biofilme

As linhagens *C. violaceum* selvagem e o mutante Δ *vioABCDE* foram inoculados em 2 ml de meio LB, a partir da DO_{600nm} = 0,01 em tubos de polipropileno. As culturas foram mantidas a 37° C e 24 h, estaticamente. A formação de biofilme foi avaliada utilizando o método cristal violeta, como descrito por AZEREDO et al., 2017. Resumidamente, após 24 h de cultivo, as células em suspensão foram removidas e as paredes de cada tubo lavadas 3 vezes com água destilada. O biofilme formado foi corado com cristal violeta 0,1%

por 10 minutos e em seguida dissolvido em etanol. As amostras foram diluídas e quantificadas em DO_{600nm} .

3.6 Ensaio de motilidade

Para a quantificação do movimento da linhagem *C. violaceum* selvagem, dos mutantes e das linhagens complementadas, foram preparadas placas M9 ágar 0,3% e inoculadas com 5 μ l de cada cultura crescidas previamente por 24 h. As placas foram encubadas a 37°C e analisadas após 96 h.

3.7 Determinação de proteases e hemolisinas em OMVs

Para verificar a presença de enzimas com atividade proteolítica em OMVs, como proteases e hemolisinas, foram realizados ensaios em placas de meio M9 ágar suplementado com leite em pó desnatado (caseína) e placas Mueller-Hinton ágar com 5% de sangue (Laborclin). Para ambos os ensaios, utilizamos culturas de 24 h de *C. violaceum* ATCC 12472, do mutante $\Delta dsbA$ e da linhagem complementada $\Delta dsbA[dsbA]$. Para determinar a presença de proteases e hemolisinas em OMVs, utilizamos as vesículas purificadas de cada linhagem. As culturas e as OMVs de cada linhagem foram inoculadas na superfície das placas ágar leite e ágar sangue, e em seguida, as placas foram encubadas à 37°C por 72 h. A análise dos resultados foi feita pela presença de zonas de clareamento ao redor das bactérias ou OMVs, indicando a proteólise das proteínas do leite e hemólise.

3.8 Concentração inibitória mínima (MIC)

Para avaliar o potencial antimicrobiano das OMVs contendo violaceína, utilizamos diferentes bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Streptococcus mutans* ATCC 25175 e a bactéria Gram-negativa *E. coli* ATCC 25922 como controle. As linhagens foram crescidas por aproximadamente 24 h em placas LB,

ressuspendidas em PBS a uma $DO_{600nm} = 0,1$ e inoculadas em 2 ml de LB em $DO_{600nm} = 0,01$. As OMVs isoladas de *C. violaceum* selvagem com concentrações variando de 0 a 200 $\mu\text{g/ml}$ foram adicionadas as culturas. Como controle, utilizamos OMVs purificadas do mutante $\Delta\text{vioABCDE}$ (não produz violaceína) e a violaceína isolada. Após o cultivo por 20 h à 37° C e 250 rpm, os valores de MIC foram determinados por inspeção visual do crescimento bacteriano.

3.9 Ensaios de competição

A linhagem *C. violaceum* selvagem e o mutante $\Delta\text{vioABCDE}$ foram co-cultivados, em ensaios independentes, com a bactéria Gram-positiva *S. aureus* ATCC 29213 em diferentes proporções (1:1 e 10:1). Para isso, foram utilizadas placas de 6 poços ou placas de 6 poços *transwell* (poros de 0.4 μm) e meio LB líquido. Após o crescimento das culturas por 16h sob baixa agitação, foram realizadas diluições seriadas e a mistura de bactérias foi plaqueada em meio Muller-Hinton (MH) contendo ácido nalidíxico 30 $\mu\text{g/ml}$, que permitiu o crescimento apenas de *S. aureus* para a quantificação das UFCs. Para o ensaio nas placas *transwell*, foi retirada uma alíquota da cultura de *S. aureus* para posterior contagem das UFCs. Como controles, utilizamos cultura pura de *S. aureus* e OMVs (1 mg/ml) purificadas.

3.10 Purificação e quantificação de OMVs

As OMVs de *C. violaceum* selvagem, dos mutantes e das linhagens complementadas, foram purificadas como previamente descrito por CHUTKAN et al., 2013. Resumidamente, as linhagens foram cultivadas em 100 ml de LB líquido a partir de uma $DO_{600nm} = 0,01$ e crescidas ou até a fase logarítmica (~ 4 h) ou até a fase estacionária (~ 20 h). Alíquotas de 1 ml foram retiradas para a contagem de UFCs. Após o crescimento, as culturas foram centrifugadas por 45 minutos a 10.000 rpm e 4°C, e em seguida os sobrenadantes foram filtrados em filtros de 0,45 μm e concentrados em até ~ 4 ml, utilizando o sistema Amicon e membranas com poros de 100 kDa (Millipore). Estes sobrenadantes reduzidos e

contendo OMVs, foram submetidos à ultracentrifugação nas condições 4°C, 100,000 g por 1 h, utilizando uma centrífuga Beckman Coulter Optima TLX. O *pellet* de OMVs foram ressuspensos em tampão HEPES/NaCl 10 mM/0,085 % e as amostras finalizadas foram estocadas a - 80°C. Em alguns ensaios, como a proteômica e o desafio de macrófagos com OMVs, foi necessário um grau superior de purificação devido à associação de proteínas extracelulares abundantes, como a flagelina, à superfície das OMVs. Para isso, foi realizado um gradiente de densidade utilizando solução de Optiprep (Sigma) 60%. O gradiente foi realizado com frações de optiprep nas proporções 45, 40, 35, 30 e 25% diluídas em água MilliQ e as amostras foram diluídas em optiprep 20%. As diferentes frações foram colocadas em tubos Ultra Clear (14 x 89 mm; Beckman Coulter) em ordem crescente e os tubos foram submetidos à ultracentrifugação nas condições 100,000 g e 4°C por 18 h. Em seguida, a fração contendo OMVs foi separada das demais frações e diluída em tampão HEPES/NaCl para uma nova rodada de ultracentrifugação, para remoção do optiprep. As amostras finais foram ressuspensas em tampão HEPES/NaCl e armazenadas à -80°C. As OMVs foram quantificadas baseado no conteúdo total de proteínas (Bradford) e pela quantificação das nanopartículas (NTA – do inglês, *nanoparticle tracking analysis*), utilizando o equipamento NanoSight NS300 (Malvern Instruments), como previamente descrito por BITENCOURT et al., 2018.

3.11 Estimulação da liberação de OMVs em *E. coli*

Com o intuito de verificar se a violaceína estimula a biogênese de OMVs, encubamos a bactéria Gram-negativa *E. coli* com violaceína em meio de solubilização, como previamente descrito por HORSPOOL; SCHERTZER, 2018 para a solubilização da molécula PQS. Para o ensaio, utilizamos *E. coli* cultivada em meio LB até o início da fase estacionária. Em seguida, a cultura foi centrifugada a 5,000 rpm, temperatura ambiente e ressuspensa no meio contendo violaceína ou no mesmo meio de solubilização, porém sem violaceína, utilizado como controle. As culturas foram mantidas em agitação de 250 rpm, à 37°C por 2 h, e em seguida, as OMVs foram purificadas e quantificadas por NTA, como descrito acima.

3.12 Purificação e quantificação de violaceína

A linhagem selvagem de *C. violaceum* ATCC 12472 foi cultivada em 1 L de LB por 24 h, à 37°C e 250 rpm. Em seguida, a cultura foi centrifugada por 1 h à 4°C e 10,000 g, e o sobrenadante foi recuperado para a purificação de OMVs. Para a extração de violaceína das OMVs, utilizamos o solvente acetato de etila grau HPLC, e em seguida, a fração contendo violaceína foi purificada utilizando HPLC semi-preparativo (Shimadzu, equipado com bomba de solvente LC-6 AD, sistema controlador CBM-20^a, coluna CTO-20^a, injetor SIL-20AF, SPD-M20A DAD e coletor FCR-20A) usando Gemini 5 µm, coluna C18 110Å (250 x 10 mm) e o programa LabSolution. O gradiente de purificação foi composto por ACN:H₂O em um fluxo de 3 ml/min. A violaceína purificada (1 mg/ml; diluída em metanol) foi analisada por espectrometria de massas utilizando o espectrômetro micrOTOF II-ESI-TOF (Bruker Daltonics) e por espectrometria de ressonância magnética nuclear (¹H RMN) em dimethylsulphoxide-*d*₆, com um espectrômetro Bruker DRX 500 MHz. O espectro de RMN foi processado utilizando o programa MestReNova 6.0.2. Para a quantificação de violaceína em OMVs e no sobrenadante livre de OMVs, utilizamos também a leitura em DO_{572nm}.

3.13 RT-PCR

Para investigar se o gene *vacJ* é co-transcrito com os genes *yrbBCDEF*, a linhagem selvagem de *C. violaceum* foi cultivada até a fase exponencial (DO_{600nm} ~ 1.0) a 37°C sob agitação de 250 rpm em meio LB, para extração do RNA total com o reagente Trizol (Ambion). Os RNAs extraídos foram isolados com o kit Illustra RNAspin Mini RNA (GE Healthcare) e o RT-PCR foi realizado com o kit SuperScript III One-Step RT-PCR, com a Taq Platinum (Invitrogen) e com os óligos específicos que amplificaram as regiões que compreendem do gene *vacJ* ao gene *yrbB* (745 pb) e do gene *vacJ* ao *yrbF* (2868 pb). Os PCRs convencionais foram realizados com os mesmos óligos, utilizando como controle o DNA genômico ou RNA, como controles.

3.14 Ensaio da quantificação da atividade de β -galactosidase

As regiões promotoras dos operons *yrbBCDEF/vacJ* e *vioABCDE* foram amplificadas por PCR e clonadas no vetor repórter pRK*lacZ*290. As construções foram introduzidas nas linhagens *C. violaceum* ATCC 12472 e nos mutantes $\Delta cvil$ e $\Delta cviR$ via conjugação. Para avaliar a expressão fase-dependente dos operons, as linhagens foram crescidas até a fase exponencial ($DO_{600nm} \sim 1.0$) e até a fase estacionária ($DO_{600nm} \sim 5.0$). Para as condições de limitação de ferro, culturas de *C. violaceum* crescidas até a fase exponencial foram expostas ao quelante de ferro 2,2'-dipiridil por 1 h, como previamente descrito por BATISTA et al., 2019. A atividade de β -galactosidase foi aferida utilizando *o*-nitrofenil- β -D-galactosídeo (ONPG) como substrato, e medindo a absorbância em 420 nm (MILLER, 1972).

3.15 Microscopia eletrônica de transmissão e varredura

As linhagens de *C. violaceum* ATCC 12472 e dos mutantes $\Delta vacJ$ e $\Delta yrbE$ foram diluídas ($DO_{600nm}=0,01$) em 2 ml de LB e cultivadas em placas de 12 poços nas quais foram introduzidas lamínulas de 13 mm. Após 16 horas de cultivo, as bactérias aderidas na lamínula foram fixadas com 1 ml de glutaraldeído 2% e paraformaldeído 2% por 3 h, seguido de uma lavagem com PBS. O material foi mantido à 4°C em tampão fosfato de sódio, até as preparações específicas para cada microscopia. As etapas finais de preparo foram realizadas conforme protocolos do Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos.

3.16 Co-purificação dos substratos de DsbA

Com o intuito de identificar os substratos da proteína DsbA, utilizamos a linhagem $\Delta dsbA[His-dsbA^{C54S}]$, pois nesta versão de DsbA as proteínas substrato se manteriam covalentemente ligadas por ponte dissulfeto. Para isso, a linhagem $\Delta dsbA[His-dsbA^{C54S}]$ foi cultivada em 2 L de LB líquido por 20 h, à 37°C e agitação de 250 rpm. Em seguida, utilizamos o protocolo para extração

de proteínas periplasmáticas sugerido pelo fabricante (Ni-NTA Superflow Cartridges – QIAGEN). Resumidamente, a cultura foi centrifugada por 15 minutos a 6,000 rpm, o pellet foi ressuspendido com 25 ml de tampão Tris-HCl 30 mM; pH 8 e em seguida foi adicionado 25 ml de sacarose 40%. A mistura foi mantida sob agitação magnética por 20 minutos em temperatura ambiente. Após este período, a amostra foi centrifugada por 45 minutos à 12,000 rpm e 4°C, e o pellet foi recuperado com uma solução de MgSO₄ 5 mM gelado. Após 20 minutos sob agitação no gelo, a amostra foi novamente centrifugada por 1 h, 12,000 rpm e 4°C. Recuperamos o sobrenadante e adicionamos 5 ml de estreptomicina 10% para precipitação do DNA. Para finalizar, a amostra foi concentrada em até 5 ml no sistema Amicon com uma membrana de 10 KDa, diluída em tampão de equilíbrio e a proteína His-DsbA^{C54S}, juntamente com os substratos associados, foram purificados em coluna de níquel, como descrito previamente.

3.17 Análises proteômicas por LC-MS/MS

Foram identificadas por espectrometria de massas as proteínas presentes nas OMVs purificadas das linhagens *C. violaceum* ATCC 12472, $\Delta yrbE$ e $\Delta dsbA$, além dos alvos de DsbA obtidos na co-purificação com a linhagem $\Delta dsbA$ [His-dsbA^{C54S}]. Para a identificação das proteínas das OMVs, cultivamos as linhagens e purificamos as vesículas por ultracentrifugação e por gradiente de densidade como descrito acima. As proteínas contidas nas OMVs e na co-purificação foram separadas por gel SDS-PAGE 12%, coradas com Comassie e as canaletas do gel correspondente a cada amostra, foram removidas para a preparação para a análise por massas, seguindo o protocolo do Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD), da Universidade de Campinas. Primeiramente, o corante Comassie foi removido dos pedaços de gel com uma solução de NH₄HCO₃ 100 mM e acetonitrila 1:1 vol/vol e após a remoção, os pedaços de gel foram secos em centrífuga à vácuo. Em seguida, as proteínas presentes no gel foram submetidas à digestão com 5 ng de tripsina (Promega) por 18 h à 37 °C. Os peptídeos resultantes foram extraídos do gel com ácido fórmico 5% e acetonitrila 1:2 vol/vol, e em seguida, cada amostra foi seca em centrífuga à vácuo. Para a identificação por LC-MS/MS, as amostras

foram ressuspensas com ácido trifluoroacético 0,1% vol/vol e submetidas à análise no equipamento NANO LC-MS/MS QTOF XEVO G2 XS (Waters).

3.18 Ensaio de virulência

Fêmeas de camundongo da linhagem C57BL/6 e BALB/c, com 6 semanas de vida, foram desafiadas com *C. violaceum* ATCC 12472 e com os mutantes isogênicos $\Delta vacJ$, $\Delta yrbE$ e $\Delta dsbA$, na concentração de aproximadamente 2×10^6 UFC (C57BL/6) e 10^6 UFC (BALB/c), por via intraperitoneal. Estas fêmeas foram acompanhadas por até 15 dias para avaliação da sobrevivência.

Inicialmente, foram feitos pré-inóculos das linhagens bacterianas em meio LB líquido com cultivo a 37 °C e 250 rpm durante aproximadamente 24h. Em seguida, essa cultura foi utilizada para fazer o inóculo a uma DO_{600} de 0,01 com cultivo em meio LB a 37 °C e 250 rpm durante 20h. Assim, de 1,5 a 2 ml da cultura resultante foi centrifugado e ressuspensado em 1 ml de PBS, para que a concentração inicial fosse de aproximadamente 1×10^{10} UFC/ml. Em seguida, realizou-se diluições seriadas para um volume final de 1 ml. A diluição 10^{-3} foi utilizada nas injeções nos camundongos. Foram aplicados 100 μ l dessa diluição por via intraperitoneal, que corresponde a aproximadamente 10^6 UFC. A diluição 10^{-7} foi plaqueada em meio LB para quantificar as UFC que foram injetadas nos animais, conforme descrito (MIKI et al., 2011) (BATISTA et al., 2019).

Para a quantificação da carga bacteriana no fígado, fêmeas BALB/c ou C57BL/6 foram desafiadas com *C. violaceum* ATCC 12472 e com os mutantes como descrito acima. Estas fêmeas foram sacrificadas após 20 h de infecção para avaliação do número de bactérias encontradas no fígado. Os animais foram eutanasiados e o fígado foi coletado assepticamente em PBS. Todo o tecido do fígado de cada camundongo foi coletado em um tubo estéril, contendo 5 mL de PBS, que foi pesado antes e após a coleta. Em seguida, o tecido foi homogeneizado e fizemos a diluição seriada, em volume final de 100 μ L, utilizando placa de 96 poços. O homogeneizado não diluído e as diluições 10^{-1} a 10^{-4} foram plaqueados em placas LB para contagem das UFC [UFC/g = (n° de colônias x diluição x 5 ml) / peso do órgão].

Estes experimentos foram realizados no Biotério do Departamento de Biologia Celular e Molecular da FMRP-USP, de acordo com o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação número 183/2017, aprovado pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA-FMRP-USP). Os animais foram adquiridos do Biotério Central (Serviço de Biotério – PUSP-RP). Alguns ensaios com camundongos foram realizados no biotério da Universidade da Carolina do Norte.

3.19 Produção de anticorpo policlonal contra OMVs

Para os ensaios de produção de anticorpos, utilizamos fêmeas de camundongos BALB/c com 6 semanas. Resumidamente, o soro anti-OMVs foi obtido após a imunização dos camundongos com 10 µg de OMVs purificadas da linhagem *C. violaceum* selvagem por via subcutânea. Após duas doses de reforço (em um período de 15 dias cada), o sangue dos animais foi coletado e a presença de anticorpos no soro contra as OMVs foi testada por *western blot*, utilizando vesículas purificadas de *C. violaceum* selvagem, do mutante $\Delta dsbA$ e linhagem complementada $\Delta dsbA[dsbA]$. As vesículas purificadas foram submetidas a eletroforese em gel SDS-PAGE 12%, e, em seguida, as amostras foram transferidas por eletroforese para a membrana de nitrocelulose com poro de 0,2 µm (Amersham Protran) utilizando o aparato Mini Trans-Blot (Bio-Rad) com tampão de transferência (3,03 g de Tris-base; 14,41 g de Glicina; 200 ml de Metanol e água para 1 L de solução final). Para cada ensaio, os soros foram utilizados na diluição 1:1000 e a detecção foi feita com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase, utilizando o kit *Protein Detector LumiGLO Western Blotting*, conforme recomendado pelo fabricante (KPL).

3.20 Cultura de células, quantificação de citotoxicidade celular e ensaio de invasão

Macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) foram preparados de acordo com MIAO, et al., 2010. Brevemente, foram removidos os fêmures de camundongos C57BL/6 selvagem e após extração da medula, os macrófagos

foram diferenciados com a adição do sobrenadante de células L em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino (FBS) 10% por 7 dias, à 37 °C e 5 % de CO₂. Para determinar a citotoxicidade das linhagens de interesse, cultivamos 5 x 10⁴ de macrófagos primários em placas de 96 poços e, no dia seguinte, foram infectados com *C. violaceum* ATCC 12472, os mutantes $\Delta vacJ$, $\Delta yrbE$, $\Delta dsbA$ e as respectivas linhagens complementadas com a multiplicidade de infecção (MOI) de 1. Após 1 h de infecção, a taxa de morte celular foi determinada pela quantificação da enzima lactato desidrogenase (LDH) através do kit CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, de acordo com as instruções do fabricante (Promega). A citotoxicidade mediada por OMVs purificadas (10⁸ OMVs/ml) foi quantificada da mesma maneira. Para o ensaio de invasão, seguimos o protocolo estabelecido por MIKI et al., 2011. Em resumo, cultivamos 2 x 10⁵ de células Hepa 1-6 em meio DMEM FBS 10% em placas de 24 poços, 24 h antes da infecção. No dia seguinte, infectamos as células Hepa 1-6 com *C. violaceum* ATCC 12472, os mutantes $\Delta vacJ$, $\Delta yrbE$, $\Delta dsbA$ e as respectivas linhagens complementadas em um MOI de 50, e o ensaio foi mantido em estufa de CO₂ 5% à 37°C. Após 1 h de infecção, o sobrenadante contendo as bactérias extracelulares foi removido e adicionou-se DMEM com gentamicina 50µg/ml. Após o tratamento com gentamicina, as células foram lavadas com PBS por 3 vezes, lisadas com Triton X-100 1%, para liberar as bactérias invasoras, e em seguida, 100 µl de cada ensaio foi utilizado para diluição seriada e posterior plaqueamento em LB ágar para a contagem das UFCs.

3.21 Quantificação de citocinas

A quantificação de citocinas foi realizada de acordo com FREITAS et al., 2016. Resumidamente, a linhagem de macrófago RAW 264.7 foi estimulada com OMVs (1 x 10⁸ OMVs/ml) derivadas das linhagens *C. violaceum* selvagem, mutantes $\Delta vacJ$, $\Delta yrbE$ e $\Delta dsbA$ e linhagens complementadas por 24 h, 5% de CO₂ e 37° C. Os sobrenadantes foram recuperados para a quantificação das citocinas TNF- α , IL-6 e IL-1 β por ELISA, de acordo com as recomendações do fabricante do kit OptiEIA (Pharmingen). As curvas padrão permitiram determinar

a concentração das citocinas em pg/ml. A absorbância foi lida à 450 nm no espectrofotômetro Power Wave-X (BioTek Instruments, Inc.).

3.22 Entrega de efector do T3SS por quantificação de cAMP

Para avaliar a eficiência do T3SS, utilizamos o plasmídeo pMR20*copE**cyaA* como um sistema repórter para a secreção do fator de virulência CopE. Para a construção do vetor, amplificamos o gene *copE* (CV_0296) a partir do DNA genômico de *C. violaceum* ATCC 12472. O gene *cyaA* de *Bordetella pertussis* foi amplificado utilizando a construção *m45cyaA::pJV450* como molde. Os genes *copE* e *cyaA* foram digeridos, ligados e o fragmento *copE**cyaA* foi clonado no vetor pMR20. Em seguida, a construção foi inserida em *C. violaceum* selvagem e nos mutantes via conjugação. Como controle, o gene *cyaA* foi clonado no pMR20 e a construção pMR20*cyaA* foi inserida em *C. violaceum* selvagem. A quantificação de cAMP foi determinada como previamente descrito por MIAO; MILLER, 2000. Resumidamente, células HeLa foram infectadas com as linhagens expressando a construção pMR20*copE**cyaA* em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 10. Após 1 h de infecção, as células foram lisadas com HCl 0.1 M e aquecidas a 95° C por 5 minutos. Os níveis de cAMP foram determinados utilizando o kit Amersham cAMP Biotrak enzyme immunoassay system (GE Healthcare Biosciences), de acordo com as recomendações do fabricante.

4. RESULTADOS

4.1 A produção de OMVs por *C. violaceum* muda de acordo com a fase de crescimento

A visualização por microscopia eletrônica revelou o brotamento de OMVs em células de *C. violaceum* (Fig. 4 a), as quais são majoritariamente partículas esféricas (Fig. 4 b), como já foi descrito em diversas outras espécies bacterianas (SCHWECHHEIMER; KUEHN, 2015). Para quantificar a produção de OMVs por *C. violaceum* em diferentes fases de crescimento, nós analisamos as vesículas derivadas de culturas crescidas em LB até a fase exponencial ($OD_{600nm} \sim 0,8$) e também até a fase estacionária ($OD_{600nm} \sim 5$) por NTA (do inglês, *nanoparticle tracking analysis*) e pela quantificação total de proteínas (Bradford) (Fig. 4 c - d). Nossos dados revelaram que *C. violaceum* produz OMVs em ambas as fases de crescimento testadas, com um aumento de vesículas durante a fase estacionária (Fig. 4 c - d). No entanto, quando o número de partículas foi normalizado pelo número de UFCs, o qual é maior durante a fase estacionária, a taxa de produção de OMVs por *C. violaceum* mostrou-se maior durante a fase exponencial do que na fase estacionária (Fig. 4 e). De fato, tem sido mostrado em várias outras bactérias, que a taxa máxima da produção de vesículas ocorre durante a fase exponencial (ORENCH-RIVERA; KUEHN, 2016). Esses resultados sugerem que *C. violaceum* modula a taxa de liberação de OMVs, diminuindo a produção de vesículas por célula durante a fase estacionária. Curiosamente, as OMVs purificadas de culturas de *C. violaceum* de fase estacionária mostraram-se de cor violeta, sugerindo a presença de violaceína.

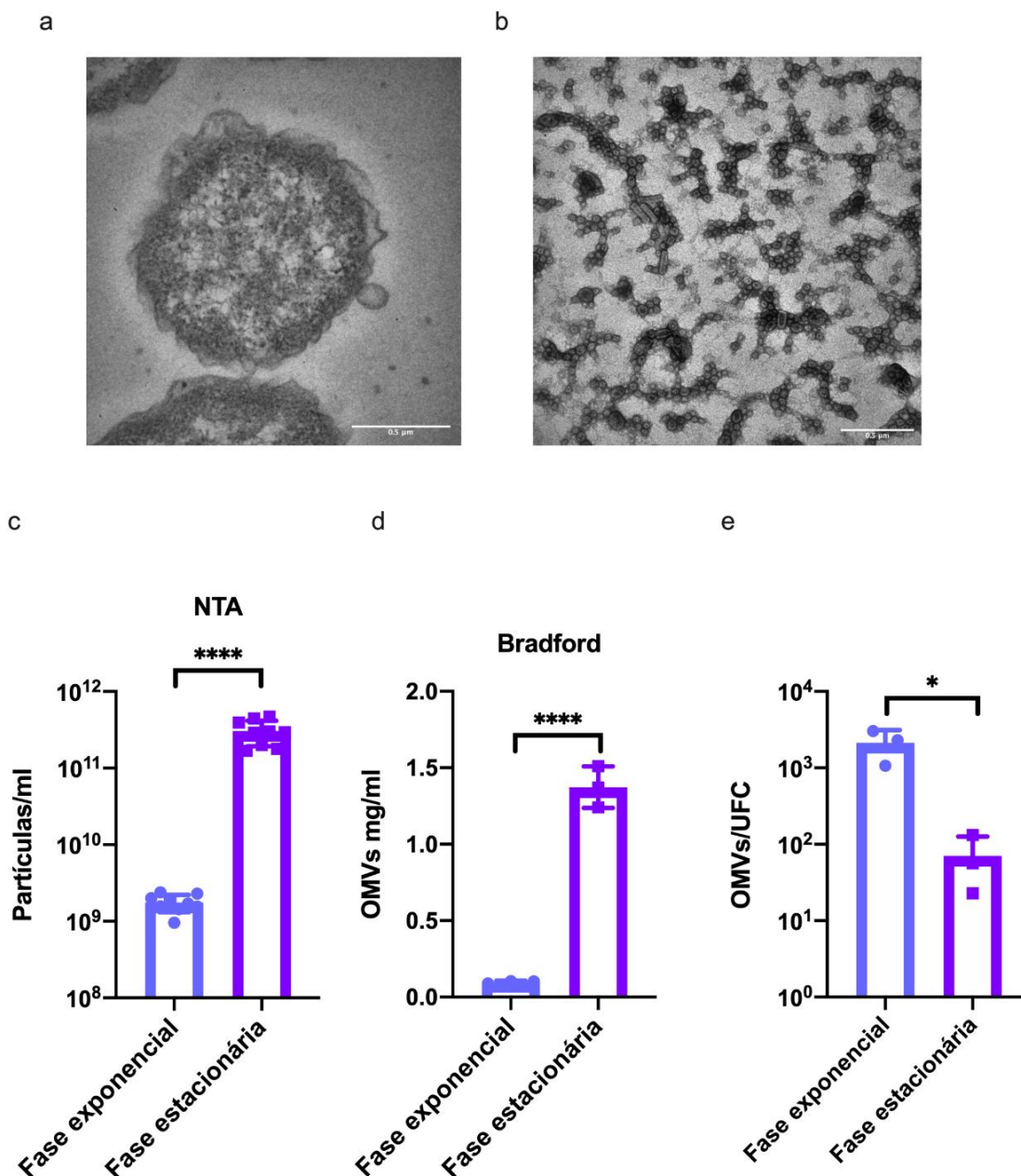


Figura 4. *Chromobacterium violaceum* regula a liberação de OMVs durante as fases de crescimento. (a) Visualização por microscopia eletrônica de transmissão (MET) de OMV brotando de uma célula de *C. violaceum*. **(b)** MET de OMVs purificadas de *C. violaceum*. **(c - e)** Para determinar a taxa de liberação de OMVs dependente de fase, OMVs foram preparadas de culturas de *C. violaceum* selvagem até a fase exponencial (DO ~ 0,8) ou estacionária (DO ~ 5,0) em meio LB. **(c)** Quantificação de OMVs por NTA. **(d)** Quantificação de OMVs pelo conteúdo total de proteínas. **(e)** Razão do número de OMVs produzidas por célula durante a fase exponencial e fase estacionária. Os valores médios com o erro padrão são mostrados ($n = 3$ réplicas biológicas). As diferenças significativas entre os dados foram determinadas pelo teste t não-pareado.

4.2 As OMVs de *C. violaceum* transportam violaceína e medeiam sua atividade antimicrobiana *in vivo*

A violaceína é um metabólito hidrofóbico devido a presença de um grupo indol em sua estrutura (BALIBAR; WALSH, 2006). Baseado nessa característica e também nos achados de que OMVs medeiam a secreção de pequenos compostos hidrofóbicos (MASHBURN; WHITELEY, 2005) (BRAMEYER, et al., 2018), nós hipotetizamos que as OMVs de *C. violaceum* poderiam mediar a secreção de violaceína para o ambiente extracelular. Em concordância com nossa hipótese, nós detectamos por análise em HPLC (Fig. 5 a) e por quantificação em OD_{572nm} (Fig. 5 b), a presença de violaceína nas OMVs purificadas de *C. violaceum*. Por outro lado, não detectamos violaceína em sobrenadantes livres de OMVs, sugerindo que praticamente toda violaceína liberada das células foi via OMVs. Como controle negativo, realizamos o mesmo método de extração e não detectamos violaceína em OMVs purificadas da linhagem mutante $\Delta vioABCDE$ que não possui as enzimas de biossíntese de violaceína (Fig. 5 a).

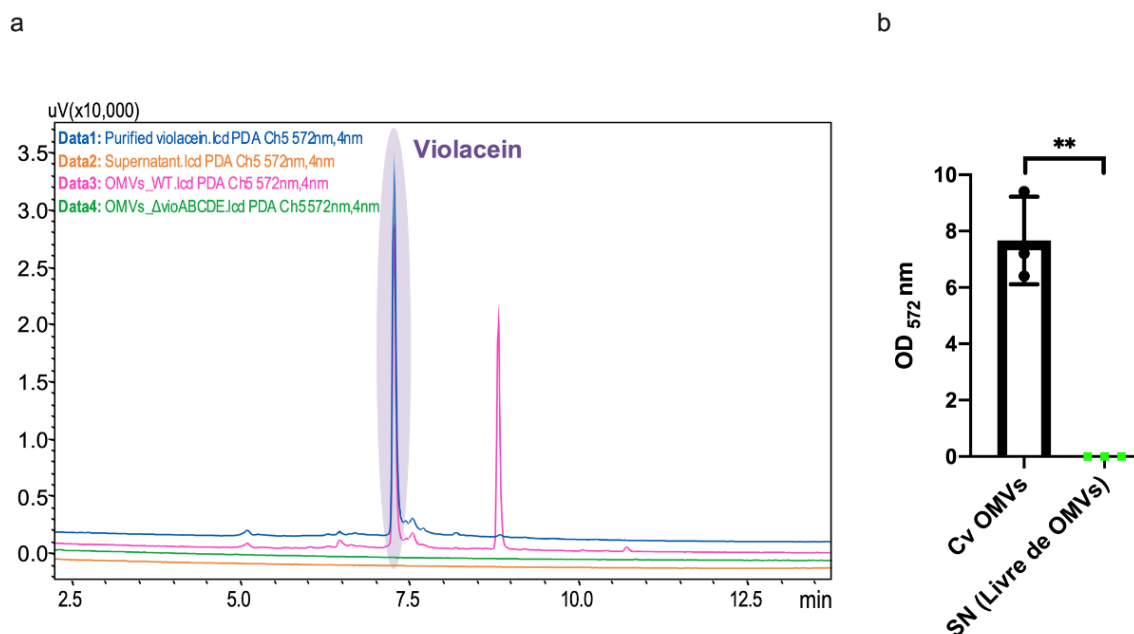


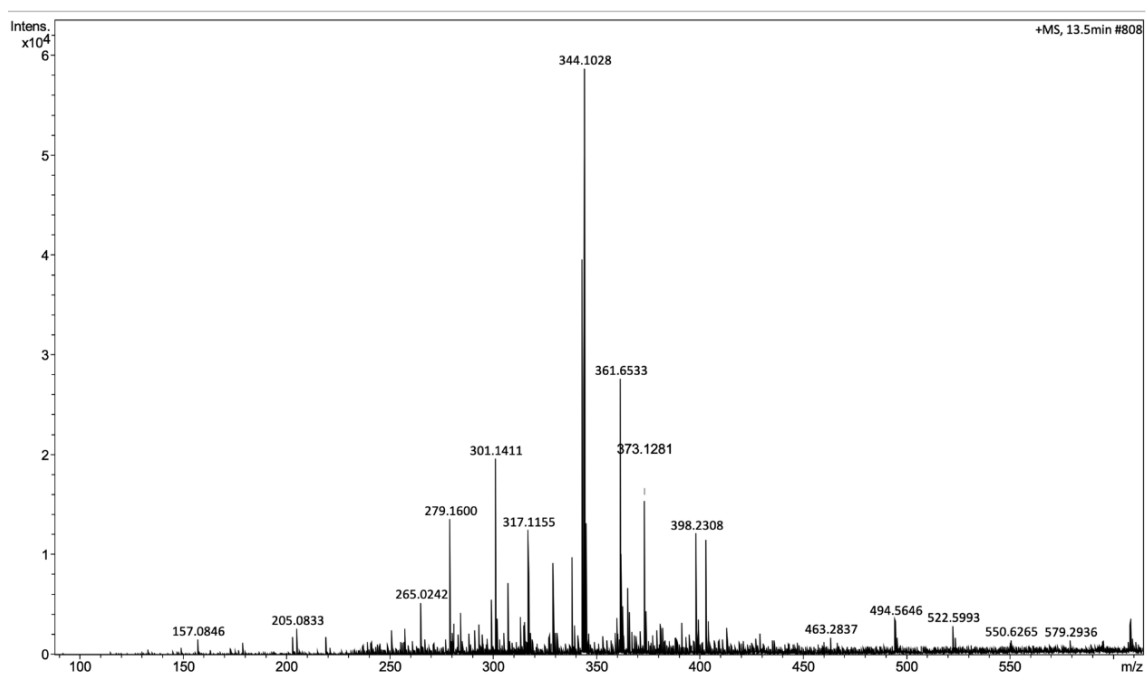
Figura 5. *Chromobacterium violaceum* secreta violaceína em OMVs. (a) Violaceína livre de células foi analisada por HPLC (572_{nm}) em OMVs e em sobrenadantes livres de OMVs de culturas de *C. violaceum* selvagem. Violaceína purificada e OMVs do mutante

$\Delta vioABCDE$ foram utilizadas como controle. O tempo de eluição da violaceína foi entre 7,0 e 7,5 minutos (pico indicado), como confirmado por espectrometria de massas e RMN. **(b)** Quantificação de violaceína pela DO_{572nm} . A violaceína foi extraída de OMVs e de sobrenadante livre de OMVs com solvente acetato de etila. Os valores médios com o erro padrão são mostrados ($n = 3$ réplicas biológicas). As diferenças significativas entre os dados foram determinadas pelo teste t não-pareado.

A identificação e pureza da violaceína isolada de células de *C. violaceum* ou OMVs (picos indicados entre 7 e 7,5 minutos no espectro de HPLC) foram determinadas por espectrometria de massas (MS) ou ressonância magnética nuclear (RMN) (Fig. 6 a - b).

Além disso, nós investigamos se as OMVs de *C. violaceum* poderiam mediar a bem documentada atividade antimicrobiana atribuída à violaceína (DURÁN, et al., 2016). Para isso, realizamos ensaios de MIC em meio líquido (Tabela 4). As OMVs derivadas da linhagem selvagem prejudicaram o crescimento de três diferentes bactérias Gram-positivas, de maneira similar ao observado quando utilizamos violaceína purificada como controle. Diferentemente, OMVs derivadas da linhagem mutante $\Delta vioABCDE$ não foram prejudiciais para as bactérias alvo, indicando que a violaceína foi o único componente presente em OMVs que impediu o crescimento das bactérias Gram-positivas. Como esperado, o crescimento de *E. coli* não foi prejudicado pelas OMVs ou pela violaceína isolada, derivadas de *C. violaceum* selvagem (Tabela 4), já que a violaceína não possui atividade contra bactérias Gram-negativas (CAUZ, et al., 2019). Juntos, estes resultados sugerem que as OMVs contendo violaceína, liberadas durante a fase estacionária, podem ser úteis durante a competição de *C. violaceum* com outras bactérias.

a



b

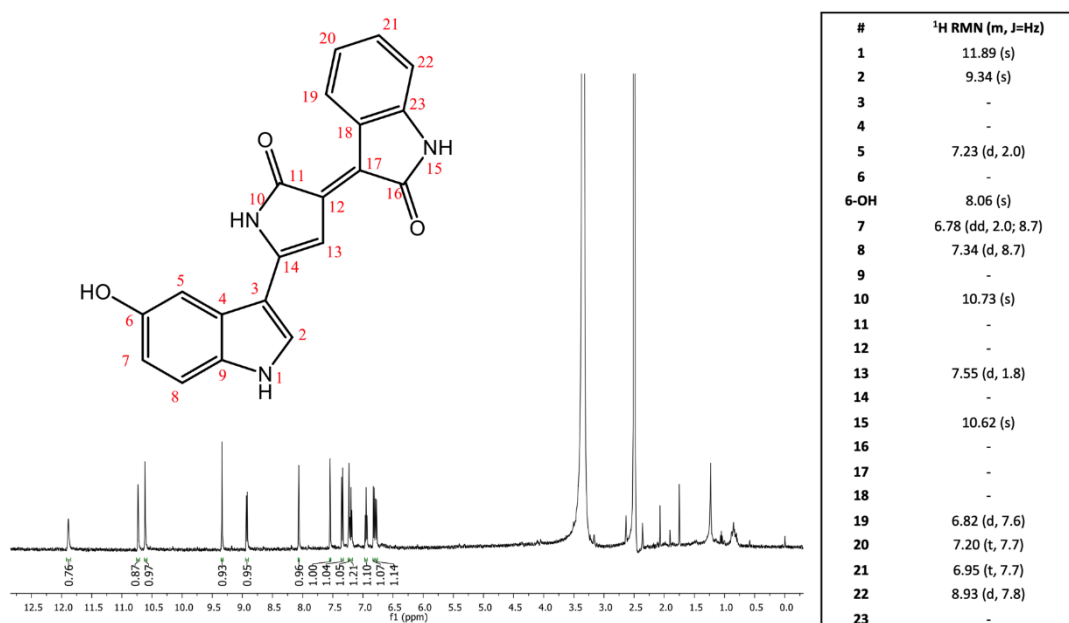


Figura 6. Identificação de violaceína. (a) Espectro de massas da violaceína purificada de OMVs derivadas de *C. violaceum* ATCC 12472. HRESIMS $[\text{M}+\text{H}]^+ = 344.1028$; erro = - 0,6 ppm. (b) Espectro de RMN (500 MHz ^1H) da violaceína em dimetilsulfóxido- d_6 .

Tabela 4. MICs da violaceína e de OMVs contendo violaceína para as linhagens bacterianas indicadas.

Linhagens bacterianas	Violaceína (μM) ^a	<i>C. violaceum</i> selvagem OMVs (μg)	$\Delta\text{vioABCDE}$ OMVs (μg)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	25	25	>200
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	25	12,5	>200
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	25	25	>200
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	>100	>200	>200

^a Violaceína purificada de OMVs de *C. violaceum* selvagem. OMVs isoladas das linhagens selvagem e mutante $\Delta\text{vioABCDE}$ (μg ; quantificação de proteína).

Para testar se as OMVs medeiam a toxicidade da violaceína *in vivo* e à longa distância, nós realizamos ensaios de competição em meio líquido com as linhagens *C. violaceum* selvagem e o mutante $\Delta\text{vioABCDE}$ contra a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, mantendo tanto as bactérias misturadas em co-culturas (Fig. 7 a), quanto cultivadas separadamente em diferentes compartimentos de placas *transwell* (Fig. 7 b). A linhagem de *C. violaceum* selvagem diminuiu drasticamente as UFCs de *S. aureus* durante o co-cultivo, e em menor extensão nos ensaios com placas *transwell*. A maioria da atividade antimicrobiana foi perdida quando misturamos *S. aureus* com o mutante $\Delta\text{vioABCDE}$, que não produz violaceína. As OMVs purificadas contendo violaceína também diminuíram a viabilidade de *S. aureus* nos ensaios com placas *transwell*, porém com baixa eficiência (Fig. 7 b), talvez devido à obstrução dos poros da membrana.

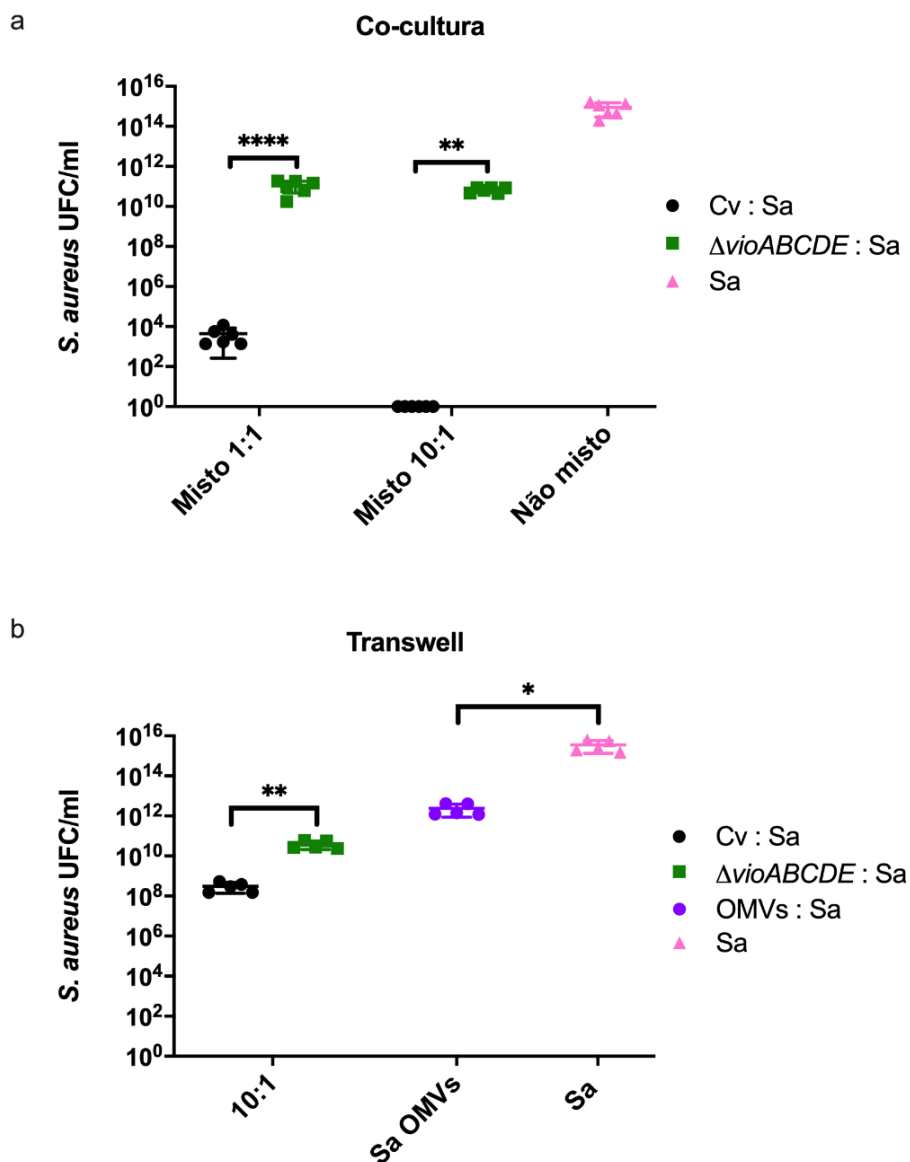


Figura 7. OMVs contribuem para a competição de *C. violaceum* contra *S. aureus* ao mediar a citotoxicidade da violaceína *in vivo* e à longa distância. **(a)** Competição em co-cultivo. *C. violaceum* selvagem (Cv) ou o mutante deficiente de violaceína $\Delta vioABCDE$ foram misturados com *S. aureus* (Sa) nas proporções 1:1 ou 10:1 em placas de seis poços. Após 18 horas de cultivo em LB líquido, as misturas foram plaqueadas em MH com ácido nalidíxico, para a contagem das CFUs de *S. aureus*. **(b)** Ensaio de competição independente de contato e à longa distância. Cv ou o mutante $\Delta vioABCDE$ foram inoculados em LB em um compartimento diferente de *S. aureus* em placas *transwell* (0,45 μ m). Após 24 h, *S. aureus* foi plaqueada em placas MH para a contagem de UFCs. Culturas puras de *S. aureus* ou com OMVs contendo violaceína foram usadas como controle. Os valores médios com o erro padrão são mostrados (n = 3 réplicas biológicas). As diferenças significativas entre os dados foram determinadas pelo teste *two-way* ANOVA.

Essa capacidade diminuída do mutante Δ *vioABCDE* em competir com *S. aureus* foi devido à ausência de violaceína e não devido a um problema fisiológico geral, já que essa linhagem mutante apresentou crescimento e viabilidade similar à linhagem *C. violaceum* selvagem (Fig. 8 a - c). Tem sido descrito na literatura que a violaceína está associada com a proteção de *C. violaceum* contra a predação por protozoários em biofilmes (MATZ et al., 2008). Dessa forma, utilizando o método cristal-violeta, nós determinamos que a violaceína contribui com a formação de biofilme, já que a linhagem mutante Δ *vioABCDE* apresentou formação de biofilme diminuída (Fig. 8 d).

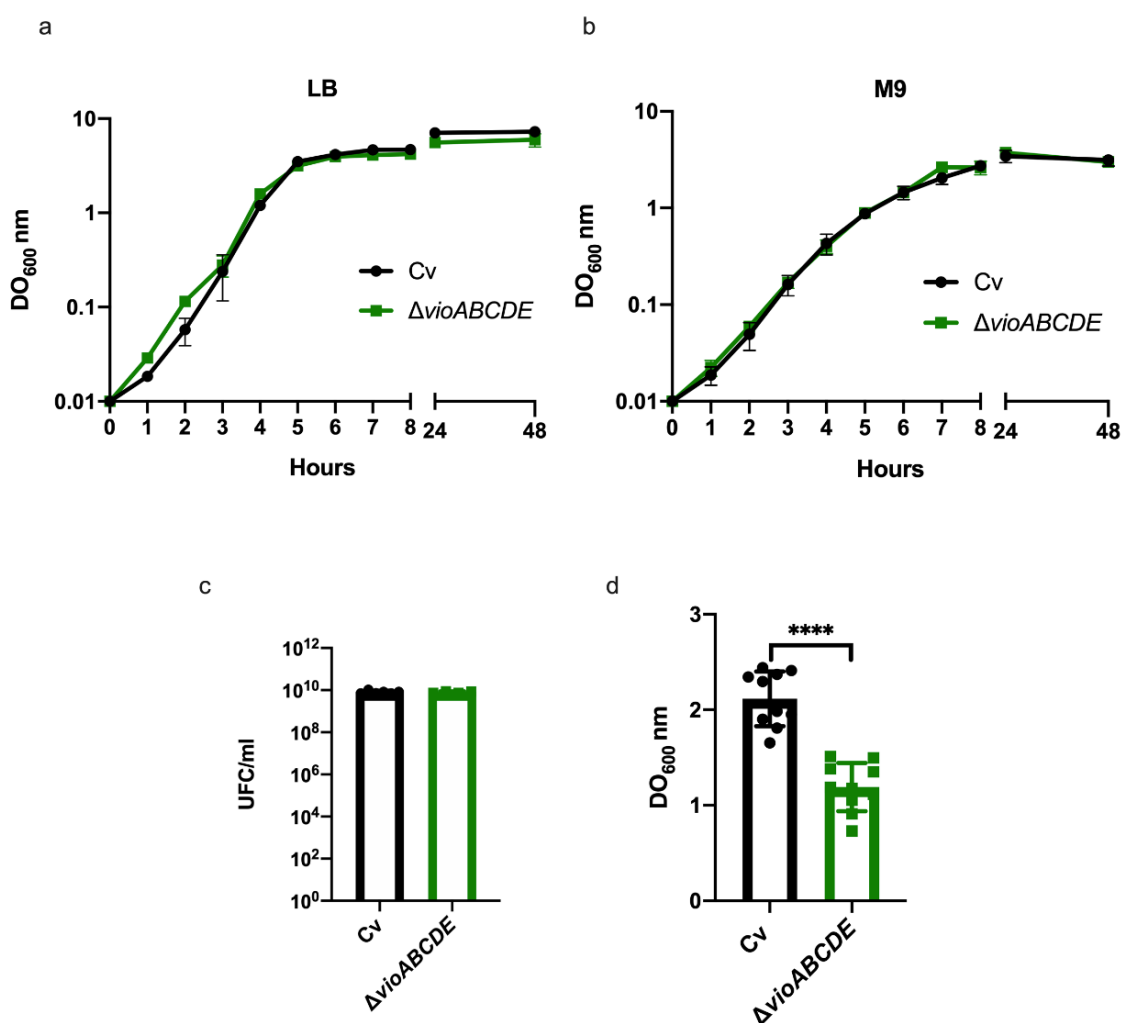


Figura 8. O mutante Δ *vioABCDE* apresenta crescimento regular, porém com produção reduzida de biofilme. **(a)** Curva de crescimento em LB. **(b)** Curva de crescimento em M9. Cv e o mutante Δ *vioABCDE* foram cultivados nos meios indicados e o crescimento foi medido por 48 h utilizando absorbância a DO_{600nm}. **(c)** Quantificação

de UFCs. As linhagens indicadas foram cultivadas em LB por 20 h, e em seguida, foram feitas diluições seriadas e plaqueamento em LB para quantificação de UFCs. **(d)** Quantificação de biofilme. As linhagens foram cultivadas por 24 h em LB e o biofilme foi corado com cristal violeta e quantificado por DO_{600nm} . Os valores médios com o erro padrão são mostrados ($n = 3$ réplicas biológicas). As diferenças significativas entre os dados foram determinadas pelo teste t não-pareado.

Juntos, estes resultados indicam que a secreção de violaceína via OMVs é um potente mecanismo para a competição interbacteriana que pode acontecer à longa distância e de maneira independente de contato. Recentemente, um outro grupo descreveu que as OMVs de *C. violaceum* atuam como um veículo para secretar violaceína e inibir o crescimento de *S. aureus* (CHOI et al., 2020). Nossos dados confirmam esses achados (Fig. 7) e estendem a atividade antimicrobiana das OMVs contra outras bactérias Gram-positivas (Tabela 4).

4.3 A violaceína induz a liberação de OMVs para sua própria secreção

Um mecanismo único de biogênese de OMVs envolve o PQS, uma pequena molécula hidrofóbica secretada por *P. aeruginosa* (MASHBURN; WHITELEY, 2005). Como a violaceína é similar ao PQS quanto à hidrofobicidade e o tamanho reduzido, nós hipotetizamos que a violaceína poderia induzir a formação de OMVs em *C. violaceum*. De fato, a linhagem mutante $\Delta vioABCDE$ produziu duas vezes menos vesículas comparado à linhagem selvagem, como determinado por NTA (Fig. 9 a), normalizado pelo conteúdo de proteína (Fig. 9 b) ou pelo número de células (Fig. 9 c). As OMVs derivadas das linhagens $\Delta vioABCDE$ e selvagem tiveram distribuição similares em relação ao tamanho (Fig. 9 d). Estes resultados indicaram que a violaceína estimula a liberação de vesículas em *C. violaceum*. Entretanto, ao contrário de nossos dados, um trabalho recente mostrou que o mutante por inserção *vioA*, que não produz violaceína, mostrou um aumento na produção de OMVs (CHOI et al., 2020).

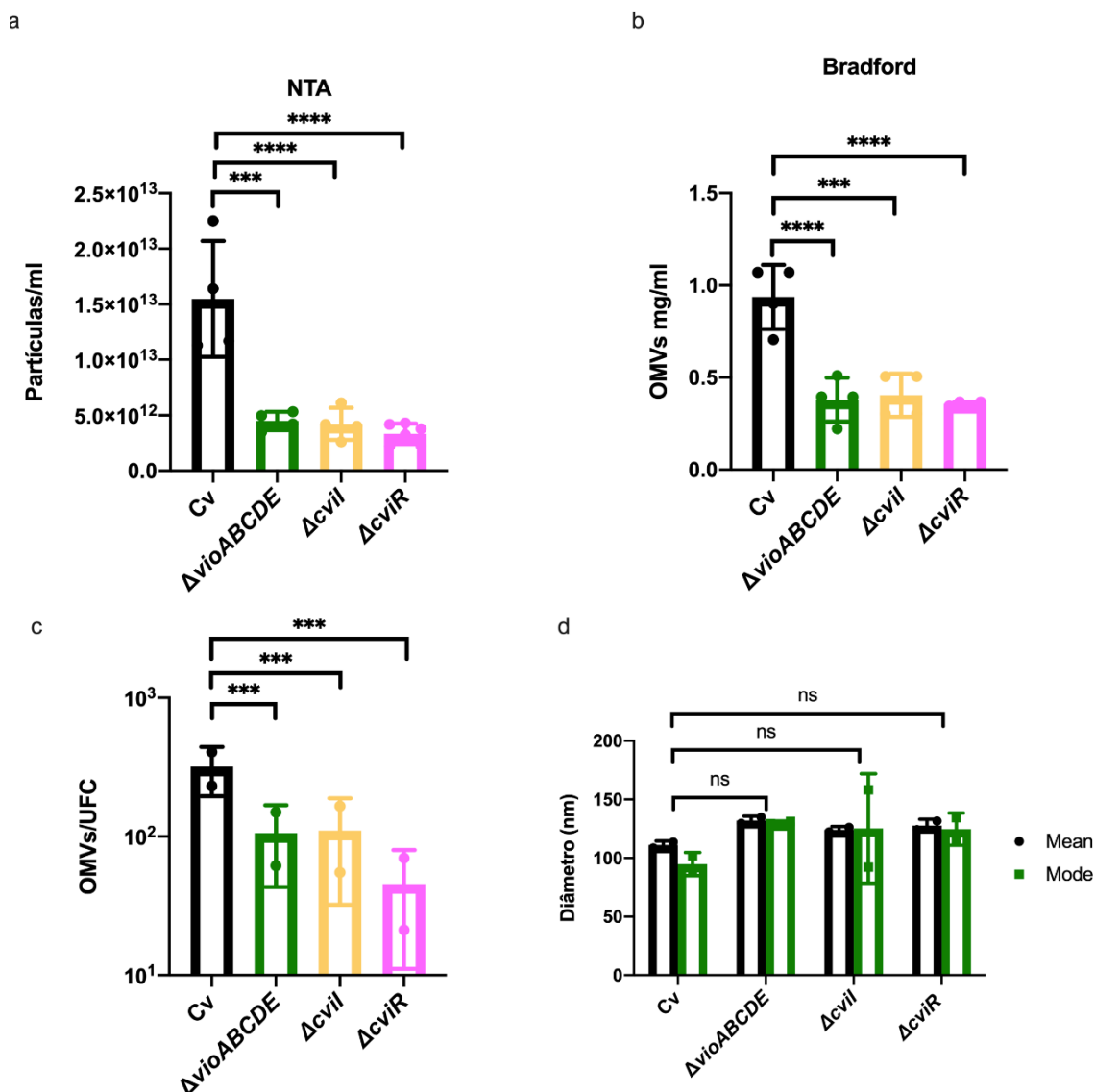


Figura 9. A violaceína induz a liberação de OMVs durante a fase estacionária. OMVs de cultura de fase estacionária de *C. violaceum* selvagem e linhagens mutantes indicadas foram coletadas por ultracentrifugação. **(a)** Quantificação de OMVs por NTA. **(b)** Quantificação de OMVs por quantificação total de proteínas. **(c)** Razão da proporção de OMVs por célula. **(d)** Distribuição do tamanho de OMVs medido por NTA. Os valores médios com o erro padrão são mostrados (n = 3 réplicas biológicas). As diferenças significativas entre os dados foram determinadas pelo teste *two-way* ANOVA.

Considerando que o PQS estimula a formação de vesículas em várias bactérias Gram-negativas (HORSPOOL; SCHERTZER, 2018), nós testamos se a violaceína poderia induzir efeito semelhante. Nossos dados indicaram que quando a violaceína purificada foi adicionada em culturas de *E. coli* por 2 h, este metabólito foi incorporado pelas células e estimulou a liberação de vesículas,

como determinado por NTA (Fig. 10), sugerindo que a indução da biogênese de OMVs por pequenas moléculas hidrofóbicas é um mecanismo amplamente distribuído. Nós especulamos que ao manter a violaceína em OMVs, bactérias Gram-negativas poderiam evitar a toxicidade da violaceína ao manter essa molécula longe da membrana interna, onde poderia ter atividade citotóxica.

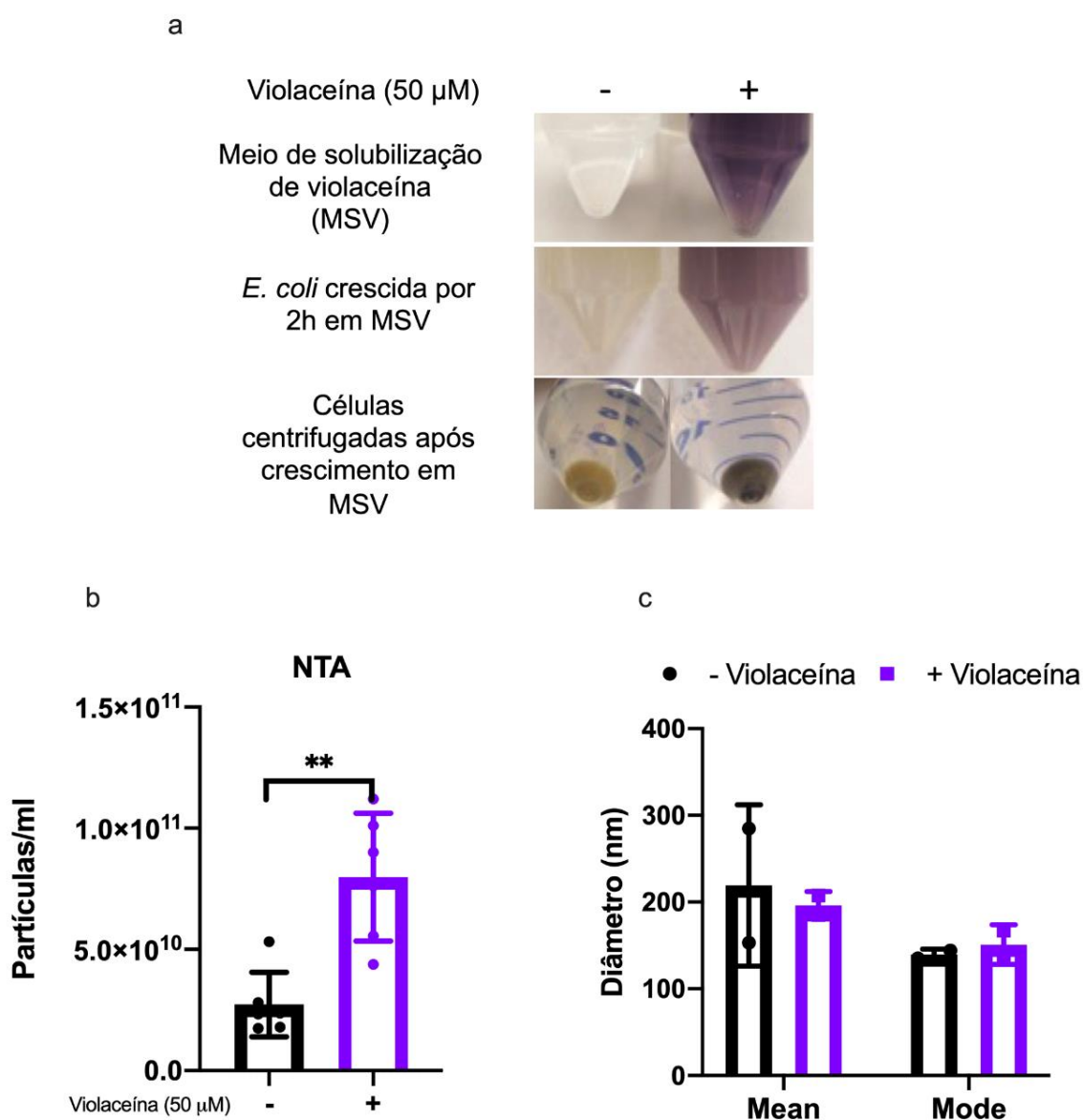


Figura 10. A violaceína induz a liberação de OMVs em *E. coli*. (a) Incorporação de violaceína em células de *E. coli*. Meio de solubilização de violaceína ou culturas de *E. coli* antes e após centrifugação com ou sem exposição à violaceína por 2 h. (b, c) Quantificação de OMVs de *E. coli*. OMVs foram isoladas de sobrenadantes livre de células, tratados ou não com violaceína. (b) Quantificação de OMVs por NTA. (c) Distribuição do tamanho de OMVs medido por NTA. Os valores médios com o erro

padrão são mostrados (n = 2 réplicas biológicas). As diferenças significativas entre os dados foram determinadas pelo teste *two-way* ANOVA.

4.4 O conservado sistema de transporte ABC VacJ/Yrb controla a biogênese de OMVs em *C. violaceum*

Com o intuito de investigar mecanismos adicionais da formação de OMVs em *C. violaceum*, nós focamos no sistema VacJ/Yrb. Em *C. violaceum*, os genes *vacJ* e *yrbBCDEF* estão localizados próximos no genoma (VASCONCELOS et al., 2003) (Fig. 11 a). Nós confirmamos por RT-PCR que o gene *vacJ* é co-transcrito com os genes *yrbB* e *yrbF* (Fig. 11 b), indicando a presença de um operon *yrbFEDCB/vacJ*. O gene *vacJ* é localizado distante dos genes *yrbBCDEF* em várias outras bactérias Gram-negativas, no entanto, esse sistema é encontrado como um operon em *Neisseria*, um gênero filogeneticamente próximo de *C. violaceum* (ROIER et al., 2016) (BAARDA et al., 2019). Essa organização genômica distinta tem o potencial de permitir uma regulação complexa desses genes. Como o sistema de transporte VacJ/Yrb foi recentemente definido como um mecanismo geral para a biogênese de OMVs em bactérias Gram-negativas (ROIER et al., 2016), nós construímos as linhagens mutantes $\Delta vacJ$, $\Delta yrbE$ e $\Delta yrbFEDCB/vacJ$ para descobrir o papel deles na formação de OMVs em *C. violaceum*. De acordo com o que já foi mostrado em outras bactérias (ROIER et al., 2016) (BAARDA et al., 2019), nossa quantificação de OMVs por NTA e conteúdo total de proteína revelou que todos os mutantes mostraram um fenótipo claro de hipervesiculação, especialmente a linhagem $\Delta yrbE$, e que esse fenótipo foi revertido nas linhagens complementadas (Fig. 11 c - e). Além disso, as OMVs produzidas pelas linhagens $\Delta vacJ$ e $\Delta yrbE$ foram menores que as produzidas pela linhagem selvagem (Fig. 11 f). Estes dados indicam que o sistema VacJ/Yrb possui um papel chave na biogênese de OMVs em *C. violaceum*.

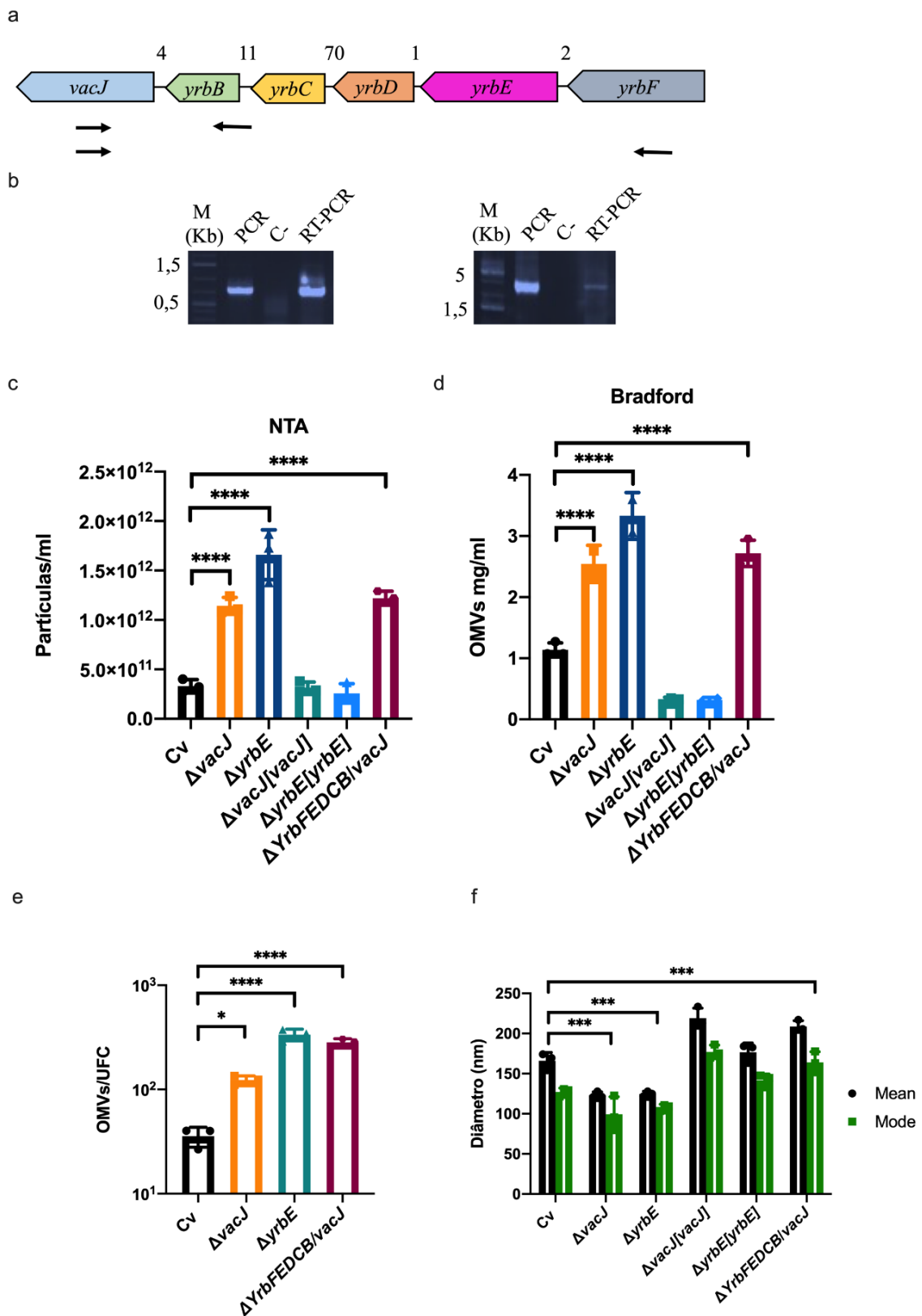


Figura 11. O conservado sistema de transporte ABC VacJ/YrbBCDEF controla a biogênese de OMVs em *C. violaceum*. (a) Organização genômica do sistema *yrbBCDEF/vacJ*. As distâncias intergênicas (não escalonadas) entre as ORFs estão indicadas acima dos genes. (b) Reações de RT-PCR usando oligonucleotídeos que

amplificaram os fragmentos entre *vacJ* e *yrbB* (746 pb; setas acima; painel esquerdo) e entre *vacJ* e *yrbF* (2868 pb; setas abaixo; painel direito). As reações de PCR utilizando os mesmos oligonucleotídeos com DNA genômico ou RNA (C-) foram usadas como controle. **(c - f)** Quantificação de OMVs dos mutantes *vacJ/yrb*. OMVs derivadas de culturas de fase estacionária de *C. violaceum* selvagem e dos mutantes e linhagens complementadas indicados foram isoladas por ultracentrifugação. As linhagens complementadas foram cultivadas sem a adição de antibióticos. **(c)** Quantificação de OMVs por NTA. **(d)** Quantificação de OMVs pelo conteúdo total de proteínas (Bradford). **(e)** Razão do número de OMVs por célula. **(f)** Distribuição do tamanho de OMVs medido por NTA. Os valores médios com o erro padrão são mostrados (n = 3 réplicas biológicas). As diferenças significativas entre os dados foram determinadas pelo teste *one-way* ANOVA e *two-way* ANOVA.

4.5 O sistema de *quorum sensing* Cvil/CviR ajusta a taxa de liberação de vesículas ao regular a biossíntese de violaceína e o sistema VacJ/Yrb

A violaceína é produzida durante a fase estacionária de maneira dependente do sistema de *quorum sensing* Cvil/CviR (DURÁN et al., 2016). Consistente com o mutante Δ *vioABCDE*, as linhagens mutantes Δ *cvil* e Δ *cvir* que não produzem violaceína devido à ausência da sinalização via *quorum sensing*, também produziram menos OMVs que a linhagem selvagem (Fig. 9 a – c), sugerindo que o *quorum sensing* afeta a biogênese de vesículas ao regular a produção de violaceína em *C. violaceum*. Como nossos dados indicaram que a taxa de liberação de OMVs diminui durante a fase estacionária (Fig. 4 e) e que os mutantes *vio* e *yrb* mostraram um fenótipo de vesiculação inverso (Fig. 9 e 11), nós então investigamos se essas duas vias de vesiculação são reguladas pelo sistema de *quorum sensing* Cvil/CviR de *C. violaceum*.

Para isso, foram feitas construções contendo os promotores dos operons *vioABCDE* e *yrbFEDCB/vacJ* fusionados ao gene repórter *lacZ*, e essas construções foram introduzidas na *C. violaceum* selvagem e nos mutantes Δ *cvil* e Δ *cvir* para a realização do ensaio de quantificação da atividade da β -galactosidase. O operon *vioABCDE* foi ativado durante a fase estacionária de forma dependente do *quorum sensing* (Fig. 12 a), como previamente descrito (STAUFF; BASSLER, 2011). A expressão do operon *yrbFEDCB/vacJ* foi alta

durante a fase exponencial e aumentou ainda mais durante a fase estacionária nas linhagens selvagem e mutante $\Delta cviI$. Na linhagem $\Delta cviR$, a expressão do operon *yrbFEDCB/vacJ* foi diminuída em comparação com a linhagem selvagem tanto na fase exponencial quanto na estacionária (Fig. 12 a). Nossos dados parecem indicar um perfil de expressão distinto do operon *yrbFEDCB/vacJ* em $\Delta cviI$ e $\Delta cviR$, um mecanismo regulatório já descrito em outros sistemas de *quorum sensing* do tipo LuxIR (MUKHERJEE et al., 2017). Portanto, tanto o operon *yrbFEDCB/vacJ* quanto o *vioABCDE* são induzidos em alta densidade celular devido a uma ativação total (*vio*) ou parcial (*yrb*) do sistema de *quorum sensing* CviI/CviR.

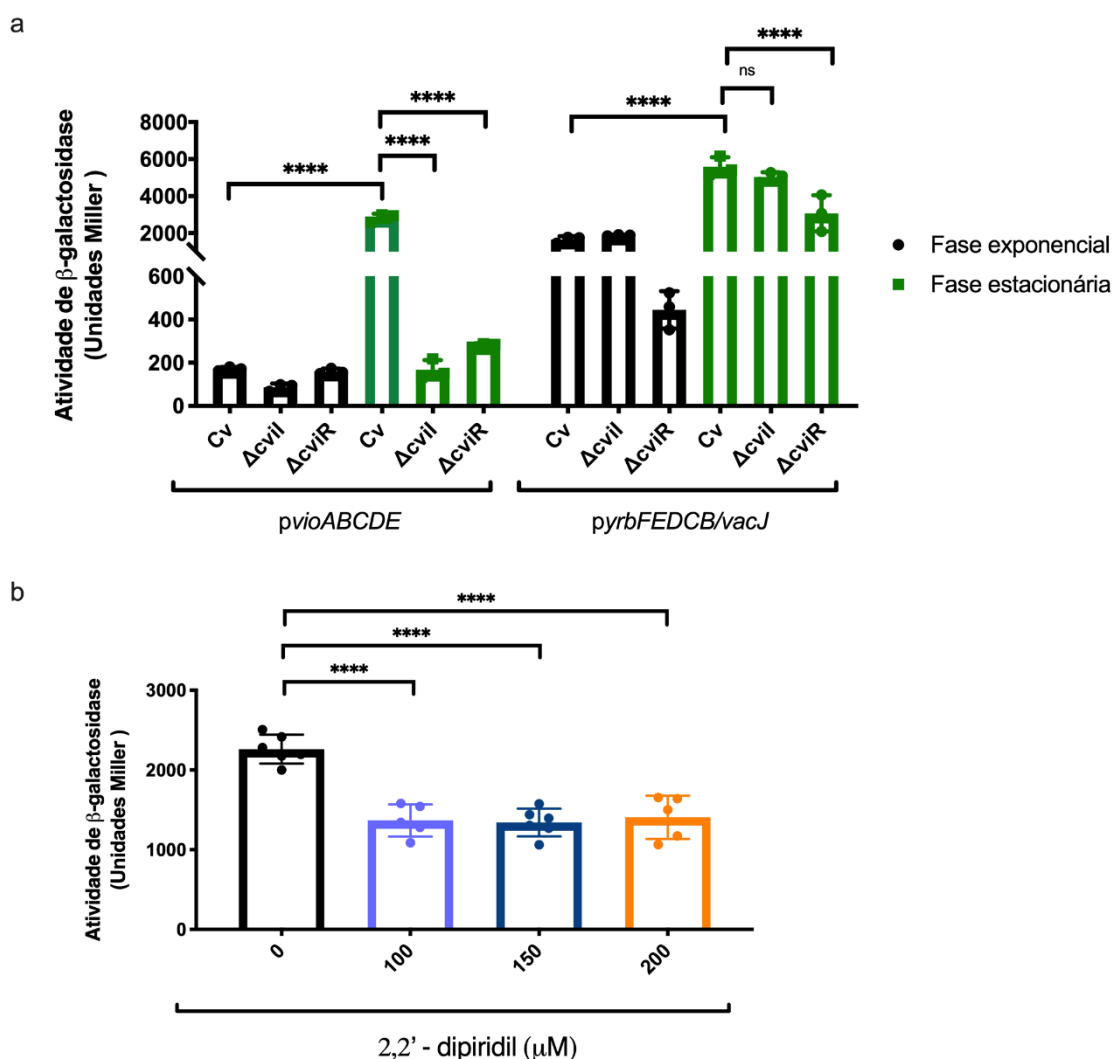


Figura 12. Os operons *yrbFEDCB/vacJ* e *vioABCDE* são induzidos em alta densidade celular e regulados por *quorum sensing*. (a) As atividades dos promotores dos operons indicados foram determinadas durante a fase de crescimento exponencial ($DO_{600nm} \sim 1$) e estacionária ($DO_{600nm} \sim 5$) pelo ensaio de quantificação de

β -galactosidase. **(b)** A limitação de ferro causa a diminuição da expressão do operon *yrbFEDCB/vacJ*. Culturas de *C. violaceum* selvagem ($DO_{600nm} \sim 1$) foram tratadas com ou sem o quelante de ferro 2,2'-dipiridil, e a atividade do promotor do operon *yrbFEDCB/vacJ* foi determinada pelo ensaio de quantificação de β -galactosidase. Os valores médios com o erro padrão são mostrados ($n = 3$ réplicas biológicas). As diferenças significativas entre os dados foram determinadas pelo teste *two-way* ANOVA.

Juntos, nossos dados sugerem que *C. violaceum* possui uma taxa menor de vesiculação durante a fase estacionária devido à alta expressão do sistema geral de vesiculação VacJ/Yrb. No entanto, a violaceína altamente expressa nessas condições opera como uma via secundária para a liberação de OMVs para sua própria secreção. Dessa forma, o *quorum sensing* afeta a produção de OMVs ao regular duas vias antagonistas, a biossíntese de violaceína e o sistema VacJ/Yrb (Fig. 13). Além disso, nós demonstramos que o operon *yrbFEDCB/vacJ* apresentou expressão diminuída em uma condição em que *C. violaceum* cresceu sob limitação de ferro (Fig. 12 b), assim como já foi demonstrado em outras bactérias (ROIER et al., 2016) (BAARDA et al., 2019).

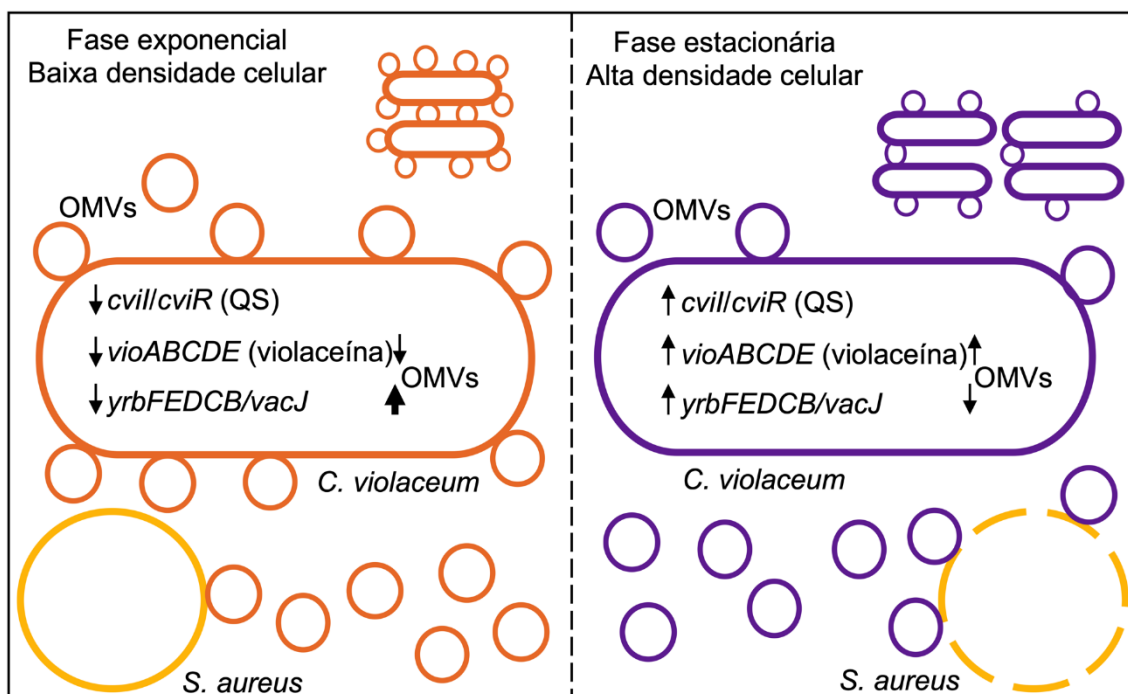


Figura 13. *Chromobacterium violaceum* ajusta a taxa de liberação de OMVs de maneira dependente da densidade celular para secretar violaceína contra bactérias competidoras. Durante a fase exponencial, as bactérias em baixa densidade

celular possuem uma alta taxa de vesiculação devido à baixa expressão do sistema VacJ/Yrb. Essas OMVs desprovidas de violaceína não causam dano à bactérias Gram-positivas. Já durante a fase estacionária, a taxa de liberação de OMVs é diminuída devido ao aumento da expressão do sistema VacJ/Yrb. Contudo, o sistema de *quorum sensing* Cvil/CviR ativa a produção de violaceína, um composto antimicrobiano hidrofóbico que induz a liberação de vesículas para sua própria secreção. As OMVs contendo violaceína são efetivas para inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas. As setas verticais indicam os níveis de expressam dos sistemas (esquerda) e o efeito na liberação de OMVs (direita).

4.6 Os mutantes do sistema VacJ/Yrb, $\Delta vacJ$ e $\Delta yrbE$, apresentam desempenho regular em condições padrão de cultivo

O sistema de transporte ABC VacJ/Yrb controla a manutenção da assimetria de fosfolípidios presentes na membrana externa de bactérias Gram-negativas (MALINVERNI; SILHAVY, 2009). Dessa maneira, como a membrana externa é fundamental para as funções normais de uma célula bacteriana, nós perguntamos se os mutantes $\Delta vacJ$ e $\Delta yrbE$ de *C. violaceum* poderiam apresentar algum problema no crescimento, viabilidade, motilidade e morfologia. Nossos dados mostraram que a deleção dos genes *vacJ* ou *yrbE* não afetou o crescimento das linhagens mutantes em meio LB ou M9 (Fig. 14 a – b). Além disso, as linhagens mutantes apresentaram viabilidade e colônias com tamanho regulares, comparado à linhagem selvagem (Fig. 14 c – d), e movimentação por flagelo preservada (Fig. 14 e). A forma celular do mutante $\Delta vacJ$ mostrou-se semelhante à da linhagem de *C. violaceum* selvagem, no entanto o mutante $\Delta yrbE$ apresentou-se como um bastonete mais alongado (Fig. 14 f). De fato, mutantes do sistema VacJ/Yrb em outras bactérias apresentam morfologias diferentes entre si (BAARDA et al., 2019) (PALMER et al., 2020). Juntos, esses dados revelaram que a mutação nos genes do sistema de transporte ABC VacJ/Yrb não comprometeu a sobrevivência dos mutantes quando cultivados em condições padrão de laboratório.

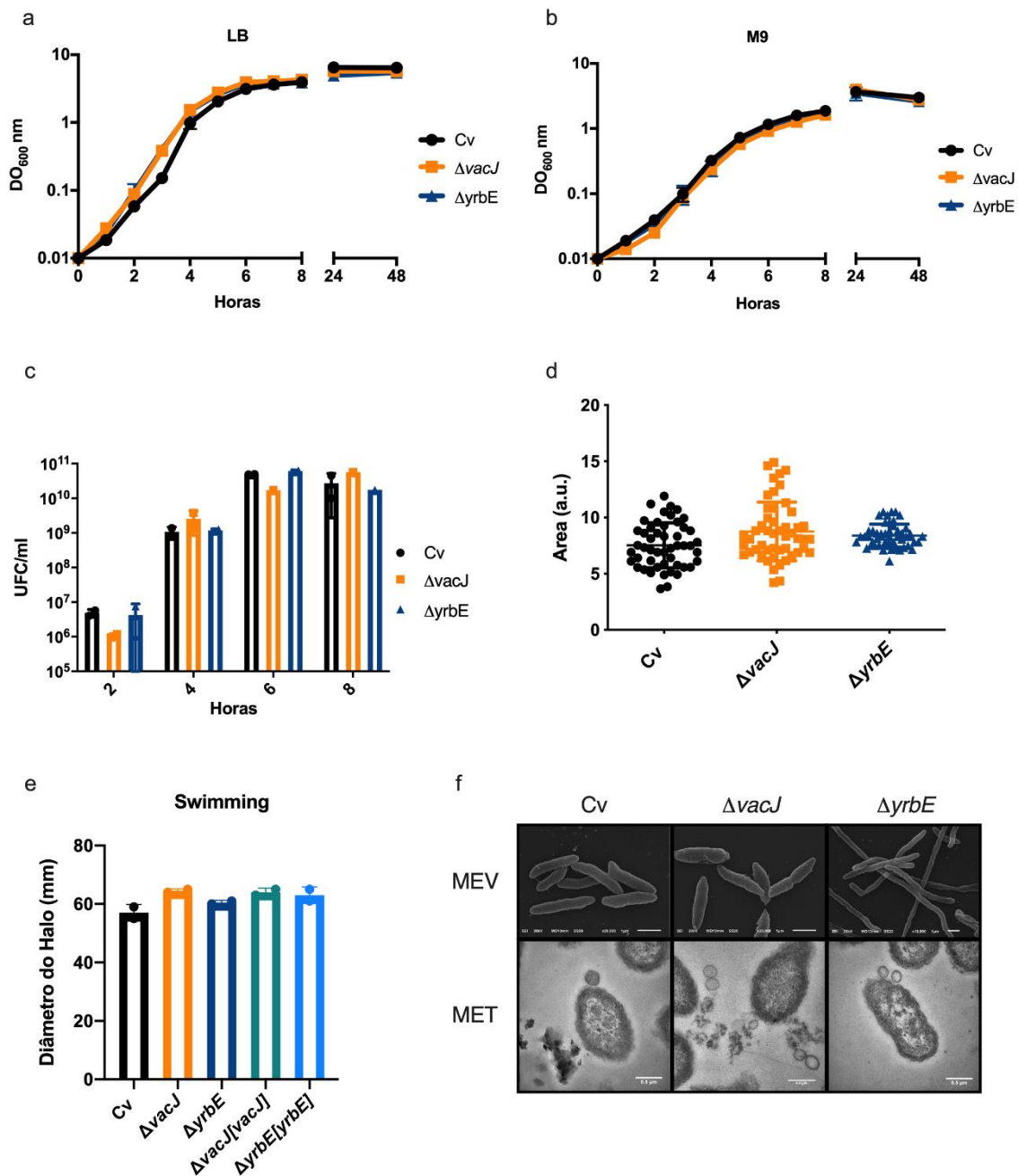


Figura 14. Os mutantes $\Delta vacJ$ e $\Delta yrbE$ apresentam crescimento, viabilidade e motilidade regulares. (a) Curva de crescimento em LB. **(b)** Curva de crescimento em M9. Cv e os mutantes $\Delta vacJ$ e $\Delta yrbE$ foram cultivados nos meios indicados e o crescimento foi medido por 48 h utilizando absorbância a DO_{600nm}. **(c)** Quantificação de UFCs. As linhagens indicadas foram cultivadas em LB pelas horas indicadas, e em seguida, foram feitas diluições seriadas e plaqueamento em LB para quantificação de UFCs. **(d)** Quantificação da área das colônias. Cv e os mutantes $\Delta vacJ$ e $\Delta yrbE$ foram plaqueados em LB e após 24 h de cultivo, a área das colônias foi determinada utilizando o programa Image J. **(e)** Quantificação da movimentação por flagelo. Cv e os mutantes

$\Delta vacJ$ e $\Delta yrbE$ foram inoculados em placas M9 ágar 0,3% e o halo de espalhamento de cada linhagem foi medido após 96 h. (f) Microscopia eletrônica de varredura (painel superior) e de transmissão (painel inferior) das linhagens indicadas.

4.7 Os genes *vacJ* e *yrbE* promovem resistência a estresses que atuam no envelope celular

Nossos dados acima revelaram que a deleção dos genes $\Delta vacJ$ e $\Delta yrbE$ não prejudicou o crescimento das linhagens mutantes. No entanto, em várias outras bactérias Gram-negativas como *E. coli* e *Acinetobacter baumannii*, ambos os genes são importantes para o crescimento da bactéria frente a agentes que causam estresse no envelope celular (MALINVERNI; SILHAVY, 2009) (PALMER et al., 2020). Para testar se o sistema VacJ/Yrb contribui para a manutenção do envelope celular de *C. violaceum*, as linhagens mutantes $\Delta vacJ$ e $\Delta yrbE$ foram cultivadas em LB contendo 0,5% de sais biliares ou 0,05% SDS/0,5 mM EDTA. Tanto a linhagem mutante $\Delta vacJ$ quanto a $\Delta yrbE$ tiveram o crescimento inibido quando desafiadas com sais biliares, e as linhagens complementadas de cada gene recuperaram o fenótipo da linhagem selvagem (Fig. 15 a). Em SDS/EDTA, a linhagem mutante $\Delta yrbE$ teve o crescimento totalmente inibido, enquanto o mutante $\Delta vacJ$ teve inibição até 8 h, mas recuperou-se e atingiu crescimento similar ao da linhagem selvagem em 24 h (Fig. 15 b). Tais fenótipos podem ser explicados pelo fato de que a ausência dos genes *vacJ* e *yrbE* implica no acúmulo de fosfolipídios no folheto externo da membrana externa (MALINVERNI; SILHAVY, 2009), e dessa forma, torna a membrana externa mais suscetível à agentes surfactantes, como os sais biliares e o SDS. Além disso, o dado de que o mutante $\Delta yrbE$ é ainda mais sensível ao tratamento com SDS/EDTA pode ser explicado devido à um possível acúmulo ainda maior de fosfolipídios na membrana externa em relação ao mutante $\Delta vacJ$, pois o $\Delta yrbE$ apresenta uma taxa de vesiculação maior do que o $\Delta vacJ$ (Fig. 11 c – e). Curiosamente, as linhagens mutantes $\Delta vacJ$ e $\Delta yrbE$ foram mais resistentes do que a linhagem selvagem quando tratadas com o antibiótico polimixina (Fig. 15 c). O tratamento com polimixina também pode indicar um possível problema em relação à permeabilidade da membrana externa, uma vez que este antibiótico se

liga no lipídio A da molécula de LPS (MORRISON; JACOBS, 1976). Uma explicação para este fenótipo pode ser devido à hipervesiculação dos mutantes $\Delta vacJ$ e $\Delta yrbE$, pois ao liberarem mais vesículas no ambiente extracelular, estas partículas podem se ligar ao antibiótico e assim proteger a célula. Dessa forma, nossos dados mostraram que o sistema de transporte ABC VacJ/Yrb é importante para a manutenção da integridade do envelope celular frente a agentes que causam estresse na membrana externa.

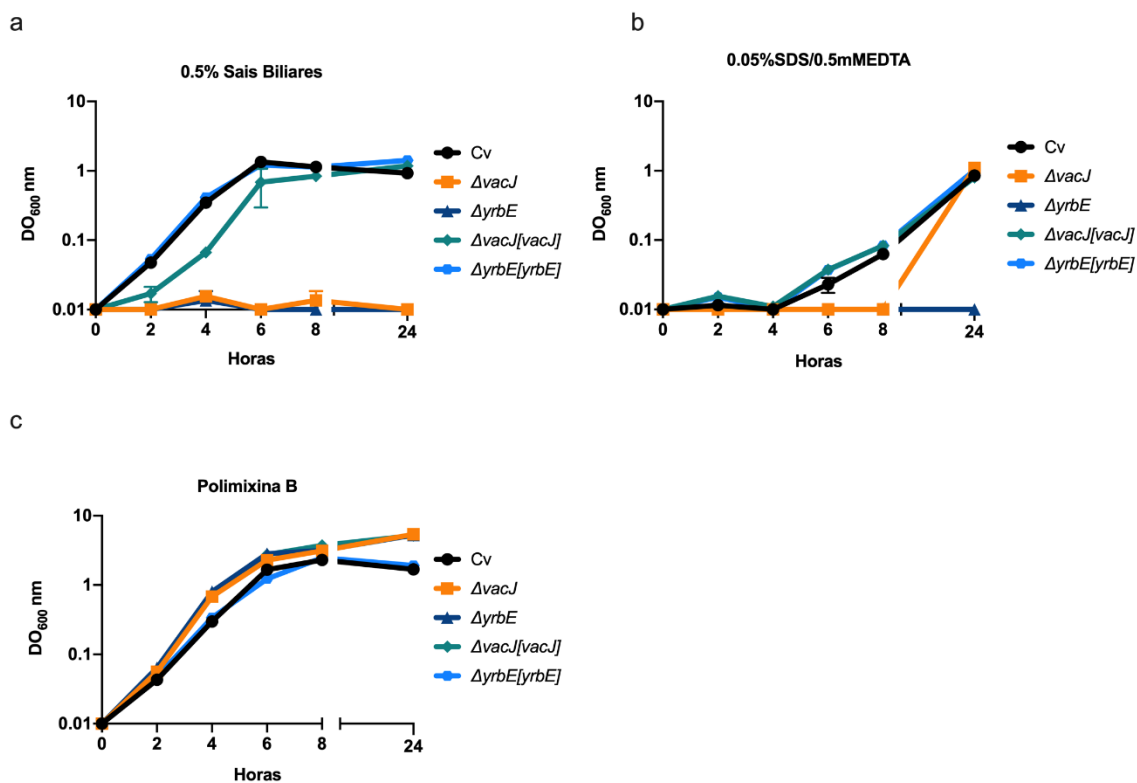


Figura 15. Os mutantes $\Delta vacJ$ e $\Delta yrbE$ de *C. violaceum* apresentam problemas no crescimento quando submetidos a agentes estressores de membrana. Curvas de crescimento de *C. violaceum* selvagem, mutantes $\Delta vacJ$ e $\Delta yrbE$ e linhagens complementadas em meio LB contendo (a) 0,5% de sais biliares, (b) 0,05% SDS/0,5 mM EDTA e (c) polimixina B 200 μ g/ml. O crescimento das linhagens foi medido por 24 h utilizando absorbância a DO_{600nm}.

4.8 Análise quantitativa do perfil proteômico de OMVs de *C. violaceum* selvagem e do mutante $\Delta yrbE$ indica diminuição na diversidade de proteínas secretadas

Análises do perfil proteômico de OMVs de diversas espécies bacterianas revelaram variadas proteínas importantes para a fisiologia e virulência de bactérias (ALTINDIS; FU; MEKALANOS, 2014) (ROIER et al., 2016) (BAARDA, et al., 2018). Assim, para identificarmos em OMVs possíveis proteínas importantes para *C. violaceum*, submetemos as OMVs de *C. violaceum* selvagem e do mutante $\Delta yrbE$ à análise proteômica por espectrometria de massas (Figura 16; Tabela 5 e 6). Nossa análise revelou que *C. violaceum* selvagem e o mutante $\Delta yrbE$ secretam OMVs contendo diversas proteínas que são encontradas nos diferentes compartimentos celulares, sobretudo na membrana externa (Fig. 16 a; Tabela 5 e 6). No entanto, as OMVs derivadas do mutante $\Delta yrbE$ apresentaram menor diversidade de proteínas, como mostrado pela análise do número total dos tipos de peptídeos encontrados nas amostras das linhagens testadas (Fig. 16 b), assim como pela análise da diversidade de peptídeos que foram identificados significativamente diferentes nas OMVs do mutante $\Delta yrbE$ em relação à *C. violaceum* selvagem (Fig. 16 c). Apesar da diversidade de proteínas encontradas nas OMVs do mutante $\Delta yrbE$ ter sido menor, a abundância média de peptídeos encontradas nas OMVs do mutante foi maior, comparado à linhagem selvagem (Fig. 16 a).

Nossos dados de proteômica indicaram que proteínas oriundas do citosol e membrana interna também podem ser encontradas em OMVs (Figura 16 a; Tabela 5 e 6), apesar de as OMVs terem sido submetidas à rigorosas etapas de purificação, como a purificação por ultracentrifugação seguida de uma purificação por gradiente de densidade (ver Material e Métodos). Um recente trabalho indicou que bactérias Gram-negativas também liberam OIMVs (do inglês, *outer intern membrane vesicles*), que podem secretar conteúdo citossólico e de membrana interna, e que estas possuem a mesma densidade e tamanho de OMVs. No entanto, ainda não há metodologias disponíveis para isolar OMVs de OIMVs (TOYOFUKU; NOMURA; EBERL, 2019). Dessa forma,

nós especulamos que as proteínas de membrana interna e citossólicas encontradas em nossas análises podem ser derivadas de OIMVs de *C. violaceum* e não apenas oriundas de contaminação. Juntos, nossos dados de proteômica indicaram que o sistema de transporte ABC VacJ/Yrb, de alguma forma, impacta algum mecanismo responsável pela correta distribuição de proteínas em OMVs.

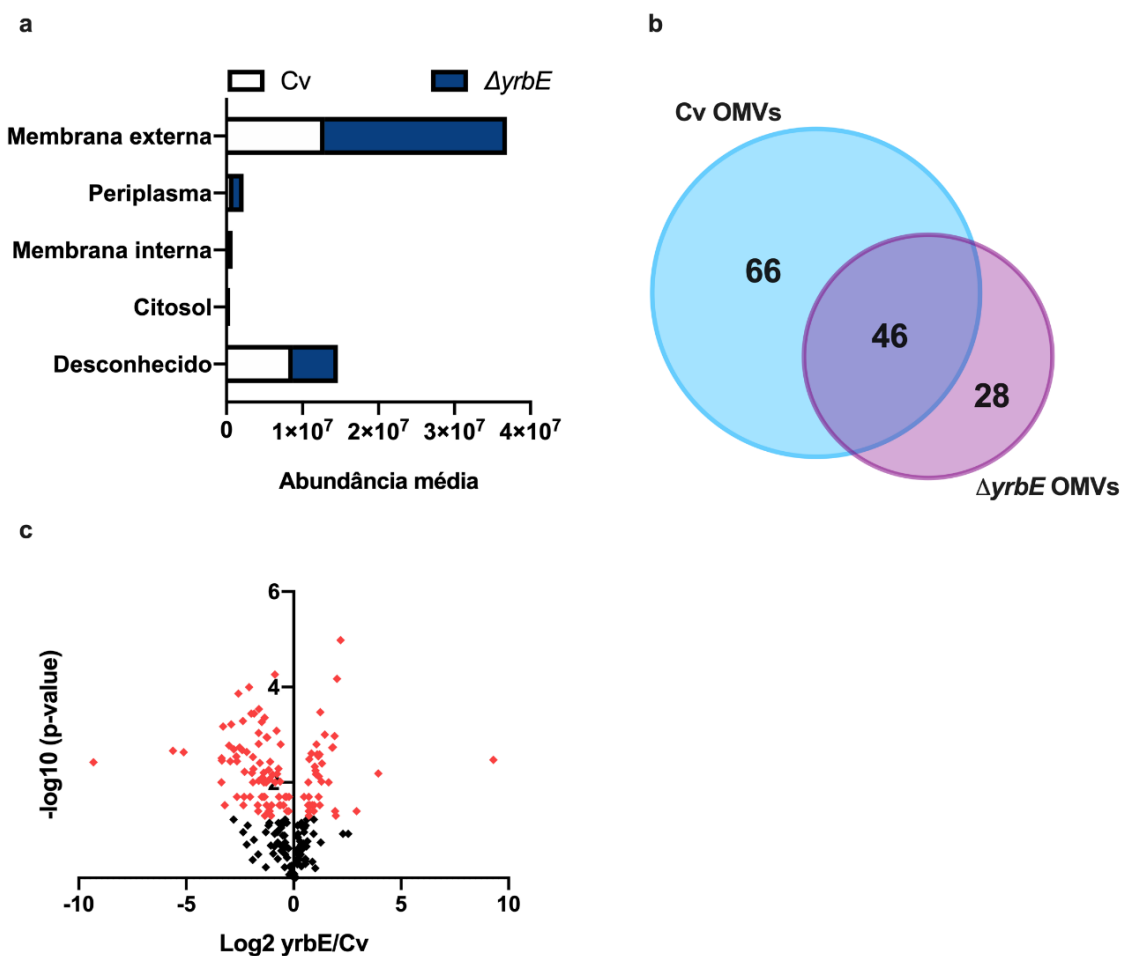


Figura 16. Sub-localização celular e distribuição das proteínas identificadas nas OMVs de *C. violaceum* selvagem e do mutante $\Delta yrbE$. (a) Análise da localização celular das proteínas identificadas nas OMVs de *C. violaceum* selvagem e do mutante indicado. (b) Diagrama de Venn indicando a diversidade total de proteínas identificadas apenas na linhagem selvagem e no mutante $\Delta yrbE$ ou em ambas as linhagens. (c) Diagrama vulcão indicando a diversidade das proteínas encontradas nas OMVs da linhagem selvagem comparado ao mutante $\Delta yrbE$ que foram significativamente diferentes.

Tabela 5. Lista das proteínas mais abundantes nas OMVs da linhagem mutante $\Delta yrbE$ em relação as OMVs da linhagem selvagem.

No	Gene ID	Anotação da proteína	PSORTB localização prevista	P value	Fold change	Abundância média normalizada	
						WT	$\Delta yrbE$
1	CV_3104	Proteína de membrana externa	Membrana externa	7.44e-003	+ 2.24	6.35e+006	1.42e+007
2	CV_3424	OmpC	Membrana externa	0.03	+ 1.59	5.61e+006	8.94e+006
3	CV_2061	MucD (tipo DegP)	Periplasmática	0.01	+ 3.08	1.66e+005	5.12e+005
4	CV_3829	Proteína de membrana externa	Membrana externa	0.03	+ 1.84	7.00e+004	1.28e+005
5	CV_0656	Hemolisina	Periplasmática	0.04	+ 1.63	7.10e+004	1.16e+005
6	CV_4304	Desconhecido	Desconhecido	1.60e-003	+ 2.09	1.28e+005	2.67e+005
7	CV_4103	OmpW	Membrana externa	6.76e-003	+ 2.05	8.87e+004	1.82e+005
8	CV_3354	Serina protease	Membrana citoplasmática	0.04	+ 1.65	3.52e+004	5.82e+004
9	CV_1811	Lipoproteína PAL	Membrana externa	2.46e-003	+ 1.77	1.12e+005	1.99e+005
10	CV_3305	Desconhecido	Desconhecido	1.06e-003	+ 3.78	3.06e+004	1.15e+005
11	CV_4364	Chaperona Copper	Desconhecido	1.82e-003	+ 3.55	2.43e+004	8.63e+004
12	CV_0120	Transportador ABC	Periplasmática	2.59e-003	+ 2.3	4.73e+004	1.09e+005
13	CV_1891	Proteína de membrana externa	Membrana externa	3.37e-004	+ 2.35	5.39e+004	1.27e+005
14	CV_3535	BamB	Membrana externa	0.03	+ 1.7	2.23e+004	3.79e+004
15	CV_4195	Proteína ribossomal 50S	Citoplasmática	9.55e-003	+ 1.55	5701.05	3689.39
16	CV_1275	Transportador ABC	Periplasmática	0.01	+ 1.61	3.82e+004	6.14e+004
17	CV_3183	Proteína de transporte de ácido graxo de cadeia longa (fadL)	Membrana externa	0.05	+ 3.87	2.15e+004	8.34e+004
18	CV_3119	DsbC	Periplasmática	4.66e-003	+ 1.98	1.88e+004	3.72e+004
19	CV_3276	Ycel (Proteína de ligação à lipídio)	Desconhecido	3.99e-003	+ 2.49	2.89e+004	7.21e+004
20	CV_3986	T6SS VgrG	Citoplasmática	0.04	+ 7.63	798.25	6086.99
21	CV_0223	Desconhecido	Desconhecido	5.67e-003	+ 2.03	4.99e+004	1.01e+005

22	CV_2297	Lipoproteína	Membrana citoplasmática	0.03	+ 2.33	7288.53	1.70e+004
23	CV_4286	Fosfolipase C	Periplasmática	6.72e-003	+ 2.08	2100.11	4363.75
24	CV_1253	mltD	Desconhecido	0.04	+ 3.8	2619.31	9948.29
25	CV_1470	Desconhecido	Extracelular	6.50e-003	+ 15.3	1.09e+004	1.67e+005
26	CV_2023	Hidrolase	Citoplasmática	1.87e-003	+ 3.46	942.55	3259.97
27	CV_1610	DNA Polimerase III	Citoplasmática	0.04	+ 1.92	2.16e+004	4.14e+004
28	CV_0971	Hidrolase	Desconhecido	2.32e-003	+ 34.69	141.55	4.08
29	CV_2060	MucB	Periplasmática	0.05	+ 1.64	1.21e+004	1.98e+004
30	CV_4162	Proteína ribossomal 30S	Citoplasmática	0.02	+ 2.24	1.13e+004	2.52e+004
31	CV_0068	Colicina	Membrana citoplasmática	9.62e-003	+ 2.45	1.10e+004	2.69e+004
32	CV_0085	Peroxirredoxina	Desconhecido	0.03	+ 1.82	2.72e+004	4.95e+004
33	CV_3067	Desconhecido	Citoplasmática	0.03	+ 1.66	6064.31	1.01e+004

Tabela 6. Lista das proteínas menos abundantes nas OMVs da linhagem mutante $\Delta yrbE$ em relação as OMVs da linhagem selvagem.

No	Gene ID	Anotação da proteína	PSORTB localização prevista	P value	Fold change	Abundância média normalizada	
						WT	$\Delta yrbE$
1	CV_0409	Bacteriófago	Desconhecido	1.86e-003	- 5.73	1.91e+006	3.33e+005
2	CV_2128	Bacteriófago	Desconhecido	2.87e-003	- 6.37	6.92e+005	1.09e+005
3	CV_1539	Transportador ABC	Periplasmática	0.03	- 2.4	4.83e+004	2.01e+004
4	CV_4196	Proteína ribossomal 50S	Citoplasmática	1.13e-003	- 2.39	4.72e+004	1.97e+004
5	CV_0405	Transportador ABC	Periplasmática	5.49e-003	- 2.24	4.91e+004	2.19e+004
6	CV_0998	Lipase	Membrana externa	3.70e-003	- 2.14	2.42e+004	1.13e+004
7	CV_0506	LptE	Desconhecido	3.48e-003	- 10.1	1.64e+005	1.62e+004
8	CV_2481	Transportador ABC	Periplasmática	1.59e-003	- 1.52	9.71e+004	6.39e+004
9	CV_1646	Proteína de membrana externa	Membrana externa	0.03	- 1.58	5.75e+004	3.63e+004

10	CV_3982	Lipoproteína do T6SS (TssJ)	Desconhecido	5.48e-005	- 1.83	9.64e+004	5.28e+004
11	CV_3977	T6SS Hcp	Extracelular	0.02	- 2.55	1.33e+004	5221.66
12	CV_1918	Hemolisina	Membrana externa	2.89e-004	- 3.05	2.22e+004	7254.38
13	CV_2554	Proteína tipo histona	Citoplasmática	0.02	- 1.32	1.52e+004	1.16e+004
14	CV_2728	Oxirredutase	Citoplasmática	5.38e-004	- 2.8	3.57e+004	1.28e+004
15	CV_0110	Proteína associada a peptidoglicanos (pal)	Membrana externa	0.03	- 1.38	9.66e+004	6.98e+004
16	CV_4171	Proteína ribossomal 50S	Citoplasmática	0.02	- 1.6	2.07e+004	1.29e+004
17	CV_4173	Proteína ribossomal 30S	Citoplasmática	0.03	- 2.04	1.67e+004	8199.27
18	CV_3681	Peptidase	Periplasmática	1.14e-003	- 2.34	3.86e+004	1.65e+004
19	CV_0588	ilvC	Citoplasmática	0.05	- 2.54	7.25e+004	2.86e+004
20	CV_3399	Bacterioferritina	Citoplasmática	6.32e-003	- 3.85	5.18e+004	1.35e+004
21	CV_3765	Proteína ribossomal 30S	Citoplasmática	0.01	- 2.4	2.85e+004	1.34e+004
22	CV_3298	Maltoporina	Membrana externa	0.01	- 1.82	2.44e+004	1.34e+004
23	CV_3294	HtrA (tipo DegP)	Periplasmática	3.90e-003	- 2.98	3.07e+004	1.03e+004
24	CV_4161	Proteína ribossomal 30S	Citoplasmática	7.88e-003	- 2.72	5.02e+004	1.84e+004
25	CV_0345	Bacteriófago	Desconhecido	0.02	- 4.93	7888.91	1599.82
26	CV_1173	Cytochromo-c oxidase	Citoplasmática	2.31e-003	- 4.55	3.44e+004	7562.74
27	CV_1363	HvrA	Citoplasmática	8.28e-004	- 1.73	9550.49	5514.28
28	CV_4181	Proteína ribossomal 50S	Citoplasmática	1.38e-004	- 5.97	2.72e+004	4561.79
29	CV_0441	Hidrolase	Desconhecido	1.55e-003	- 3.09	1.45e+004	4698.21
30	CV_2914	pepA (aminopeptidase)	Citoplasmática	5.96e-003	- 4.88	2.45e+004	5019.21
31	CV_2196	Proteína ribossomal 30S	Citoplasmática	0.01	- 2.59	7490.92	2893.61
32	CV_1067	SdhA	Membrana citoplasmática	0.03	- 5.07	4212.48	830.88
33	CV_1496	AruC	Citoplasmática	0.03	- 3.19	5853.09	1836.24

34	CV_3638	Proteína ribossomal 50S	Citoplasmática	5.20e-003	- 3.67	1.44e+005	3.93e+004
35	CV_1070	GtlA	Citoplasmática	0.05	- 2.06	1.33e+004	6434.80
36	CV_4159	Proteína ribossomal 30S	Citoplasmática	0.02	- 2.64	3.01e+004	1.14e+004
37	CV_0289	Glutathiona S-transferase	Citoplasmática	0.01	- 2.44	2.16e+004	8860.36
38	CV_2193	BamD	Membrana externa	5.18e-003	- 1.63	1.69e+004	1.04e+004
39	CV_0540	Hidrolase	Citoplasmática	0.02	- 4.08	7316.43	1794.38
40	CV_3998	DsbA	Periplasmática	0.04	- 2.18	1.46e+005	6.71e+004
41	CV_2120	Desconhecido	Desconhecido	6.84e-003	- 1.97	3.75e+004	1.91e+004
42	CV_3542	Kinase difosfato nucleosidase	Extracelular	2.93e-003	- 3.71	1.33e+004	3585.95
43	CV_4185	Proteína ribossomal 50S	Citoplasmática	0.02	- 1.26	4290.67	3407.96
44	CV_1351	Proteína ribossomal 50S	Citoplasmática	0.02	- 2.8	5179.96	1851.55
45	CV_4163	Proteína ribossomal 30S	Citoplasmática	9.31e-003	- 3.1	2.47e+004	7978.12
46	CV_4168	Proteína ribossomal 50S	Citoplasmática	6.29e-003	-2.64	1.16e+004	4404.41
47	CV_3817	Flavoproteína	Desconhecido	3.10e-003	- 10.21	8590.05	841.22
48	CV_0691	Regulador transcricional	Citoplasmática	0.01	- 3.73	3080.35	826.71
49	CV_3675	Proteína ribossomal 30S	Citoplasmática	3.62e-004	- 3.59	2.51e+004	6995.90
50	CV_3640	Proteína ribossomal 30S	Citoplasmática	6.65e-003	-1.71	9596.30	5606.45
51	CV_2740	Desconhecido	Desconhecido	3.61e-003	- 7.73	3.10e+005	4.00e+004
52	CV_2736	Quitinase	Desconhecido	3.79e-003	- 636.42	4986.12	7.83
53	CV_3696	Proteína ribossomal 30S	Citoplasmática	4.41e-004	- 2.55	2.27e+004	8898.37
54	CV_4172	Proteína ribossomal 30S	Citoplasmática	8.67e-003	- 2.19	4508.77	2059.44
55	CV_1286	GlyA	Citoplasmática	0.01	- 2.62	1182.58	450.53
56	CV_3921	ArgB	Citoplasmática	3.60e-003	- 6.24	1.57e+004	2520.31
57	CV_4167	Proteína ribossomal 50S	Citoplasmática	6.73e-004	- 9.7	1218.36	125.61

58	CV_2084	CaiA	Citoplasmática	9.14e-004	- 3.09	9.26e+004	3.00e+004
59	CV_3525	AcpA	Extracelular	0.03	- 9.26	210.26	22.71
60	CV_4176	Proteína ribossomal 50S	Citoplasmática	5.14e-004	- 5.15	2610.28	507.03
61	CV_0502	Desconhecido	Desconhecido	0.02	- 6.25	6699.40	1072.05
62	CV_3226	Fosfolipídio sintase	Citoplasmática	2.09e-003	- 5.24	636.53	121.49
63	CV_0699	Regulador transcricional da família LysR	Membrana citoplasmática	2.17e-003	- 49.06	2835.88	57.81

4.9 As OMVs de *C. violaceum* selvagem e dos mutantes $\Delta vacJ$ e $\Delta yrbE$ induzem secreção de citocinas pró-inflamatórias e citotoxicidade

As OMVs derivadas de variadas espécies bacterianas podem interagir diretamente com diferentes populações de células do sistema imune, como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. Em macrófagos, as OMVs de espécies patogênicas podem induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias (KAPARAKIS-LIASKOS; FERRERO, 2015). Para avaliar o potencial imunomodulatório das OMVs de *C. violaceum*, culturas de macrófagos RAW 246.7 foram desafiadas com 10^8 OMVs da linhagem selvagem e dos mutantes $\Delta vacJ$ e $\Delta yrbE$. Nossos dados revelaram que as OMVs de *C. violaceum* selvagem, assim como as OMVs isoladas das linhagens mutantes $\Delta vacJ$ e $\Delta yrbE$, induziram forte resposta pró-inflamatória, de acordo com a detecção de citocinas como IL-6, TNF- α e IL- β (Fig. 17 a – c). As linhagens complementadas induziram menor secreção de IL-6 e IL- β em relação a linhagem selvagem (Fig. 17 a, c). A secreção de IL-1 β indica a ativação de inflamassomas que induzem piroptose (MAN; KARKI; KANNEGANTI, 2017). De fato, foi demonstrado que OMVs são internalizadas via endocitose por células fagocíticas e dessa forma, induzem a ativação de capase-11 e, conseqüentemente, piroptose (VANAJA et al., 2016). Sendo assim, macrófagos desafiados com uma dose de 10^8 OMVs da linhagem selvagem e dos mutantes $\Delta vacJ$ e $\Delta yrbE$ sofreram morte celular inflamatória, possivelmente piroptose, como indicado pelo ensaio de citotoxicidade através da detecção da enzima lactato desidrogenase (LDH) (Fig.

17 d). Curiosamente, as OMVs derivadas das linhagens mutantes $\Delta vacJ$ e $\Delta yrbE$ induziram pelo menos o dobro de citotoxicidade comparado ao tratamento com as OMVs de *C. violaceum* selvagem e este efeito foi revertido nas linhagens complementadas (Fig. 17 d). Juntos, nossos dados indicaram que as OMVs de *C. violaceum* selvagem, assim como as OMVs isoladas das linhagens mutantes $\Delta vacJ$ e $\Delta yrbE$ podem induzir forte ativação do sistema imune inato, sugerindo que *C. violaceum* deve utilizar mecanismos que permitem rápida fuga do sistema imune para estabelecer a infecção.

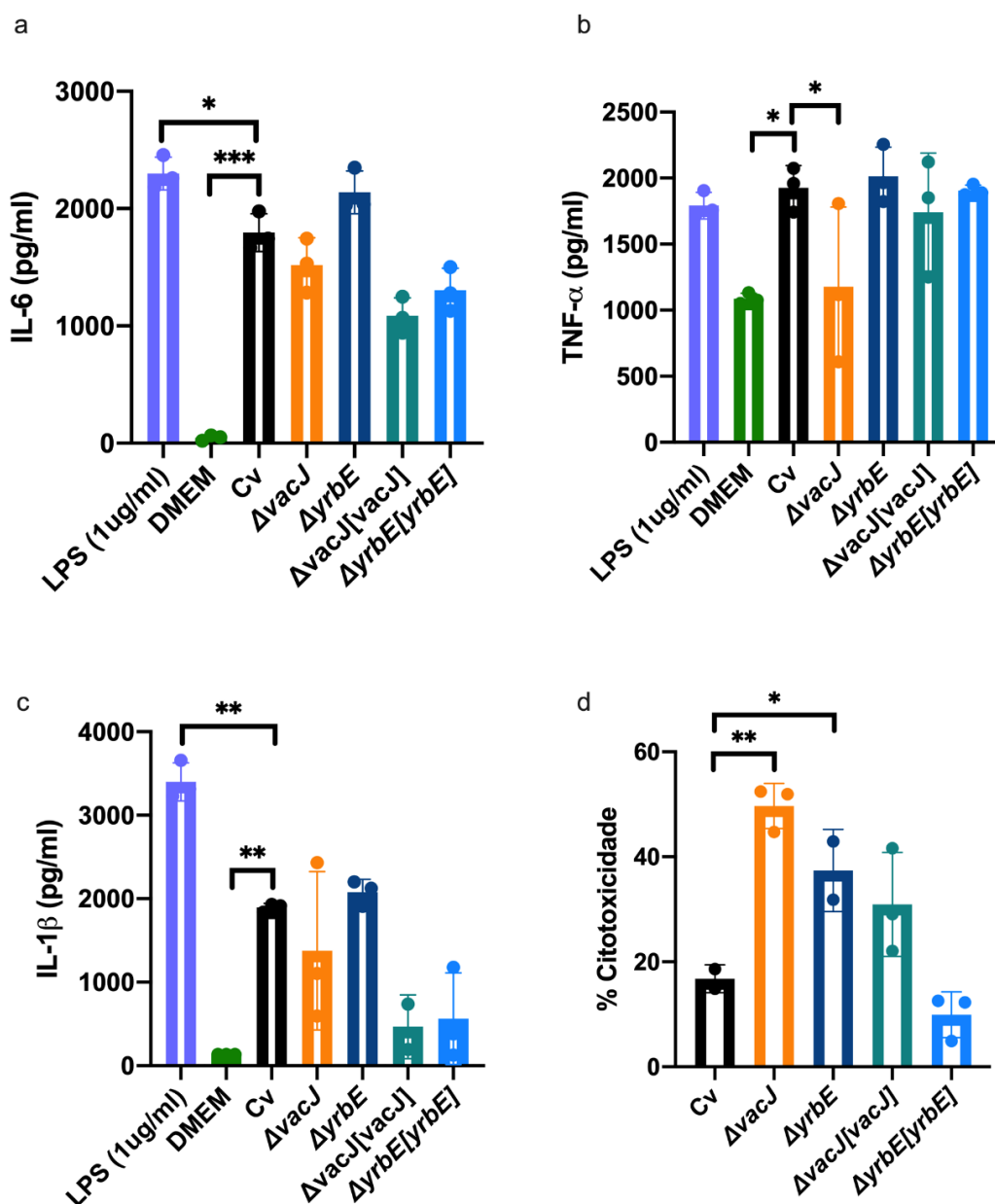


Figura 17. Indução de citocinas pró-inflamatórias e morte celular por OMVs de *C. violaceum* selvagem e dos mutantes $\Delta vacJ$ e $\Delta yrbE$. Macrófagos RAW 246.7 foram desafiados com OMVs isoladas de *C. violaceum* selvagem e dos mutantes $\Delta vacJ$ e

$\Delta yrbE$ por 24 h e a quantificação da produção de **(a)** IL-6 **(b)** TNF- α e **(c)** IL-1 β foi determinada por ELISA. **(d)** Quantificação da citotoxicidade celular mediada por OMVs de *C. violaceum* selvagem e dos mutantes indicados. Os valores médios com o erro padrão são mostrados (n = 3 réplicas biológicas). As diferenças significativas entre os dados foram determinadas pelo teste *one-way* ANOVA.

4.10 O sistema de transporte ABC VacJ/Yrb contribui para invasão celular e virulência de *C. violaceum* em modelo murino

Após a descoberta do sistema VacJ/Yrb, alguns trabalhos descreveram a implicação desses genes para a virulência bacteriana em hospedeiros. No entanto, a função desse sistema durante a patogênese mostra-se divergente entre as bactérias, e além disso, os mecanismos associados ao sistema VacJ/Yrb durante a interação patógeno-hospedeiro ainda são pouco compreendidos. Em bactérias como *S. enterica*, *Shigella flexneri* e *P. aeruginosa*, mutantes do sistema VacJ/Yrb apresentaram problemas durante a invasão celular e o estabelecimento do nicho bacteriano no órgão alvo (SHEN et al., 2012) (CARPENTER et al., 2014) (FOWLER; GALÁN, 2018). Entretanto, deleções no sistema VacJ/Yrb de espécies como *H. influenzae*, *V. cholerae* e *Neisseria gonorrhoeae* promoveram um melhor desempenho das linhagens mutantes em relação à linhagem selvagem durante a infecção (ROIER et al., 2016) (BAARDA et al, 2019). Para avaliar o papel do sistema de transporte ABC VacJ/Yrb na virulência de *C. violaceum*, utilizamos uma abordagem *in vitro* com infecção de células, e *in vivo* com a infecção de camundongos. Os mutantes $\Delta vacJ$ e $\Delta yrbE$ apresentaram citotoxicidade celular semelhante à linhagem selvagem, como observado após a infecção das linhagens bacterianas em culturas de macrófagos primários derivados de medula óssea (BMDM) (Fig. 18 a). Contudo, os mutantes foram menos eficientes quanto à invasão em células Hepa1-6, uma linhagem de células hepáticas (Fig. 18 b), e quanto ao estabelecimento da infecção em camundongos C57BL/6 selvagem, pois os animais sobreviveram após a infecção com os mutantes durante o tempo do experimento (Fig. 18 c), sendo que após 20 h de infecção com os mutantes $\Delta vacJ$ e $\Delta yrbE$, não havia UFCs presentes no fígado dos animais (Fig. 18 d). Os

fenótipos de redução da virulência e da carga bacteriana no fígado foram complementados (Fig. 18 c, d).

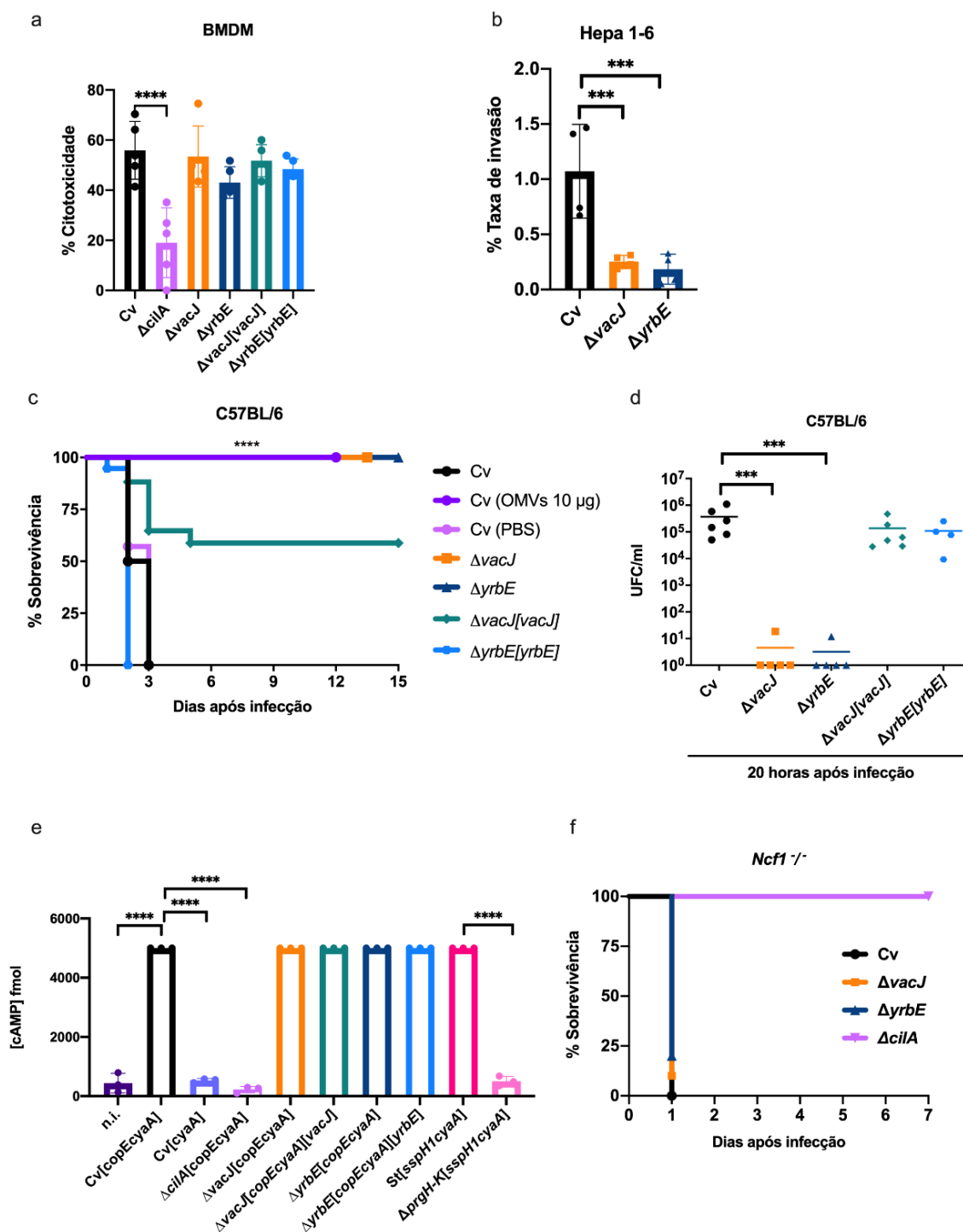


Figura 18. O sistema de transporte ABC VacJ/Yrb é importante para a infecção e sobrevivência de *C. violaceum* no hospedeiro. (a) Ensaio de quantificação da citotoxicidade celular. Cultura de BMDMs foram infectados com *C. violaceum* selvagem, com os mutantes e com as linhagens complementadas indicadas. A morte celular foi

determinada após 1 h de infecção pela detecção da enzima LDH. **(b)** Ensaio de invasão. Células Hepa 1-6 foram infectadas com *C. violaceum* selvagem e os mutantes indicados. Após 1 h de infecção, os hepatócitos foram lisados e o homogeneizado foi plaqueado para contagem de UFCs. **(c)** Curvas de sobrevivência de camundongos C57BL/6 selvagem infectados com *C. violaceum* selvagem e com os mutantes indicados. Os animais foram desafiados com 2×10^6 de cada linhagem de *C. violaceum* por via intraperitoneal. **(d)** Carga bacteriana no fígado de camundongos infectados com linhagens de *C. violaceum*. Os camundongos foram infectados com 2×10^6 de cada linhagem de *C. violaceum*, e após 20 h de infecção, os camundongos foram eutanasiados e os homogeneizados de fígado foram plaqueados para a contagem de UFCs. **(e)** Quantificação da eficiência do T3SS. Células HeLa foram desafiadas com as linhagens indicadas e após 1 h de infecção, a concentração de cAMP foi determinada. **(f)** Curvas de sobrevivência de camundongos C57BL/6 *knockout Ncf1^{-/-}* infectados com *C. violaceum* selvagem e com os mutantes indicados. Os animais foram desafiados com 100 UFCs de cada linhagem de *C. violaceum* por via intraperitoneal. A análise estatística foi realizada com o teste t Student.

Os dados de que os mutantes $\Delta vacJ$ e $\Delta yrbE$ são menos virulentos poderiam ser explicados devido a um problema geral na membrana externa dessas linhagens mutantes, como indicado pelos ensaios de estresse na membrana (Fig. 15 a, b). No entanto, esses mesmos fenótipos de que os mutantes $\Delta vacJ$ e $\Delta yrbE$ são mais sensíveis à surfactantes foram também observados em bactérias cuja virulência aumentou com a deleção destes genes (ROIER et al., 2016). Dessa maneira, hipotetizamos que outros fatores, que não um problema generalizado na membrana externa, devem explicar a atenuação da virulência dos mutantes $\Delta vacJ$ e $\Delta yrbE$. Assim como em diversas bactérias Gram-negativas, o T3SS de *C. violaceum* foi descrito como um mecanismo chave para a invasão intracelular desse patógeno (MIKI et al., 2011). Dessa maneira, hipotetizamos que o aumento na vesiculação poderia desestabilizar a membrana externa e, dessa forma, prejudicar a correta montagem do T3SS. No entanto, a eficiência do T3SS dos mutantes $\Delta vacJ$ e $\Delta yrbE$, medido pela secreção do efator CopE, foi igual à linhagem selvagem (Fig. 18 e), indicando que a deficiência na invasão celular desses mutantes deve-se a mecanismos que antecedem à dependência do T3SS.

Como mostrado, as OMVs dos mutantes $\Delta vacJ$ e $\Delta yrbE$ apresentam elevado potencial imunomodulatório, estimulando a secreção de citocinas importantes para o recrutamento de células do sistema imune inato para o sítio de infecção (Fig. 17). Baseado nesses resultados, e nos dados que revelaram que os mutantes possuem capacidade reduzida de invadir células hepáticas (Fig. 18 b), nós hipotetizamos que na ausência dos genes *vacJ* e *yrbE*, *C. violaceum* não invade o órgão em tempo apropriado e continua fortemente liberando vesículas que induzem forte ativação do sistema imune, que por sua vez, resolve a infecção rapidamente. Para testar essa hipótese, infectamos camundongos *knockout* C57BL/6 *ncf1*^{-/-} com *C. violaceum* selvagem e os mutantes $\Delta vacJ$ e $\Delta yrbE$. A linhagem *knockout* do gene *ncf1* apresenta deficiência na síntese de NADPH oxidase, uma subunidade importante para a formação do complexo NOX2, o qual é responsável pela formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) por células fagocíticas durante a infecção (HOLLAND, 2013). Assim, após a infecção em camundongos *ncf1*^{-/-}, os mutantes $\Delta vacJ$ e $\Delta yrbE$ foram tão virulentos quanto à linhagem selvagem, enquanto o mutante do regulador geral do T3SS $\Delta cilA$, utilizado como controle, continuou com virulência atenuada (Fig. 18 f), corroborando os dados de que a deficiência na invasão não é devido a algum problema no T3SS (Fig. 18 e). Além disso, camundongos C57BL/6 selvagem infectados com *C. violaceum* selvagem e tratados previamente por 18 h com OMVs, mostraram-se resistentes à infecção (Fig. 18 c), indicando uma possível rápida ativação do sistema imune por OMVs durante a patogênese. Juntos, nossos dados indicaram que durante a patogênese, o sistema VacJ/Yrb é importante para a manutenção de mecanismos que promovem a invasão de *C. violaceum* na célula hospedeira e também em manter uma taxa de vesiculação controlada de modo que a bactéria consiga estabelecer seu nicho intracelular antes de ser percebida pelo sistema imune inato.

4.11 DsbA de *C. violaceum* apresenta o motivo conservado C⁵¹XXC⁵⁴ e é importante para a homeostase do envelope celular

Já é bem estabelecido que a relação de proteínas presente em OMVs é diferente da encontrada na membrana externa e no periplasma, sugerindo a

existência de mecanismos exclusivos ou seletivos para a inclusão de proteínas nas OMVs. No entanto, ainda não existe na literatura a descrição de um mecanismo para a importação e verificação da qualidade de proteínas em OMVs (BONNINGTON; KUEHN, 2014). A enzima DsbA é uma tiol-dissulfeto oxidorreductase que atua no periplasma garantindo o correto dobramento de proteínas presentes no espaço periplasmático e na membrana externa, sendo dessa forma, importante para a fisiologia e patogênese de bactérias (LANDETA; BOYD; BECKWITH, 2018). Assim como muitas bactérias Gram-negativas, *C. violaceum* possui DsbA (gene CV_3998). Nós hipotetizamos que a enzima DsbA poderia ser um fator importante para a distribuição e controle de qualidade de proteínas presentes em OMVs.

A enzima DsbA catalisa a formação de ligações dissulfeto em grupos tiol de resíduos de cisteína de suas proteínas alvo via o motivo conservado CXXC (LANDETA; BOYD; BECKWITH, 2018). Para verificar se a proteína DsbA de *C. violaceum* possui o motivo conservado CXXC, foi realizado um alinhamento múltiplo utilizando o programa Clustal ômega. Nossa análise revelou que DsbA de *C. violaceum* possui o motivo conservado (C⁵¹XXC⁵⁴), assim como DsbA de outras bactérias Gram-negativas patogênicas, como *Neisseria meningitidis*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *Legionella pneumophila* (Fig. 19 a). Para avaliar o papel de DsbA em *C. violaceum*, construímos um mutante nulo ($\Delta dsbA$), bem como linhagens complementadas com DsbA nativa ($\Delta dsbA[dsbA]$), com DsbA fissionada com tag de histidina ($\Delta dsbA[His-dsbA]$) e DsbA com tag de histidina e mutação pontual C54S ($\Delta dsbA[His-dsbA^{C54S}]$). A troca do segundo resíduo de cisteína (C) do motivo por um resíduo de serina (S) impede que a DsbA se desligue do substrato alvo, impossibilitando a formação de ligações dissulfeto e o dobramento das proteínas alvo (REN; CHAMPION; HUNTLEY, 2014). Nossos dados revelaram que a linhagem mutante nula $\Delta dsbA$ apresentou viabilidade, tamanho de colônias e crescimento similares à linhagem selvagem em condições padrão de cultivo (Fig. 19 b - d). Contudo, em LB contendo o antibiótico polimixina, o mutante $\Delta dsbA$ apresentou drástica diminuição no crescimento durante a fase exponencial, recuperando o fenótipo das linhagens selvagem e complementada em 24 h de cultivo (Fig. 19 e). Esses dados indicam que o gene *dsbA* é importante para *C. violaceum* em situações de estresse do

indicados e o crescimento foi medido por 48 h utilizando absorbância a DO_{600nm} . **(e)** Curva de crescimento em polimixina B 200 $\mu\text{g/ml}$. O crescimento das linhagens foi medido por 24 h utilizando absorbância a DO_{600nm} . Os valores médios com o erro padrão são mostrados. As diferenças significativas entre os dados foram determinadas pelo teste t Student.

4.12 Mutação em DsbA aumenta a produção de OMVs de maneira independente do sistema de transporte ABC VacJ/Yrb

O acúmulo de proteínas mal enoveladas ou produtos tóxicos para a célula é um dos mecanismos propostos para o aumento na produção de OMVs (SCHWECHHEIMER; KUEHN, 2015). Devido à proteína DsbA ser um dos principais fatores para o dobramento de proteínas no periplasma e membrana externa, nós hipotetizamos que a deleção do gene *dsbA* poderia causar aumento na produção de OMVs devido ao acúmulo de proteínas mal enoveladas no espaço periplasmático. Para testar essa hipótese, OMVs das linhagens mutantes $\Delta dsbA$ e $\Delta dsbA[\text{His-}dsbA^{C54S}]$ foram purificadas e quantificadas por NTA e Bradford. Nossos dados revelaram que ambas as linhagens mutantes secretam mais OMVs comparado à *C. violaceum* selvagem e a linhagem complementada (Fig. 20 a, b). Além disso, confirmamos o aumento na vesiculação ao normalizarmos o número de OMVs liberadas por UFC/ml (Fig. 20 c). O diâmetro das OMVs derivadas das linhagens mutantes não foi significativamente diferente da linhagem selvagem (Fig. 20 d), indicando que o gene *dsbA* não possui papel em relação ao tamanho das vesículas. Em seguida, nós perguntamos se o aumento na produção de vesículas nas linhagens mutantes poderia ser mediado pelo sistema de transporte ABC VacJ/Yrb. A deleção de *dsbA* não prejudicou o crescimento do mutante em LB contendo 1% de sais biliares (Fig. 20 e), indicando que, possivelmente, não houve um aumento de fosfolipídios na membrana externa que poderia justificar o aumento na vesiculação, uma característica chave quando há diminuição na expressão dos genes *vacJ/yrbBCDEF*. Em consistência com o dado anterior (Fig. 20 e), a expressão do sistema *vacJ/yrbBCDEF* na linhagem mutante $\Delta dsbA$ não foi alterada (Fig. 20 f). Juntos, nossos dados sugerem que a deleção de *dsbA* leva ao aumento na

vesiculação de *C. violaceum* através de um novo mecanismo que independe do sistema de transporte ABC VacJ/Yrb.

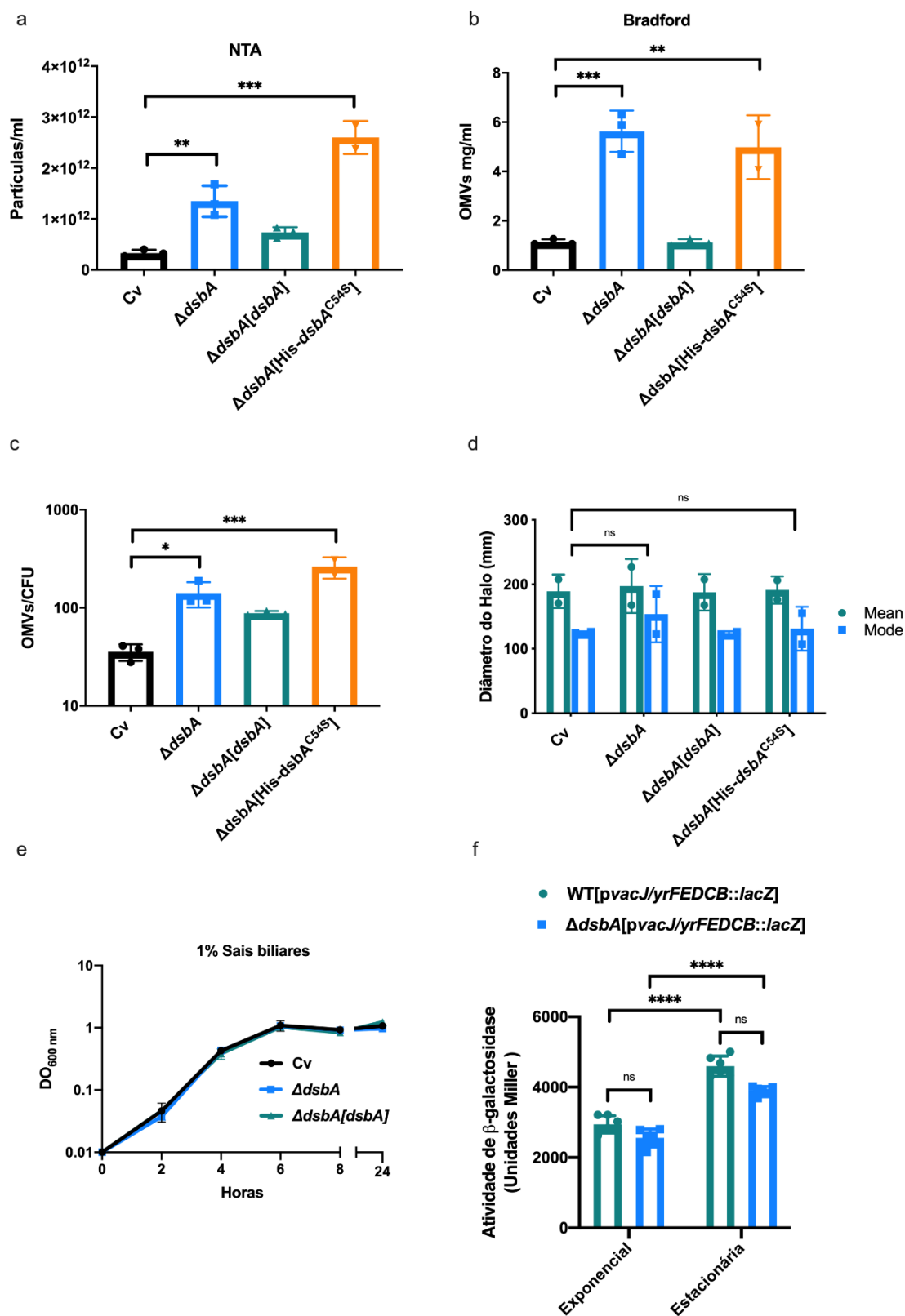


Figura 20. DsbA controla a produção de OMVs de modo independente do sistema VacJ/Yrb. (a - c) Quantificação de OMVs dos mutantes $\Delta dsbA$ e $\Delta dsbA[His-dsbA^{C54S}]$.

OMVs derivadas de culturas de fase estacionária de *C. violaceum* selvagem e dos mutantes e linhagens complementadas indicados foram isoladas por ultracentrifugação. As linhagens complementadas foram cultivadas sem a adição de antibióticos. **(a)** Quantificação de OMVs por NTA. **(b)** Quantificação de OMVs pelo conteúdo total de proteínas (Bradford). **(c)** Razão do número de OMVs por célula. **(d)** Distribuição do tamanho de OMVs medido por NTA. **(e)** Curva de crescimento de *C. violaceum* selvagem, mutante $\Delta dsbA$ e linhagem complementada em meio LB contendo 1 % de sais biliares. **(f)** A atividade do promotor do operon *yrbFEDCBvacJ* foi determinada durante a fase de crescimento exponencial ($DO_{600nm} \sim 1$) e estacionária ($DO_{600nm} \sim 5$) pelo ensaio de quantificação de β -galactosidase. Os valores médios com o erro padrão são mostrados (para OMVs, $n = 3$ réplicas biológicas). As diferenças significativas entre os dados foram determinadas pelo teste *one-way* ANOVA.

4.13 Identificação de alvos diretos de DsbA revela proteínas importantes para a fisiologia de *C. violaceum*

Em bactérias, proteínas alvo de DsbA incluem fatores importantes para a montagem do envelope celular, maquinaria de flagelo e fatores de virulência (SHOULDICE, et al. 2011). Para identificar possíveis alvos de DsbA em *C. violaceum*, utilizamos a linhagem mutante $\Delta dsbA$ [His-*dsbA*^{C54S}] como uma ferramenta para aprisionar os alvos na proteína DsbA, pois baseado em trabalhos anteriores (REN; CHAMPION; HUNTLEY, 2014), a primeira cisteína do motivo conservado CXXC (cisteína 51, no caso de *C. violaceum*) consegue formar uma ligação dissulfeto intermolecular com a cisteína da proteína alvo, porém não possui a habilidade de liberar os substratos devido à ausência da cisteína 54. Dessa forma, cultivamos a linhagem $\Delta dsbA$ [His-*dsbA*^{C54S}] em LB líquido por 20 h e submetemos as células a um protocolo de isolamento de proteínas periplasmáticas. Em seguida, o extrato solúvel foi submetido à purificação em coluna de níquel e a proteína His-DsbA^{C54S}, assim como seus substratos associados, foram analisados em gel SDS 12% (Fig. 21 a) e espectrometria de massas (Tabela 7).

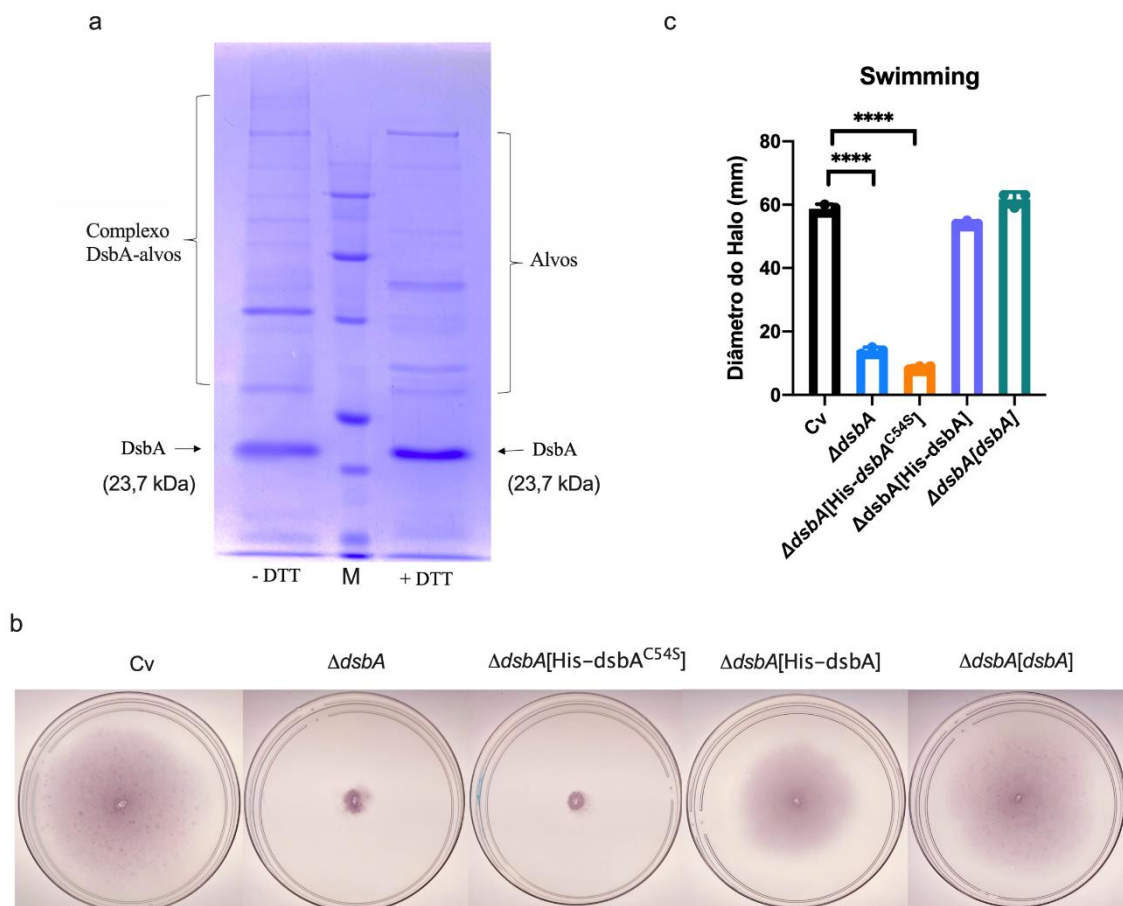


Figura 21. Aprisionamento dos complexos DsbA-substratos para identificação por espectrometria de massas. (a) A linhagem $\Delta dsbA[\text{His-dsbA}^{\text{C54S}}]$ foi utilizada para o aprisionamento de complexos DsbA-proteínas alvo. As proteínas foram purificadas por cromatografia de afinidade. As amostras foram tratadas sem (-) ou com (+) ditionotreitil (DTT) e separadas por gel SDS-PAGE 12%. As proteínas reduzidas foram excisadas do gel para a identificação por espectrometria de massas. **(b, c)** Validação do papel de DsbA para a maquinaria de montagem do flagelo. A linhagem de *C. violaceum* selvagem, os mutantes e as linhagens complementadas indicadas foram inoculadas em placas M9 ágar 0,3% e a motilidade foi quantificada pela zona de formação de halo após 96 h. Os valores médios com o erro padrão são mostrados ($n = 3$ réplicas biológicas). As diferenças significativas entre os dados foram determinadas pelo teste *one-way* ANOVA.

Tabela 7. Proteínas identificadas por LC-MS/MS como possíveis alvo de DsbA de *C. violaceum*.

No	Gene ID	Anotação da proteína	PSORTB localização prevista	Nº cisteína	Gene Ontologia
1	CV_2762	TrpB	Citoplasmática	5	Triptofano sintase
2	CV_3710	Provável proteína regularora da síntese de fosfoenolpiruvato	Desconhecido	2	Desfosforilação de proteínas
3	CV_1571	CobN	Citoplasmática	10	Processos biossintéticos
4	CV_3998	DsbA	Periplasmática	2	Atividade de oxidorreductase
5	CV_1724	Provável fosfoglicerato desidrogenase	Desconhecido	3	Ligação à NAD/ atividade fosfoglicerato desidrogenase
6	CV_4072	Provável hidrolase	Desconhecido	6	Atividade de hidrolase
7	CV_3327	Provável KpsF/GutQ	Desconhecido	2	Biossíntese de LPS
8	CV_3273	VioB	Citoplasmática	11	Processos de biossíntese de antibiótico
9					
10	CV_3027	Provável ferredoxina	Desconhecido	26	Atividade de oxidorreductase
11					
12	CV_1432	VgrG	Membrana citoplasmática	5	T6SS
13	CV_0646	Provável proteína de capsídeo	Citoplasmática	4	Desconhecido
14	CV_0038	Provável histidina-fosfato aminotransferase	Citoplasmática	5	Processos biossintéticos
15	CV_4243	Proteína contendo domínio HIT	Desconhecido	3	Atividade catalítica
16	CV_3744	Fosfato acetiltransferase	Citoplasmática	5	Atividade fosfato acetiltransferase
17	CV_3571	OmpA	Membrana externa	4	Membrana externa
18	CV_1148	Proteína hipotética conservada	Membrana citoplasmática	5	Sinalização celular
19	CV_1806	Pantotenato sintetase	Desconhecido	7	Processo metabólico de coenzima A
20	CV_0130	Xaa-Pro aminopeptidase	Citoplasmática	2	Atividade aminopeptidase
21	CV_1155	Provável peptidase	Desconhecido	3	Atividade peptidase
22	CV_3248	Histidina quinase	Membrana citoplasmática	7	Regulação da transcrição
23	CV_1313	Provável regulador transcricional	Citoplasmática	2	Processos biossintéticos
24	CV_0970	HmgA	Citoplasmática	4	GMP Processos metabólicos
25	CV_3620	Glutaredoxina	Desconhecido	2	tirosina Atividade de oxidorreductase
26	CV_3038	HldD	Citoplasmática	4	Biossíntese do core LPS
27	CV_1392	Proteína hipotética conservada	Desconhecido	2	Desconhecido
28	CV_2218	Proteína hipotética conservada	Desconhecido	19	Atividade de oxidorreductase
29	CV_0920	Histidina quinase	Membrana citoplasmática	10	Sinalização celular
30	CV_2802	Provável peptídeo sintetase	Membrana citoplasmática	27	Processos biossintéticos
31	CV_3476	Fumarato hidratase	Citoplasmática	7	Geração de precursores de metabólitos
32	CV_2086	PaaH	Citoplasmática	4	Metabolismo de ácidos graxo
33	CV_1130	FoIE	Citoplasmática	5	Metabolismo de GTP
34	CV_3150	Provável β -lactamase	Desconhecido	2	Processo catabólico de antibiótico
35	CV_1067	SdhA	Membrana citoplasmática	6	Cadeia de transferência de elétrons

36	CV_2728	L-treonina desidrogenase	Citoplasmática	9	Álcool desidrogenase
37	CV_1838	Provável hidrolase	Desconhecido	4	Atividade de hidrolase
38	CV_2761	TrpA	Citoplasmática	3	Atividade de síntese de triptofano
39	CV_3549	KatE	Periplasmática	4	Estresse oxidativo
40	CV_3372	Pirofosfatase inogânica	Desconhecido	2	Processos metabólicos
41	CV_4281	SecA	Membrana citoplasmática	7	Importação de proteínas
42	CV_1254	GloB	Citoplasmática	4	Atividade de hidrolase
43	CV_1431	Provável proteína da família Rhs	Desconhecido	10	Desconhecido
44	CV_3818	Provável flavoproteína	Desconhecido	2	Atividade de transferência de elétrons
45	CV_3902	Proteína contendo domínio TPR	Desconhecido	12	Atividade de transferase
46	CV_3761	Proteína hipotética conservada	Desconhecido	5	Desconhecido
47	CV_0494	Receptor dependente de TonB	Membrana externa	2	Membrana externa
48	CV_3852	Proteína hipotética conservada	Desconhecido	4	Desconhecido
49	CV_0531	Proteína contendo domínio GGDEF	Membrana citoplasmática	2	Sinalização celular
50	CV_2533	Proteína de biossíntese de molibdopterina	Citoplasmática	3	Ligação à GTP
51	CV_0368	Proteína contendo domínio HD-GYP	Citoplasmática	6	Desconhecido
52	CV_2019	Provável aldeído desidrogenase	Citoplasmática	9	Atividade de oxidoreductase
53	CV_1805	Acetil-CoA carboxilase	Citoplasmática	6	Atividade de liase
54	CV_3738	Carbamase quinase	Membrana citoplasmática	2	Processo metabólico de arginina
55	CV_1033	Proteína hipotética conservada	Membrana citoplasmática	3	Transdução de sinais
56	CV_1319	Proteína contendo domínio VOC	Desconhecido	3	Desconhecido
57	CV_2233	CbsF sintetase	Desconhecido	27	Processos metabólicos
58	CV_1300	Glicose-metanol-colin oxidoreductase	Membrana citoplasmática	7	Atividade de oxidoreductase
59	CV_1700	FlgA	Periplasmática	3	Montagem de flagelo

Nossa análise proteômica revelou que a proteína DsbA de *C. violaceum* atua no dobramento de proteínas de membrana externa, periplasma e membrana externa (Tabela 7). As proteínas de membrana externa que foram identificadas como alvos de DsbA foram a OmpA e um receptor dependente de TonB (Tabela 7). Trabalhos anteriores revelaram que mutantes de OmpA apresentam aumento na produção de OMVs devido à diminuição da interação de OmpA com a camada de PG (VALERU et al., 2014) (SCHWECHHEIMER; KUEHN, 2015). Dessa forma, baseado em nossa análise proteômica e no fenótipo de aumento na vesiculação dos mutantes $\Delta dsbA$ e $\Delta dsbA$ [His-*dsbA*^{C54S}] (Fig. 20 a – c), nós hipotetizamos que o aumento na liberação de OMVs pelo mutante $\Delta dsbA$, pode também ser explicado devido ao mal dobramento de

OmpA, e conseqüentemente a diminuição de sua interação com a camada de PG. Outros potenciais alvos de DsbA identificados na nossa análise proteômica incluem, uma provável hidrolase (CV_4072), proteínas envolvidas na biossíntese de LPS (CV_3327), uma ferredoxina (CV_3027), além de proteínas envolvidas na transdução de sinais, como uma histidina quinase (CV_0920) e uma proteína contendo domínio GGDEF (CV_0531). Além disso, identificamos como alvo de DsbA a proteína FlgA (CV_1700) associada à montagem do flagelo. Para validar o dado de que DsbA é importante para a maquinaria de montagem do flagelo, submetemos as linhagens mutantes $\Delta dsbA$ e $\Delta dsbA[\text{His-}dsbA^{C54S}]$ à um ensaio de motilidade. Ambas as linhagens mutantes apresentaram drástica redução na movimentação comparado à linhagem selvagem e complementadas (Fig. 21 b, c), indicando um papel fundamental de DsbA na motilidade de *C. violaceum*. Juntos, nossos dados revelaram que a proteína DsbA de *C. violaceum* pode contribuir com variados aspectos da fisiologia desta bactéria.

4.14 O mutante $\Delta dsbA$ apresenta acúmulo de proteínas de membrana externa em OMVs

Para investigarmos o papel de DsbA na composição de proteínas presentes em OMVs, foi realizada numa análise proteômica comparativa das OMVs derivadas de *C. violaceum* selvagem e do mutante $\Delta dsbA$ (Tabelas 8 e 9). Nossa análise revelou que as OMVs da linhagem mutante $\Delta dsbA$ apresentaram uma maior diversidade e quantidade de peptídeos, comparadas às OMVs da linhagem selvagem (Fig. 22 a - c), corroborando nossa hipótese de que a ausência do gene *dsbA* gera o acúmulo de proteínas mal enoveladas no periplasma e, conseqüentemente, leva ao aumento na vesiculação. De fato, um trabalho anterior revelou que o mutante *dsbA* de *Francisella tularensis* apresenta acúmulo de proteínas no periplasma (STRASKOVA et al., 2009). Muitas das proteínas identificadas por LC-MS/MS nas OMVs da linhagem selvagem e do mutante $\Delta dsbA$ são proteínas que compõem a membrana externa, como as proteínas hipotéticas CV_3104 e CV_3829, BamB e FadL (Tabela 8), sendo que esse aumento de proteínas que constituem a membrana externa foi de pelo menos 3 vezes nas OMVs do mutante $\Delta dsbA$. Contudo, nossa análise da

composição proteica de OMVs por *western blot* utilizando um anticorpo anti-OMVs feito contra OMVs da linhagem selvagem, revelou uma diminuição significativa da expressão de proteínas nas OMVs derivadas do mutante $\Delta dsbA$ (Fig. 22 d). Dessa forma, nós concluímos que a falta do correto dobramento de proteínas, devido à ausência de DsbA, prejudica a correta localização de proteínas na membrana externa. Estas proteínas se acumulariam no periplasma, contribuindo com o aumento da vesiculação.

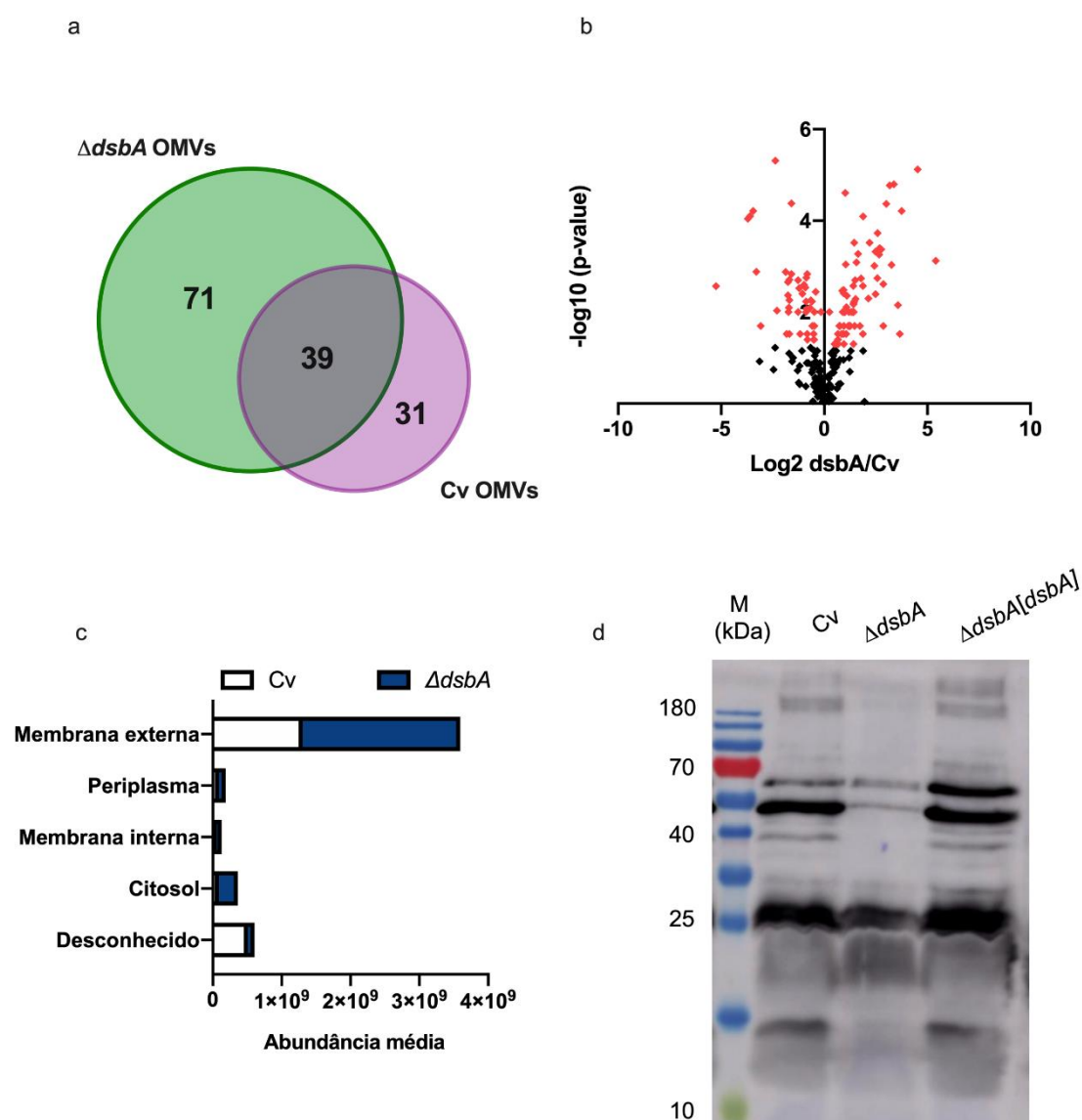


Figura 22. Sub-localização celular e distribuição das proteínas identificadas nas OMVs de *C. violaceum* selvagem e do mutante $\Delta dsbA$. (a) Diagrama de Venn indicando a diversidade total de proteínas identificadas apenas na linhagem selvagem, no mutante $\Delta dsbA$ ou em ambas as linhagens. (b) Diagrama vulcão indicando a diversidade das proteínas encontradas nas OMVs da linhagem selvagem comparado ao

mutante $\Delta dsbA$ que foram significativamente diferentes. **(c)** Análise da localização celular das proteínas identificadas nas OMVs de *C. violaceum* selvagem e do mutante indicado. **(d)** Análise da composição proteica de OMVs por *western blot*. OMVs purificadas de *C. violaceum* selvagem, do mutante $\Delta dsbA$ e da linhagem complementada foram submetidas ao gel SDS-PAGE e *western blot* utilizando anticorpo anti-OMVs de *C. violaceum* selvagem.

Tabela 8. Lista das proteínas mais abundantes nas OMVs da linhagem mutante $\Delta dsbA$ em relação as OMVs da linhagem selvagem.

No	Gene ID	Anotação da proteína	PSORTB localização prevista	P value	Fold change	Abundância média normalizada	
						WT	$\Delta dsbA$
1	CV_3104	Proteína de membrana externa	Membrana externa	0.01	+ 2.63	7.29e+006	1.92e+007
2	CV_3233	Chaperonina	Citoplasmática	2.67e-003	+ 2.65	8.21e+004	2.17e+005
3	CV_4329	Transportador ABC	Periplasmática	0.02	+ 2.24	1.44e+005	3.23e+005
4	CV_3829	Proteína de membrana externa	Membrana externa	0.02	+ 2.78	912.03	2534.29
5	CV_4304	Proteína de membrana externa	Membrana externa	0.01	+ 2.7	1.39e+005	3.77e+005
6	CV_4196	Proteína ribossomal 50S	Citoplasmática	9.76e-004	+ 5.36	5.20e+004	2.78e+005
7	CV_1811	Lipoproteína PAL	Desconhecido	7.78e-003	+ 2.10	1.22e+005	2.56e+005
8	CV_3354	Serina protease	Membrana citoplasmática	3.39e-003	+ 1.83	3.39e+004	3.39e+004
9	CV_4364	Copper chaperona	Desconhecido	0.03	+ 1.8	2.30e+004	4.15e+004
10	CV_0120	Transportador ABC	Periplasmática	3.86e-003	+ 1.91	4.64e+004	8.88e+004
11	CV_1891	Proteína de membrana externa	Membrana externa	2.69e-003	+ 3.65	5.73e+004	2.09e+005
12	CV_3535	BamB	Membrana externa	3.29e-003	+ 1.91	2.19e+004	4.19e+004
13	CV_4190	Proteína ribossomal 30S	Citoplasmática	6.38e-003	+ 2.69	5.29e+004	1.42e+005
14	CV_3977	T6SS Hcp	Extracelular	9.30e-004	+ 9.62	1.09e+004	1.05e+005
15	CV_0111	Divisão celular	Desconhecido	9.97e-003	+ 1.94	4.72e+004	9.17e+004
16	CV_2554	Proteína do tipo histona	Desconhecido	4.31e-005	+ 8.04	1.57e+004	1.27e+005

17	CV_4195	Proteína ribossomal 50S	Citoplasmática	1.81e-003	+ 5.97	5921.03	3.53e+004
18	CV_4171	Proteína ribossomal 50S	Citoplasmática	5.33e-004	+ 3.11	2.14e+004	6.66e+004
19	CV_4173	Proteína ribossomal 30S	Citoplasmática	5.52e-004	+ 6.34	2.08e+004	1.32e+005
20	CV_1275	Transportador ABC	Periplasmática	0.03	+ 1.79	3.90e+004	6.97e+004
21	CV_4170	Proteína ribossomal 50S	Citoplasmática	2.00e-003	+ 2.82	5.03e+004	1.42e+005
22	CV_3094	Peptidase	Membrana citoplasmática	0.05	+ 1.59	4.35e+004	6.91e+004
23	CV_3765	Proteína ribossomal 30S	Citoplasmática	0.02	+3.32	3.88e+004	1.29e+005
24	CV_3183	Proteína de transporte de ácido graxo de cadeia longa (fadL)	Membrana externa	0.05	+ 1.53	2.40e+004	3.67e+004
25	CV_0345	Provável proteína de capsídeo	Desconhecido	5.06e-003	+ 4.41	1.09e+004	4.81e+004
26	CV_1465	Proteína ribossomal 30S	Citoplasmática	4.00e-004	+ 6.41	1.62e+004	1.04e+005
27	CV_3119	DsbC	Periplasmática	0.05	+ 2.67	1.95e+004	5.21e+004
28	CV_1642	GrpE	Citoplasmática	6.15e-005	+ 13.44	1460.07	1.96e+004
29	CV_1363	HvrA	Desconhecido	1.60e-005	+ 10.36	1.12e+004	1.16e+005
30	CV_3637	Proteína ribossomal 50S	Citoplasmática	4.25e-004	+ 6.80	7892.07	5.37e+004
31	CV_3276	Ycel proteína de ligação à lipídio)	Desconhecido	0.04	+ 1.58	2.49e+004	3.94e+004
32	CV_0534	Desconhecido	Membrana externa	0.01	+ 1.86	4.31e+004	8.01e+004
33	CV_4169	Proteína ribossomal 30S	Citoplasmática	2.48e-005	+ 2.03	3.25e+004	6.61e+004
34	CV_4184	Proteína ribossomal 50S	Citoplasmática	7.58e-006	+ 23.02	2266.77	5.22e+004
35	CV_1076	SucD	Citoplasmática	2.45e-003	+ 7.29	5369.09	3.91e+004
36	CV_2928	Stomatina	Citoplasmática	0.01	+ 2.28	2.85e+004	6.50e+004
37	CV_4159	Proteína ribossomal 50S	Citoplasmática	0.05	+ 1.93	3.46e+004	6.69e+004
38	CV_4234	Desconhecido	Desconhecido	0.02	+ 1.66	1.57e+004	2.61e+004
39	CV_0223	Desconhecido	Desconhecido	0.01	+ 2.49	4.99e+004	1.24e+005
40	CV_2120	Desconhecido	Desconhecido	0.03	+ 1.91	3.53e+004	6.73e+004
41	CV_3744	Fosfato acetiltransferase	Citoplasmática	1.83e-003	+ 3.43	6327.57	2.17e+004

42	CV_3542	Quinase difosfato	Extracelular	4.78e-004	+ 5.61	1.65e+004	9.27e+004
43	CV_4185	Proteína ribossomal 50S	Citoplasmática	3.03e-004	+ 4.59	4575.21	2.10e+004
44	CV-4168	Proteína ribossomal 50S	Citoplasmática	8.20e-004	+ 2.95	1.51e+004	4.47e+004
45	CV_0338	Desconhecido	Desconhecido	1.69e-005	+ 9.04	1267.79	1.15e+004
46	CV_2023	Aminopectidase	Desconhecido	7.01e-003	+ 11.86	909.19	1.08e+004
47	CV_3675	Proteína ribossomal 30S	Citoplasmática	1.88e-004	+ 6.01	2.92e+004	1.75e+005
48	CV_2364	PhaB	Citoplasmática	0.03	+ 3.67	3310.92	1.22e+004
49	CV_3548	RdgC	Citoplasmática	0.02	+ 2.31	8.33e+004	1.92e+005
50	CV_3640	Proteína ribossomal 30S	Citoplasmática	8.05e-005	+ 3.68	1.24e+004	4.56e+004
51	CV_0971	Hidrolase	Desconhecido	0.03	+ 12.62	357.02	4505.81
52	CV_3696	Proteína ribossomal 30S	Citoplasmática	3.03e-004	+ 2.74	2.29e+004	6.27e+004
53	CV_4172	Proteína ribossomal 30S	Citoplasmática	5.18e-003	+ 2.86	4168.78	1.19e+004
54	CV_0068	Colicina	Membrana citoplasmática	0.03	+ 2.09	9038.35	1.89e+004
55	CV_0146	Pgl	Desconhecido	0.02	+ 1.93	6.89e+004	1.33e+005
56	CV_4197	Proteína ribossomal 50S	Citoplasmática	5.84e-003	+ 2.74	6498.82	1.78e+004
57	CV_0085	Peroxiredoxina	Desconhecido	6.71e-003	+ 2.66	2.51e+004	6.67e+004
58	CV_4176	Proteína ribossomal 50S	Citoplasmática	4.07e-003	+ 5.58	2651.60	1.48e+004

Tabela 9. Lista das proteínas menos abundantes nas OMVs da linhagem mutante $\Delta dsbA$ em relação as OMVs da linhagem selvagem.

No	Gene ID	Anotação da proteína	PSORTB localização prevista	P value	Fold change	Abundância média normalizada	
						WT	$\Delta dsbA$
1	CV_3424	OmpC	Membrana externa	5.85e-003	- 1.84	5.44e+006	2.96e+006
2	CV_0409	Provável proteína capsídeo	Extracelular	6.13e-005	-10.95	2.81e+006	2.56e+005
3	CV_0350	Provável proteína capsídeo	Desconhecido	1.31e-003	- 9.84	7.69e+005	7.81e+004

4	CV_2061	MucD (Proteína do tipo DegP)	Periplasmática	0.01	- 1.12	1.18e+005	1.06e+005
5	CV_1097	Transportador ABC	Periplasmática	0.03	- 3.56	1.38e+005	3.87e+004
6	CV_2128	Provável proteína de capsídeo	Desconhecido	7.96e-005	- 12.13	1.05e+006	8.66e+004
7	CV_1539	Transportador ABC	Periplasmática	1.97e-003	- 3.24	4.02e+004	1.24e+004
8	CV_0656	Hemolisina	Periplasmática	0.02	- 1.69	6.51e+004	1.10e+005
9	CV_1491	Desconhecido	Membrana externa	0.03	-1.78	2.30e+004	1.29e+004
10	CV_2481	Transportador ABC	Periplasmática	1.76e-003	- 1.83	1.12e+005	6.11e+004
11	CV_3982	Lipoproteína TSS6 (TssJ)	Desconhecido	8.06e-003	- 1.62	1.12e+005	6.88e+004
12	CV_1918	Hemolisina	Membrana externa	4.17e-005	- 3.03	2.63e+004	8691.82
13	CV_3681	Peptidase	Desconhecido	2.53e-003	- 1.98	4.18e+004	2.11e+004
14	CV_3069	Proteína de ligação à metal	Periplasmática	5.87e-003	- 1.51	1.21e+005	8.01e+004
15	CV_4161	Proteína ribossomal 50S	Citoplasmática	2.01e-003	- 2.42	5.15e+004	2.12e+004
16	CV_1173	Citocromo-c oxidase	Desconhecido	8.03e-003	- 3.29	3.40e+004	1.03e+004
17	CV_0441	Hidrolase	Desconhecido	5.54e-003	- 1.57	1.45e+004	9266.34
18	CV_2914	PepA (aminopeptidase)	Citoplasmática	1.33e-003	- 3.66	2.03e+004	5561.62
19	CV_3412	FabF	Membrana citoplasmática	4.86e-006	- 5.17	4972.65	961.58
20	CV_2928	Stomatina	Citoplasmática	0.01	+ 2.28	2.85e+004	6.50e+004
21	CV_1067	SdhA	Membrana citoplasmática	0.02	- 8.50	6137.02	721.72
22	CV_4006	PetC	Desconhecido	0.01	- 3.33	2.39e+004	7175.37
25	CV_2304	Peptidase	Citoplasmática	1.47e-003	- 1.77		
26	CV_2740	Desconhecido	Desconhecido	0.03	- 3.24	3.07e+005	9.48e+004
27	CV_1484	Biossíntese de sideróforo	Citoplasmática	0.04	- 1.76	1.30e+004	7398.17
28	CV_2060	MucB	Periplasmática	5.47e-003	- 3.23	1.19e+004	3673.58
29	CV_0916	MaeB	Citoplasmática	0.02	- 1.50	1.33e+004	8917.36
30	CV_3921	ArgB	Citoplasmática	1.47e-003	- 3.01	1.55e+004	5143.41
31	CV_2755	NuoB	Membrana citoplasmática	0.02	- 1.40	7.53e+004	5.38e+004

32	CV_3107	Regulador de resposta	Citoplasmática	0.07	- 1.39	1.55e+004	2.16e+004
33	CV_2688	Transportador ABC	Periplasmática	4.27e-003	- 3.39	2218.33	655.09
34	CV_4176	Proteína ribossomal 50S	Citoplasmática	4.07e-003	+ 5.58	2651.60	1.48e+004
35	CV_0446	MlaC	Periplasmática	8.68e-003	- 1.80	8209.05	4548.09
36	CV_0699	Regulador transcricional	Citoplasmática	2.71e-003	- 37.97	3790.01	99.81
37	CV_0998	Lipase ApeE	Extracelular	2.99e-003	- 2.33	2.46e+004	1.06e+004

Nossos dados de proteômica revelaram que algumas proteínas que são importantes fatores de virulência, como hemolisinas (CV_0656 e CV_1918), lipases (CV_0998) e proteases, estavam em menor quantidade nas OMVs do mutante $\Delta dsbA$ em relação as OMVs da linhagem selvagem (Tabela 9). Para validar nossos dados de proteômica, as linhagens *C. violaceum* selvagem e mutante $\Delta dsbA$, assim como as OMVs derivadas de cada linhagem, foram inoculados em placas M9 leite e placas ágar sangue (Fig. 23). Assim como previamente descrito em outras bactérias (HAYASHI et al, 2013) (WU et al., 2019), a deleção de *dsbA* reduziu a secreção de proteases extracelulares e hemolisinas, como verificado pela redução dos halos que indicam proteólise e hemólise, respectivamente (Fig. 23 a, b, e, f). Também confirmamos a diminuição da atividade hemolítica e de protease de OMVs do mutante $\Delta dsbA$ (Fig. 23 c, d, g, h). Baseado nos dados de proteômica das OMVs (Tabelas 8 e 9), assim como na identificação dos alvos de DsbA (Tabela 7), nós concluímos que DsbA pode ser uma proteína chave para a composição de proteínas em OMVs, seja pela interação direta entre DsbA-proteína alvo, ou via transdução de sinais que levariam ao aumento ou diminuição da expressão de proteínas periplasmática ou de membrana externa, pois de acordo com a proteômica dos alvos de DsbA (Tabela 7), identificamos várias proteínas que atuam na sinalização celular, como prováveis alvos de DsbA.

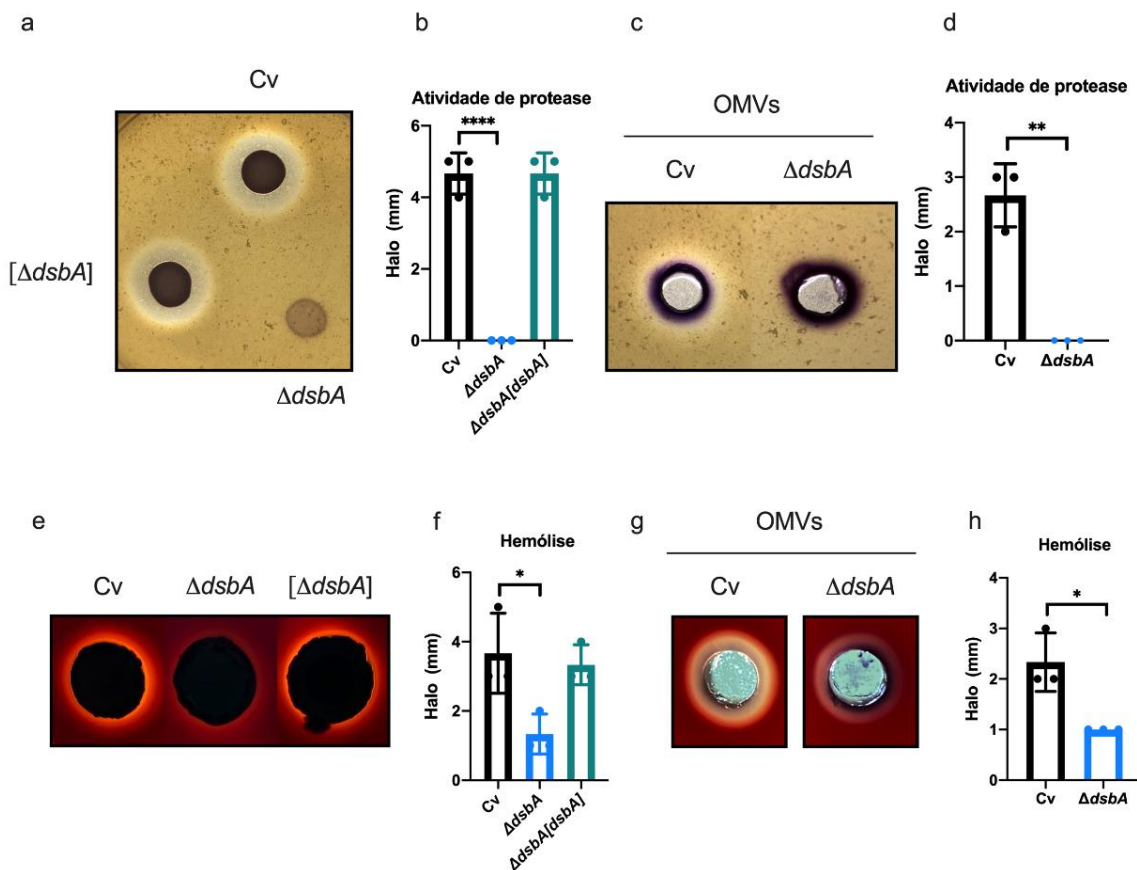


Figura 23. Papel de DsbA em atividade proteolítica e hemolítica de *C. violaceum*.

(a, b) As linhagens indicadas foram cultivadas até a fase estacionária e inoculadas em ágar leite. Após 24 h de cultivo, os halos indicando proteólise foram quantificados. (c, d) OMVs derivadas de culturas de fase estacionária de *C. violaceum* selvagem e do mutante $\Delta dsbA$ foram plaqueadas em ágar leite para a quantificação das zonas de proteólise. (e, f) As linhagens indicadas foram cultivadas até a fase estacionária e inoculadas em ágar sangue. Após 96 h de cultivo, os halos indicando hemólise foram quantificados. (g, h) OMVs derivadas de culturas de fase estacionária de *C. violaceum* selvagem e do mutante $\Delta dsbA$ foram plaqueadas em ágar sangue para a quantificação das zonas de hemólise. Os valores médios com o erro padrão são mostrados ($n = 3$ réplicas biológicas). As diferenças significativas entre os dados foram determinadas pelo teste *one-way* ANOVA e teste *t Student*.

4.15 As OMVs do mutante $\Delta dsbA$ induzem resposta pró-inflamatória normal e aumentada citotoxicidade em macrófagos

Como os nossos dados indicaram grande modificação na composição de proteínas das OMVs do mutante $\Delta dsbA$, nós hipotetizamos que as OMVs desse

mutante poderiam alterar a indução de citocinas importantes para a resposta inflamatória contra *C. violaceum*, uma vez que já é bem estabelecido que OMVs secretam diversos MAMPs (KAPARAKIS-LIASKOS; FERRERO, 2015). Curiosamente, as OMVs da linhagem mutante $\Delta dsbA$ ativaram a resposta imune mediada pela secreção de IL-6, TNF- α e IL-1 β da mesma forma que as OMVs derivadas da linhagem selvagem (Fig. 24 a – c). Contudo, as OMVs do mutante $\Delta dsbA$ foram mais citotóxicas, comparado com as OMVs de *C. violaceum* selvagem e da linhagem complementada (Fig. 24 d).

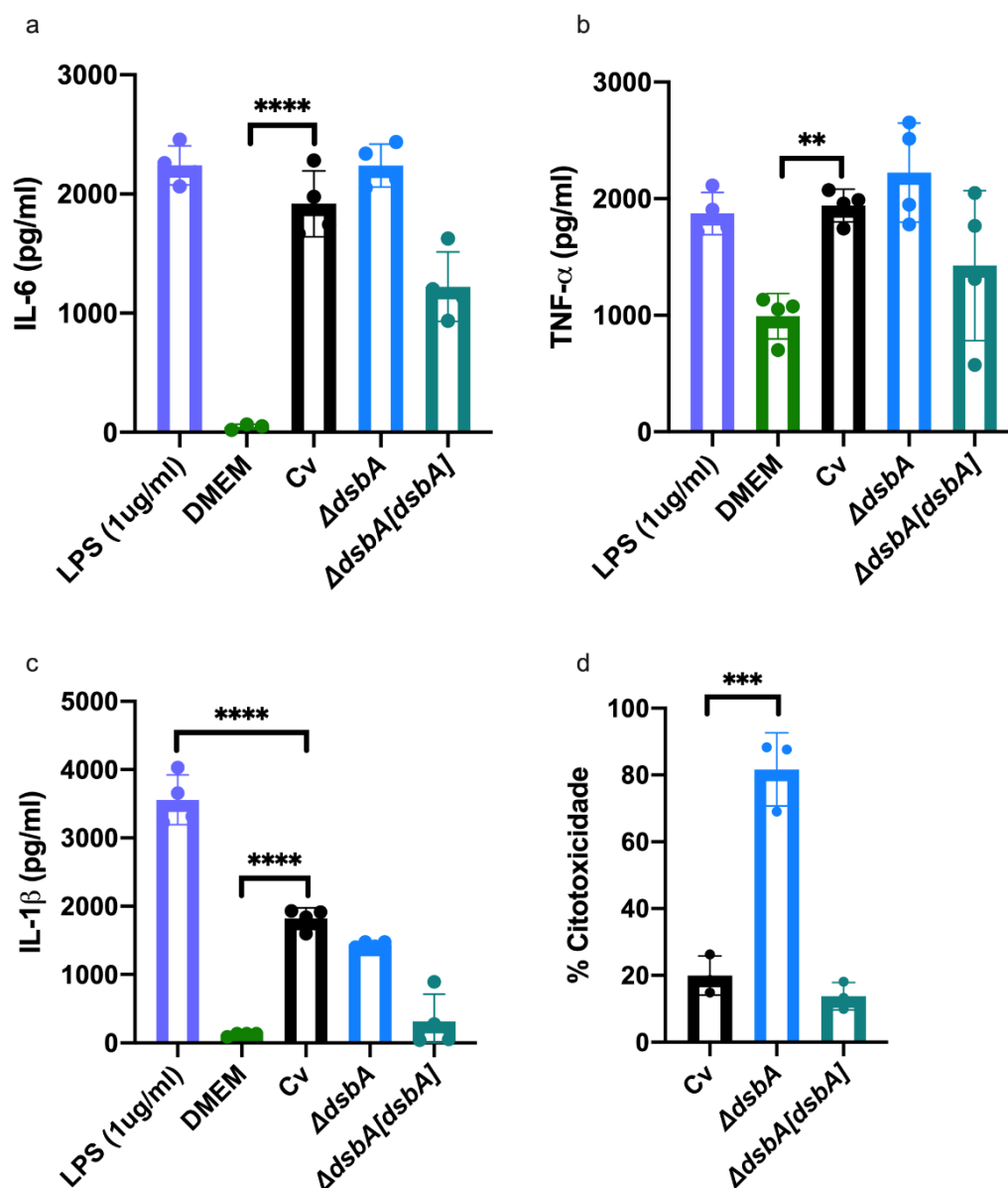


Figura 24. Indução de citocinas pró-inflamatórias e morte celular por OMVs de *C. violaceum* selvagem e do mutante $\Delta dsbA$. Macrófagos RAW 246.7 foram desafiados

com OMVs isoladas de *C. violaceum* selvagem e do mutante $\Delta dsbA$ por 24 h e a quantificação da produção de **(a)** IL-6 **(b)** TNF- α e **(c)** IL-1 β foi determinada por ELISA. **(d)** Quantificação da citotoxicidade celular mediada por OMVs de *C. violaceum* selvagem e do mutante $\Delta dsbA$. Os valores médios com o erro padrão são mostrados (n = 3 réplicas biológicas). As diferenças significativas entre os dados foram determinadas pelo teste *one-way* ANOVA.

4.16 DsbA é importante para o estabelecimento da infecção de *C. violaceum* em modelo murino

A ação de diferentes fatores de virulência, como as toxinas da cólera (Ctx) e termo-lábil (Etx), a montagem do T3SS e a detoxificação de glutathione durante o estilo de vida intracelular, são processos que podem ser dependentes de DsbA (YU; KROLL, 1999). Baseado em nossos dados sobre a interação de DsbA com proteínas importantes para a fisiologia e virulência de *C. violaceum*, nós hipotetizamos que este gene seja importante para a virulência desta bactéria. Nossos resultados revelaram que a linhagem mutante $\Delta dsbA$ induz menos morte celular em macrófagos comparado à *C. violaceum* selvagem, mas este efeito não foi revertido na linhagem complementada (Fig. 25 a). Em ensaios de virulência *in vivo*, os camundongos infectados com a linhagem $\Delta dsbA$ foram mais resistentes à infecção em relação aqueles infectados com as linhagens selvagem e complementada, indicando forte atenuação na virulência do mutante $\Delta dsbA$ (Fig. 25 b). Apesar de os animais serem mais resistentes quando infectados com a linhagem $\Delta dsbA$, o número de UFCs do mutante $\Delta dsbA$ recuperadas do fígado dos animais começou a diminuir apenas a partir do quarto dia de infecção, com recuperação total dos animais a partir do décimo dia (Fig. 25 c). Juntos, nossos dados indicaram que DsbA é fundamental para o estabelecimento da infecção de *C. violaceum* em camundongos, embora não pareça atuar em eventos iniciais da invasão no fígado.

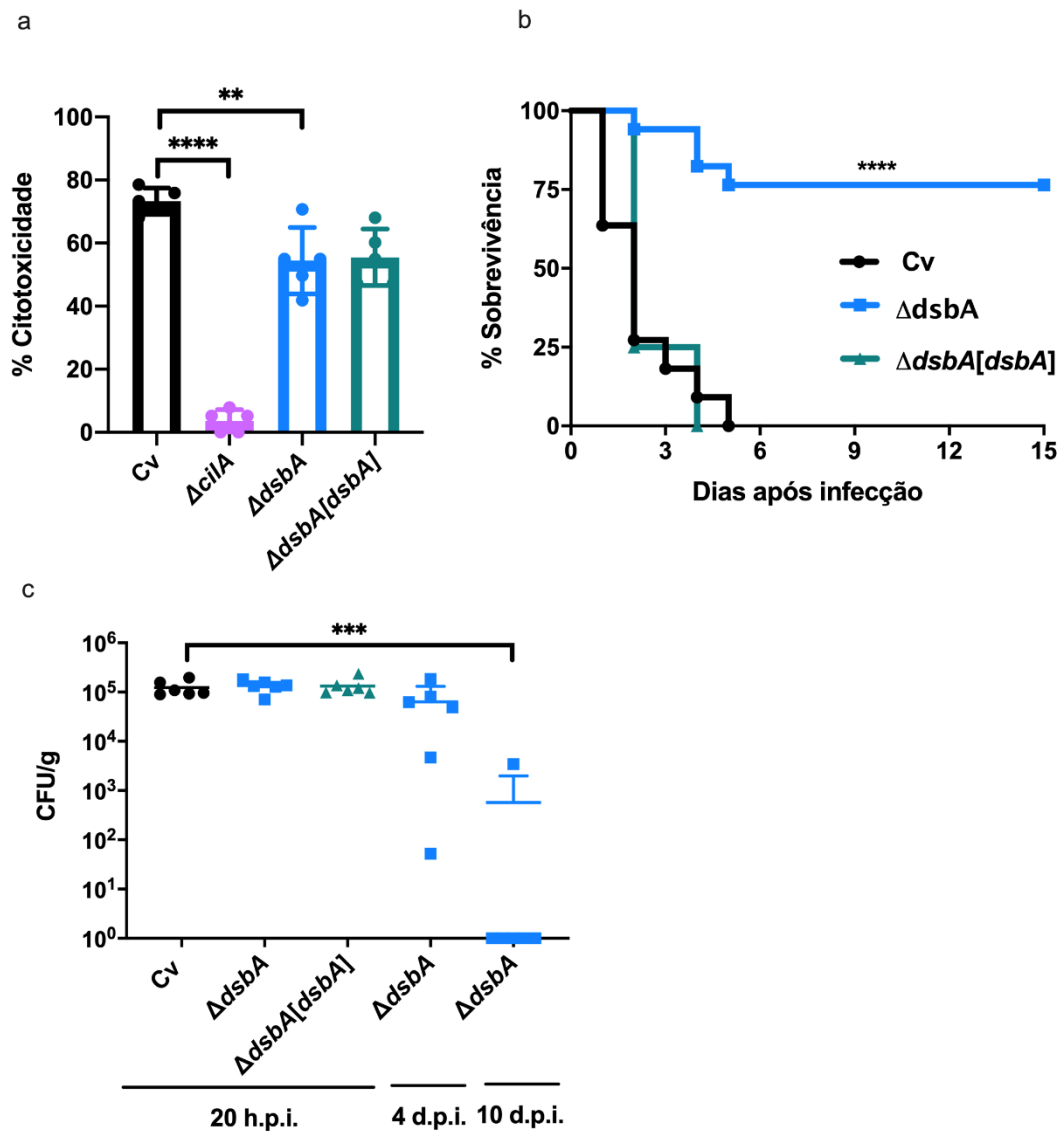


Figura 25. DsbA é requerida para o estabelecimento da infecção de *C. violaceum*.

(a) Ensaio de quantificação da citotoxicidade celular. Cultura de BMDMs foram infectados com *C. violaceum* selvagem, com o mutante $\Delta dsbA$ e a linhagem complementada. A morte celular foi determinada após 1 h de infecção pela detecção da enzima LDH. **(b)** Curvas de sobrevivência de camundongos BALB/c selvagem infectados com *C. violaceum* selvagem, com o mutante $\Delta dsbA$ e a linhagem complementada. Os animais foram desafiados com 1×10^6 de cada linhagem de *C. violaceum* por via intraperitoneal. **(c)** Carga bacteriana no fígado de camundongos infectados com linhagens de *C. violaceum*. Os camundongos foram infectados com 1×10^6 de cada linhagem de *C. violaceum*, e após os tempos de infecção indicados, os camundongos foram eutanasiados e os homogeneizados de fígado foram plaqueados para a contagem de UFCs. Os dados representam ao menos 6 réplicas biológicas. A análise estatística foi realizada com o teste t *Student*.

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, estudamos as vias de biogênese, a composição proteica, a seleção de carga e o papel *in vivo* das OMVs de *Chromobacterium violaceum*. Identificamos três mecanismos distintos de biogênese de OMVs em *C. violaceum*, sendo estes mediados pelo sistema de transporte de fosfolipídios VacJ/YrbBCDEF, pela proteína periplasmática DsbA e pela molécula hidrofóbica antimicrobiana violaceína. As OMVs contribuíram para aspectos da fisiologia e da interação de *C. violaceum* com outras bactérias e com hospedeiro vertebrado.

Este estudo forneceu evidência de que a liberação de OMVs em *C. violaceum* é um processo regulado por *quorum sensing* e requerido para competição interbacteriana ao mediar a secreção do composto antimicrobiano violaceína. Nós demonstramos que a violaceína é a carga nas OMVs de *C. violaceum* que medeia a toxicidade contra bactérias Gram-positivas e que este metabólito induz a biogênese de OMVs para sua própria secreção. Em nosso modelo, quando em alta densidade celular, a biogênese de OMVs induzida pela violaceína atua como uma via paralela de vesiculação ativada pelo sistema de *quorum sensing* Cvil/CviR de modo a compensar a diminuição da taxa de liberação de vesículas imposta pela alta expressão do sistema geral de vesiculação VacJ/Yrb (Fig. 13).

Nossos dados de que as OMVs medeiam a toxicidade *in vivo* da violaceína contra bactérias Gram-positivas resolve a questão de como este composto hidrofóbico pode ser secretado a longas distâncias, e fornece um mecanismo que explica, no contexto de competição microbiana, a bem descrita atividade antimicrobiana *in vitro* da violaceína (IM, et al., 2017) (ARULDASS et al., 2018) (CAUZ et al., 2019). Nós especulamos que a secreção de violaceína mediada por OMVs, junto com o seu papel na formação de biofilme, contribui para a sobrevivência de *C. violaceum* e de outras bactérias produtoras de violaceína em diversos ambientes (DURÁN, et al., 2016) (NAPPI et al., 2019). Talvez, esse mecanismo deve também facilitar o papel da violaceína como um composto de defesa contra predadores protozoários em biofilmes (MATZ, et al., 2008). Nossos dados estão de acordo com o papel de OMVs como um componente estrutural importante de biofilmes e como um meio de estocar toxinas em biofilmes (ORENCH-RIVERA; KUEHN, 2016).

Consistente com nossos dados, um trabalho recente descreveu as OMVs de *C. violaceum* como um veículo para a secreção de violaceína contra *S. aureus* (CHOI, 2020). No entanto, há uma divergência crítica entre nossos trabalhos. Enquanto nós afirmamos que a violaceína estimula a liberação de OMVs para sua própria secreção, como já descrito para a pequena molécula PQS (MASHBURN; WHITELEY, 2005) (HORSPOOL; SCHERTZER, 2018), o outro trabalho recém-publicado concluiu que a violaceína inibe a liberação de OMVs, já que um mutante por inserção *vioA* apresentou aumento na produção de OMVs (CHOI, 2020). Nossa conclusão é baseada (i) no fenótipo de hipovesiculação do mutante nulo $\Delta vioABCDE$ e (ii) no efeito da violaceína purificada em estimular a liberação de OMVs em *E. coli*, sendo nossos dados similares aos achados de que o PQS estimula a liberação de vesículas em diversas bactérias Gram-negativas (HORSPOOL; SCHERTZER, 2018). Nós hipotetizamos que esta divergência pode ter surgido pelo uso do mutante *vioA* contendo uma marca de resistência a antibiótico (CHOI, 2020). Como a manutenção do mutante requer seleção por antibiótico, o aumento na secreção de OMVs observado no mutante *vioA* pode ser um efeito da canamicina, já que antibióticos são descritos como indutores do aumento da produção de OMVs (DEVOS et al., 2015) (ORENCH-RIVERA; KUEHN, 2016) (BAUWENS et al., 2017). Entretanto, não fica claro no artigo se os autores utilizaram antibióticos nos ensaios de quantificação de OMVs (CHOI, 2020).

Os mecanismos pelos quais a violaceína induz a biogênese de OMVs e o motivo pelo qual este composto não é tóxico para *C. violaceum* ainda precisam ser definidos. Em *P. aeruginosa*, a molécula de *quorum sensing* PQS induz a liberação de OMVs através de sua inserção no lipídio A da molécula de LPS, promovendo curvatura na membrana externa (LI et al., 2019). O tráfego do PQS entre as membranas interna e externa parece determinar a taxa de vesiculação (FLOREZ et al., 2017), mas ainda não está claro se a violaceína interage com a membrana interna de *C. violaceum* ou se poderia mediar um efeito protetivo antioxidante como o descrito *in vitro* utilizando lipossomos (KONZEN et al., 2006). Simulações moleculares e estudos biofísicos tem indicado que a violaceína interage com modelos de membrana (DE SOUZA et al., 2017) (CAUZ et al., 2019) e permeabiliza membranas de bactérias Gram-positivas (CAUZ et

al., 2019), mas como a violaceína interage com a membrana externa ainda é desconhecido.

Existe evidência conectando *quorum sensing* e OMVs. Algumas moléculas hidrofóbicas de *quorum sensing* têm sido descritas como cargas de OMVs (MASHBURN; WHITELEY, 2005) (BRAMEYER et al., 2018), e moléculas de *quorum sensing* podem controlar a liberação de OMVs, tanto por estimular a liberação, como em *P. aeruginosa* e *Stenotrophomonas maltophilia* (MASHBURN; WHITELEY, 2005) (DEVOS et al., 2015) ou inibi-la, como em *Xylella fastidiosa* (IONESCU et al., 2014). Nossos dados indicam que em *C. violaceum* o sistema de *quorum sensing* Cvil/CviR ajusta a taxa de liberação de OMVs ao ativar tanto a biossíntese de violaceína quanto o sistema VacJ/Yrb durante a fase estacionária, duas vias de biogênese de OMVs com um papel inverso na vesiculação (Fig. 13). Nossos dados indicando que a mutação ou diminuição da expressão dos genes *vacJ/yrb* promoveu hipervesiculação corrobora a afirmação emergente de que bactérias controlam a taxa de liberação de OMVs ao regular a via VacJ/Yrb (ROIER et al., 2016). Trabalhos recentes têm demonstrado que diversos sinais como limitação de ferro, sais biliares e entrada no hospedeiro levam à diminuição da expressão dos genes *vacJ/yrb*, resultando em um aumento na vesiculação que leva a adaptação de bactérias durante a interação patógeno-hospedeiro (ROIER et al., 2016) (BAARDA et al., 2019) (DAVIES et al., 2019) (ZINGL et al., 2020).

No entanto, nossos dados de virulência com os mutantes hipervesiculares $\Delta vacJ$ e $\Delta yrbE$ apontam para um efeito inverso do sistema VacJ/Yrb na patogênese de *C. violaceum*. Ao invés de promover adaptação, a ausência deste sistema em *C. violaceum* resultou em menor capacidade de invasão em fígado de camundongos e na incapacidade de causar a morte dos animais. Estes fenótipos de atenuação de virulência assemelham-se aos descritos para mutantes do sistema VacJ/Yrb de bactérias como *S. enterica*, *S. flexneri*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii* (SHEN et al., 2012) (CARPENTER et al., 2014) (FOWLER; GALÁN, 2018) (PALMER et al., 2020). Os mutantes $\Delta vacJ$ e $\Delta yrbE$ de *C. violaceum* não apresentaram um problema geral no envelope celular e nem foram atenuados para virulência em camundongos *nrf1^{-/-}*, sugerindo que a manutenção da assimetria da membrana externa pelo sistema VacJ/Yrb é importante para eventos específicos, sobretudo no início da infecção.

O T3SS foi descrito como um dos principais mecanismos para a invasão de *C. violaceum* em células epiteliais e estabelecimento da infecção em modelo murino (MIKI et al., 2010; MIKI et al., 2011). No entanto, a diminuição da assimetria na membrana externa, devido a deleção dos genes *vacJ* e *yrbE*, não diminuiu a eficiência da secreção do efetor CopE pelo T3SS nos mutantes. Dessa maneira, especulamos que o sistema VacJ/Yrb deve ser importante para a manutenção de outros mecanismos empregados por *C. violaceum* para a colonização no hospedeiro. Já é bem descrito que bactérias Gram-negativas utilizam diferentes estratégias, além do T3SS, para a adesão e invasão tecidual durante os estágios iniciais da infecção. *N. gonorrhoeae* e *P. aeruginosa* utilizam o pilus do tipo IV tanto para aderirem em células epiteliais quanto para disseminar-se no citossol eucariótico e invadir células adjacentes (WINTHER-LARSEN et al., 2001) (NIETO et al., 2019). *C. violaceum* possui os genes para codificar a maquinaria conservada do pilus do tipo IV (VASCONCELOS, et al., 2003). Como a montagem do pilus do tipo IV inicia na membrana plasmática e se estende até a membrana externa (LIGTHART et al., 2020), nós especulamos que a manutenção da assimetria da membrana externa deva ser importante para a correta função do pilus do tipo IV em *C. violaceum*, e dessa forma, poderia contribuir para a virulência desta bactéria.

Embora as OMVs derivadas dos mutantes $\Delta vacJ$ e $\Delta yrbE$ não apresentaram diferença em relação à indução da secreção de citocinas em macrófagos, nossos dados de proteômica revelaram bastante diferença na composição e diversidade de proteínas presentes nas OMVs da linhagem mutante $\Delta yrbE$ comparado à linhagem selvagem. As OMVs do mutante $\Delta yrbE$ apresentaram um enriquecimento de proteínas de membrana externa, como OmpC, OmpW, BamB e demais Omps ainda não descritas, além da diminuição da diversidade de peptídeos. Baseado nesses resultados, especulamos que o aumento exacerbado na produção de vesículas não acompanha a correta distribuição de proteínas em OMVs, e dessa forma, as OMVs das linhagens hipervesiculares secretam basicamente algumas das proteínas que são inseridas na membrana externa. Alguns estudos indicaram que a diminuição da expressão ou inibição, via peptídeos antimicrobianos, das proteínas de membrana externa OmpW, OmpC e BamB diminuiu a capacidade de bactérias como *E. coli*, *S. flexneri* e *K. pneumoniae* de se aderirem ou invadirem células

epiteliais (BERNARDINI et al., 1993) (WU et al., 2013) (KRACHLER, 2016) (KATHAYAT et al., 2021). Devido as OMVs do mutante $\Delta yrbE$ serem enriquecidas com as proteínas de membrana externa mencionadas acima, nós especulamos que a hipervesiculação pode levar à perda dessas Omps via OMVs, e assim diminuir a abundância dessas proteínas na membrana externa, ajudando a explicar os problemas de colonização dos mutantes da via VacJ/Yrb.

As OMVs derivadas do mutante $\Delta dsbA$ apresentaram um acúmulo de proteínas ainda maior que as OMVs do mutante $\Delta yrbE$ e aumento da diversidade das proteínas secretadas. Este fenótipo, revelado pela análise proteômica, pode ajudar a explicar o aumento na vesiculação pelo mutante $\Delta dsbA$ não ser dependente do sistema VacJ/Yrb. Sendo assim, nós concluímos que o aumento na produção de OMVs pelo mutante $\Delta dsbA$ seja devido (i) ao mal enovelamento de OmpA, de forma que a estrutura instável dessa proteína deve provavelmente diminuir sua interação com a camada de PG, como já sugerido por trabalhos anteriores (VALERU et al., 2014) (SCHWECHHEIMER; KUEHN, 2015), e (ii) ao acúmulo de proteínas no periplasma, característica compartilhada com o mutante de DsbA em outras espécies de bactérias Gram-negativas (STRASKOVA et al., 2009). Além disso, a interação de DsbA com proteínas importantes para o envelope celular, pode ajudar a explicar a sensibilidade do mutante $\Delta dsbA$ frente ao tratamento com polimixina B.

Um trabalho demonstrou recentemente que quando *E. coli* cresce sob condições de estresse oxidativo ocorre um aumento na abundância de proteínas com resíduos oxidáveis em OMVs. Por esse motivo, houve alteração na seleção de proteínas em OMVs, pois a abundância relativa de proteínas em OMVs foi diferente das encontradas na membrana externa (ORENCH-RIVERA; KUEHN, 2021). Nossos dados indicaram que as OMVs do mutante $\Delta dsbA$ também apresentaram acúmulo de proteínas com resíduos oxidáveis, e devido à DsbA ser a principal via de oxidação de proteínas no periplasma e membrana externa (LANDETA; BOYD; BECKWITH, 2018), nós concluímos que DsbA deve exercer um papel importante na seletividade de proteínas que são secretadas via OMVs. Além disso, DsbA é uma via chave para a qualidade de proteínas do periplasma e envelope celular (ECKELS et al., 2021). Como nossos resultados indicaram a importância de DsbA para a função de proteases e hemolisinas em OMVs, nós

também concluímos que além da seletividade de proteínas em OMVs, DsbA também atua no controle de qualidade das proteínas secretadas via OMVs.

A enzima DsbA é associada à virulência de vários patógenos bacterianos (HERAS et al., 2009; LANDETA; BOYD; BECKWITH, 2018). Em *S. enterica*, DsbA atua na estabilidade de proteínas que compõem a maquinaria do T3SS (MIKI; OKADA; DANBARA, 2004). No entanto, em *C. violaceum*, DsbA parece influenciar na virulência por diferentes mecanismos. Embora menos virulento, o mutante $\Delta dsbA$ é capaz de invadir o tecido hepático e nossa análise da proteômica dos alvos de DsbA de *C. violaceum* não identificou nenhuma proteína associada ao T3SS. Uma possível explicação para a diminuição da virulência do mutante após invasão do tecido, pode ser que após a infecção, *C. violaceum* requer proteínas dependentes de DsbA para colonizar os órgãos, como as proteínas importantes para a fisiologia e virulência como proteases, lipases e hemolisinas identificadas em nossa análise proteômica. Embora o papel do flagelo na virulência de *C. violaceum* ainda não tenha sido investigado, é possível que a deficiência de motilidade do mutante $\Delta dsbA$ possa contribuir para sua atenuação de virulência. Dessa forma, podemos concluir que as OMVs de *C. violaceum* devem favorecer o estabelecimento da infecção desta bactéria ao contribuir com a secreção dos fatores de virulência identificados.

Devido à grande importância tanto de DsbA quando do sistema VacJ/Yrb para a virulência de *C. violaceum* e várias bactérias Gram-negativas de relevância clínica, podemos argumentar que tais sistemas poderiam ser utilizados como potenciais alvos terapêuticos contra infecções bacterianas.

6. CONCLUSÃO

6.1 As OMVs de *C. violaceum* atuam como veículo para entrega de violaceína, contribuindo para o aumento da adaptação desta bactéria durante competição contra bactérias Gram-positivas.

6.2 O aumento na produção de OMVs induzido pela violaceína é um novo mecanismo de biogênese de vesículas em bactérias Gram-negativas.

6.3 O sistema de transporte ABC VacJ/YrbBCDEF é o mecanismo geral de biogênese de OMVs em *C. violaceum*, sendo fundamental durante os estágios iniciais da infecção.

6.4 A enzima tiol-dissulfeto oxidoredutase DsbA atua na seletividade e qualidade de proteínas em OMVs de *C. violaceum*.

6.5 *C. violaceum* requer DsbA para o estabelecimento da infecção em camundongos via controle da produção de fatores de virulência funcionais.

7. REFERÊNCIAS

ACEVEDO, R. et al. Bacterial outer membrane vesicles and vaccine applications. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. 121, p. 1–6, 2014.

ALTINDIS, E., FU, Y., MEKALANOS, J. J. Proteomic analysis of *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles. **PNAS**, v. 111, n. 15, p. 1548-1556, 2014.

ANNAPURNA, F. et al. Fatal infection by *Chromobacterium violaceum*: clinical and bacteriological study. **Indian J Med Sci**, v. 33, n. 1, p. 8-10, 1979.

ARULDASS, C. A., et al. Antibacterial mode of action of violacein from *Chromobacterium violaceum* UTM5 against *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Environ Sci Pollut Res Int** v. 25, p. 5164–5180, 2018.

AUSUBEL F. M., et al. Short Protocols in Molecular Biology. **Greene Publishing Associates and John Wiley & Sens**, p. 3, 1992.

AZEREDO, J., et al. Critical review on biofilm methods. **Crit Rev Microbiol**, v. 43, p. 313–351, 2017.

BAARDA, B. I., et al. *Neisseria gonorrhoeae* MlaA influences gonococcal virulence and membrane vesicle production. **PLoS Pathog**, v.15: e1007385, 2019.

BAI, J., KIM, S. I., RYU, S. Identification and characterization of outer membrane vesicle- associated proteins in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 10, p. 4001–4010, 2014.

BALIBAR, C. J., WALSH, C. T. In vitro biosynthesis of violacein from L-tryptophan by the enzymes VioA-E from *Chromobacterium violaceum*. **Biochemistry**, v. 45, p. 15444–15457, 2016.

BATISTA, B. B., et al. Production and uptake of distinct endogenous catecholate-type siderophores are required for iron acquisition and virulence in *Chromobacterium violaceum*. **Infect Immun**, v. 87, p. e00577–e00519, 2019.

BATISTA, J.H.; DA SILVA NETO, J.F. *Chromobacterium violaceum* pathogenicity: updates and insights from genome sequencing of novel *Chromobacterium* species. **Front Microbiol**, v. 8, p. 2213, 2017.

BAUWENS, A., et al. Antibiotic-mediated modulations of outer membrane vesicles in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 and O157:H7. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, p. e00937–e00917, 2017.

BERNARDINI, M. L., et al. OmpC is involved in invasion of epithelial cells by *Shigella flexneri*. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 9, p. 3625-3635, 1993.

BETTS, H. J.; CHAUDHURI, R. R.; PALLEEN, M. J. An analysis of type-III secretion gene clusters in *Chromobacterium violaceum*. **Trends in Microbiology**, v. 12, n. 11, p. 476–482, 2004.

BEVERIDGE, T. J. Structures of Gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 16, p. 4725–4733, 1999.

BILLER et al. Bacterial vesicles in marine ecosystems. **Science**, v. 343, p. 183-186, 2014.

BISHOP, D. G.; WORK, E. An extracellular glycolipid produced by *Escherichia coli* grown under lysine-limiting conditions. **The Biochemical journal**, v. 96, n. 2, p. 567–76, 1965.

BITENCOURT, T. A., et al. Extracellular vesicles from the dermatophyte *Trichophyton interdigitale* modulate macrophage and keratinocyte functions. **Front Immunol**, v. 9, p. 2343, 2018.

BOMBERGER, J. M. et al. Long-distance delivery of bacterial virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicles. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 4, 2009.

BONHAM, K. S.; KAGAN, J. C. Endosomes as platforms for NOD-like receptor signaling. **Cell Host and Microbe**, v. 15, n. 5, p. 523–525, 2014.

BONNINGTON, K. E., KUEHN, M. J. Protein selection and export via outer membrane vesicles. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1843, n. 8, p. 1612-1619, 2014.

BRAMEYER, S., et al. Outer membrane vesicles facilitate trafficking of the hydrophobic signaling molecule CAI-1 between *Vibrio harveyi* cells. **J Bacteriol.**, v. 200, p. e00740–e00717, 2018.

CARPENTER, C. D., et al. The Vps/VacJ transporter is required for intercellular spread of *Shigella flexneri*. **Infect. Immun.**, v. 82, n. 2, p. 660-669, 2014.

CASE, C. L. et al. Caspase-11 stimulates rapid flagellin-independent pyroptosis in response to *Legionella pneumophila*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 5, p. 1851–1856, 2013.

CAUZ, A. C. G., et al. Violacein targets the cytoplasmic membrane of bacteria. **ACS Infect Dis**, v. 5, p. 539–549, 2019.

CHOI, S. Y., et al. *Chromobacterium violaceum* delivers violacein, a hydrophobic antibiotic, to other microbes in membrane vesicles. **Environ Microbiol**, v. 22, p. 705–713, 2020.

CHUTKAN, H.; et al. Quantitative and qualitative preparations of bacterial outer membrane vesicles. **Methods Mol Biol.**, v. 966, p. 259-272, 2013.

DA SILVA NETO J. F., NEGRETTO C. C., NETTO L. E. S. Analysis of the organic hydroperoxide response of *Chromobacterium violaceum* reveals that OhrR is a cys-based redox sensor regulated by thioredoxin. **PLoS One** v. 7, e47090, 2012.

DA SILVA, T. A. et al. Extracellular vesicles from *Paracoccidioides brasiliensis* induced M1 polarization in vitro. **Scientific Reports**, v. 6, n. June, p. 35867, 2016.

DAVIES, C., et al. Sodium taurocholate stimulates *Campylobacter jejuni* outer membrane vesicle production via down-regulation of the maintenance of lipid asymmetry pathway. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 9, p. 177, 2019.

DE SOUZA, K.D., et al. Interaction of violacein in models for cellular membranes: regulation of the interaction by the lipid composition at the air-water interface. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 160, p. 247–253, 2017.

DEATHERAGEA, B. L.; COOKSONA, B. T. Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: A conserved yet underappreciated aspect of microbial life. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 6, p. 1948–1957, 2012.

DEVOS, S., et al. The effect of imipenem and diffusible signaling factors on the secretion of outer membrane vesicles and associated Ax21 proteins in *Stenotrophomonas maltophilia*. **Front Microbiol**, v. 6, p. 298, 2015.

DURÁN, N., et al. Advances in *Chromobacterium violaceum* and properties of violaceinits main secondary metabolite: a review. **Biotechnol Adv**, v. 5, p. 1030–1045, 2016.

DURÁN, N., MENCK, C., F., M. *Chromobacterium violaceum* : A review of pharmacological and industrial perspectives. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 201-222, 2001.

ECKELS, E. C., et al. DsbA is a redox-switchble mechanical chaperone. **BioRxiv.**, 2021.

ELHENAWY, W.; DEBELYY, M. O.; FELDMAN, M. F. Preferential packing of acidic glycosidases and proteases into *Bacteroides* outer membrane vesicles. **mBio**, v. 5, n. 2, p. 1–12, 2014.

EVANS, K. C., et al. Quorum-sensing control of antibiotic resistance stabilizes cooperation in *Chromobacterium violaceum*. **ISME J**, v. 12, p. 1263–1272, 2018.

FLOREZ, C., et al. Membrane distribution of the *Pseudomonas* quinolone signal modulates outer membrane vesicle production in *Pseudomonas aeruginosa*. **mBio**, v. 4, p. e01034-17, 2017.

FOWLER, C. C., GALÁN, J. E. Decoding a *Salmonella* Typhi regulatory network that controls typhoid toxin expression within human cells. **Cell Host and Microbe**, v. 23, n. 1, p. 65-76, 2018.

FREITAS, M. S., et al. Paracoccin induces M1 polarization of macrophages via interaction with TLR4. **Front. Microbiol.** v. 7, n. 1003, 2016.

GUERRERO-MANDUJANO, A. et al. The outer membrane vesicles: Secretion system type zero. **Traffic**, v. 18, n. 7, p. 425–432, 2017.

GUJRATI, V. et al. Bioengineered bacterial outer membrane vesicles as cell-specific drug-delivery vehicles for cancer therapy. **ACS Nano**, v. XXX n. XX, 2014.

HANAHAHAN D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **J. Mol. Biol.** v. 166, p. 557, 1983.

HAURAT, M. F.; ELHENAWY, W.; FELDMAN, M. F. Prokaryotic membrane vesicles: New insights on biogenesis and biological roles. **Biological Chemistry**, v. 396, n. 2, p. 95–109, 2015.

HAYASHI, s., et al. The DsbA-DsbB disulfide bond formation system of *Burkholderia cepacia* is involved in the production of protease and alkaline phosphatase, motility, metal resistance, and multi-drug resistance. *Microbiology and Immunology*, v. 44, n. 1, p. 41-50, 2000.

HERAS, B.; SHOULDICE, S.R.; TOTSIKA, M. et al. DSB proteins and bacterial pathogenicity. **Nat. Rev. Microbiol.**, n. 7, v. 3, p. 215-225, 2009.

HOLLAND, S. M. Chronic granulomatous disease. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.**, v. 27, n. 1 p. 89-99, 2013.

HORSPOOL, A. M., SCHERTZER, J. W. Reciprocal cross-species induction of outer membrane vesicle biogenesis via secreted factors. **Sci Rep**, v. 8, p. 9073, 2018.

IM, H., et al. Combined application of bacterial predation and violacein to kill polymicrobial pathogenic communities. **Sci Rep**, v. 7, p. 14415, 2017.

IONESCU, M., et al. *Xylella fastidiosa* outer membrane vesicles modulate plant colonization by blocking attachment to surfaces. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, p. E3910–E3918, 2014.

JAN, A. T. Outer membrane vesicles (OMVs) of Gram-negative bacteria: A perspective update. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. June, p. 1–11, 2017.

JORGENSEN, I.; RAYAMAJHI, M.; MIAO, E. A. Programmed cell death as a defence against infection. **Nature Reviews Immunology**, 2017.

KAMITANI, S.; AKIYAMA, Y.; ITO, K. Identification and characterization of an *Escherichia coli* gene required for the formation of correctly folded alkaline phosphatase, a periplasmic enzyme. **The EMBO journal**, v. 11, n. 1, p. 57–62, 1992.

KAPARAKIS-LIASKOS, M.; FERRERO, R. L. Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 6, p. 375–387, 2015.

KATHAYAT, D., et al. Peptides affecting outer membrane lipid asymmetry (MlaA-OmpC/F) system reduce avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) colonization in chickens. **Appl. Environ. Microbiol.**, 2021.

KNOX, K. W.; VESK, M.; WORK, E. Relation between excreted lipopolysaccharide complexes and surface structures of a lysine-limited culture of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 92, n. 4, p. 1206–1217, 1966.

KONOVALOVA, A., KAHNE, D. E., SILHAVY, T. J. Outer membrane biogenesis. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 71, p. 539-556, 2017.

KONZEN, M., et al. Antioxidant properties of violacein: possible relation on its biological function. **Bioorg Med Chem**, v. 14, p. 8307–8313, 2016.

KRACHLER, A. M. BamB and outer membrane biogenesis – The Achilles' heel for targeting *Klebsiella* infections?. **Virulence**, v. 7, n.5, p. 508-511, 2016.

KULP, A.; KUEHN, M. J. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. **Annu Rev Microbiol**, v. 64, n. 1, p. 163–184, 2010.

LANDETA, C., BOYD, D., BECKWITH, J. Disulfide bond formation in prokaryotes. **Nat. Microbiol.**, v. 3, n. 3, p. 270-280, 2018.

LEE, E. et al. Proteomics in Gram-negative bacterial outer membrane vesicles. **Mass Spectrometry Reviews**, p. 535–555, 2008.

LI, A., SCHERTZER, J. W., YONG, X. Molecular conformation affects the interaction of the *Pseudomonas* quinolone signal with the bacterial outer membrane. **J Biol Chem**, v. 4, p. 1089–1094, 2019.

LIGHTHART, K., et al. Bridging bacteria and the gut: functional aspects of type IV pili. **Trends in Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 340-348, 2020.

LIMA-BITTENCOURT, C., I., et al. Analysis of *Chromobacterium* sp. natural isolates from different Brazilian ecosystems. **BMC Microbiology**, v. 7, n. 58, 2007.

LIN, J. et al. A *Pseudomonas* T6SS effector recruits PQS-containing outer membrane vesicles for iron acquisition. **Nature Communications**, v. 8, p. 1–12, 2017.

MACDONALD, I. A.; KUEHN, M. J. Stress-induced outer membrane vesicle production by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 13, p. 2971–2981, 2013.

MAERZ, J. K. et al. Outer membrane vesicles blebbing contributes to *B. vulgatus* mpk- mediated immune response silencing. **Gut Microbes**, v. 976, n. July, p. 00–00, 2017.

MALINVERNI, J. C., SILHAVY, T. J. An ABC transport system that maintains lipid asymmetry in the gram-negative outer membrane. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 19, p. 8009–8014, 2009.

MALTEZ, V. I. et al. Inflammasomes coordinate pyroptosis and natural killer cell cytotoxicity to clear infection by a ubiquitous environmental bacterium. **Immunity**, p. 987–997, 2015.

MALTEZ, V. I.; MIAO, E. A. Reassessing the evolutionary importance of inflammasomes. **The Journal of Immunology**, v. 196, n. 3, p. 956–962, 2016.

MAN, S. M., KARKI, R., KANNEGANTI, T. D. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases. **Immunol Rev**, v. 277, n. 1, p. 61-75, 2017

MANNING, A. J.; KUEHN, M. J. Functional advantages conferred by extracellular prokaryotic membrane vesicles. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 1–2, p. 131–141, 2013.

MAREDA, R. et al. Vesiculation from *Pseudomonas aeruginosa* under SOS. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1–18, 2012.

MASHBURN, L. M., WHITELEY, M. Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. **Nature**, v. 437, p. 422–425, 2005.

MATZ, C., et al. Marine biofilm bacteria evade eukaryotic predation by targeted chemical defense. **PLoS one**, v. 3, p. e2744, 2008.

MCBROOM, A. J.; KUEHN, M. J. Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. **Molecular Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 545–558, 2007.

MCCLEAN, K. H. et al. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acyl homoserine lactones. **Microbiology**, v. 143, n. 1997, p. 3703–3711, 1997.

MIAO, E. A. et al. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. **Nat. Immunol.**, v. 11, n. 12, p. 1136-1142, 2010.

MIAO, E. A.; MILLER, S. I. A conserved amino acid sequence directing intracellular type III secretion by *Salmonella typhimurium*. **PNAS**, v. 97, n. 13, p. 7339-7544, 2000.

MIKI, T. et al. *Chromobacterium* pathogenicity island 1 type III secretion system is a major virulence determinant for *Chromobacterium violaceum*-induced cell death in hepatocytes. **Molecular Microbiology**, v. 77, n. 4, p. 855–872, 2010.

MIKI, T. et al. The *Chromobacterium violaceum* type III effector CopE, a guanine nucleotide exchange factor for Rac1 and Cdc42, is involved in bacterial invasion of epithelial cells and pathogenesis. **Molecular Microbiology**, v. 80, n. 5, p. 1186–1203, 2011.

MIKI, T.; OKADA, N.; DANBARA, H. Two periplasmic disulfide oxidoreductases, DsbA and SrgA, target outer membrane protein SpiA, a component of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n.33, p. 34631-34642, 2004.

MILLER, J. H. Experiments in Molecular Genetics: A Laboratory Manual. New York, NY: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1972.

MORRISON, D. C., JACOBS, D. M. Binding of polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharides. **Immunochemistry**, v. 13, n. 10, p. 813-818, 1976.

MUKHERJEE, S., et al. The RhIR quorum-sensing receptor controls *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and biofilm development independently of its canonical homoserine lactone autoinducer. **PLoS Pathogens**, v. 13, p. e1006504, 2017.

NAPPI, J., SOLDI, E., EGAN, S. Diversity and distribution of bacteria producing known secondary metabolites. **Microb Ecol**, v. 78, p. 885–894, 2019.

NIETO, V., et al. Type IV pili can mediate bacterial motility within epithelial cells. **mBio**, v. 10, n. 4, 2019.

ORENCH-RIVERA, N., KUEHN, M.J. Environmentally controlled bacterial vesicle-mediated export. **Cell Microbiol**, v. 18, p. 1525–1536., 2016.

PALMER, L. D., et al. Modulating isoprenoid biosynthesis increases lipooligosaccharides and restores *Acinetobacter baumannii* resistance to host and antibiotic stress. **Cell Reports**, v. 32, n. 108129, 2020.

POL, L. VAN DER; STORK, M.; LEY, P. VAN DER. Outer membrane vesicles as platform vaccine technology. **Biotechnology Journal**, n. 10, p. 1689–1706, 2016.

PONTE, R.; JENKINS, S., G. Fatal *Chromobacterium violaceum* infections associated with exposure to stagnant waters. **Pediatr Infect Dis J.**, v. 11, n. 7, p. 583-6, 1992.

PRADOS-ROSALES, R. et al. Role for *Mycobacterium tuberculosis* membrane vesicles in iron acquisition. **Journal of Bacteriology**, v. 196, n. 6, p. 1250–1256, 2014.

PREVIATO, M., et al. The global transcriptional response to organic hydroperoxide and the role of OhrR in the control of virulence traits in *Chromobacterium violaceum*. **Infection and Immunity**, v. 85, n. 8, 2017.

PRICE, N. L. et al. Glycoengineered outer membrane vesicles: A novel platform for bacterial vaccines. **Scientific Reports**, p. 1–9, 2016.

RAKOFF-NAHOUM, S.; COYNE, M. J.; COMSTOCK, L. E. An ecological network of polysaccharide utilization among human intestinal symbionts. **Current Biology**, v. 24, n. 1, p. 40–49, 2014.

REN, G., CHAMPION, M. M., HUNTLEY, J. F. Identification of disulfide bond isomerase substrates reveals bacterial virulence factors. **Molecular Microbiology**, v. 94, n. 4, p. 926-944, 2014.

RIVERA, N. O.; KUEHN, M. J. Environmentally controlled bacterial vesicle - mediated export. **Cellular Microbiology**, n.18, p. 1525–1536, 2016.

ROIER, S. et al. A novel mechanism for the biogenesis of outer membrane vesicles in Gram-negative bacteria. **Nature Communications**, p. 1–13, 2016.

SANTOS, R.E.R.S.; BATISTA, B.B.; DA SILVA NETO, J.F. Ferric Uptake Regulator Fur coordinates siderophore production and defense against iron toxicity and oxidative stress and contributes to virulence in *Chromobacterium violaceum*. **Appl Environ Microbiol**, v. 86, n. 21, p. e01620-20, 2020.

SCHWECHHEIMER, C.; KUEHN, M. J. Outer membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 10, p. 605– 619, 2015.

SCHWECHHEIMER, C.; KUEHN, M. J. Synthetic effect between envelope stress and lack of outer membrane vesicle production in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 18, p. 4161–4173, 2013.

SHEN, L., et al. PA2800 plays an important role in both antibiotic susceptibility and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. **Curr Microbiol.**, v. 65, n. 5, p. 601-609, 2012.

SHOULDICE, S. R., et al. Structure and function of DsbA, a key bacterial oxidative folding catalyst. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 14, n. 9, p. 1729-1760, 2011.

SIMON R, PRIEFFER U, PUHLER A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. **Biotechnology**, v. 1, p. 784-790, 1983.

SINGH, P. K. et al. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. **Nature**, v. 417, n. 6888, p. 552–555, 2002.

SIRINAVIN, S.; et al. Invasive *Chromobacterium violaceum* infection in children: case report and review. **Pediatr Infect Dis J.**, v. 24, n. 6, p. 559-61, 2005.

STAUFF, D.L., BASSLER, B.L. Quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*: DNA recognition and gene regulation by the CviR receptor. **J Bacteriol**, v. 193, p. 3871–3878, 2011.

STRASKOVA, A., et al. Proteome analysis of an attenuated *Francisella tularensis* dsbA mutant: identification of potential DsbA substrate proteins. *J. Proteome Res.*, v. 8, n. 11, p. 5336-5346, 2009.

TOYOFUKU, M. et al. Identification of proteins associated with the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm extracellular matrix. **J Proteome Res**, v. 11, n. 10, p. 4906–4915, 2012.

TOYOFUKU, M., NOMURA, M., EBERL, L. Types and origins of bacterial membrane vesicles. **Nat Rev Microbiol**, v. 1, p. 13–24, 2019.

VALERU, S. P., et al. Lack of outer membrane protein a enhances the release of outer membrane vesicles and survival of *Vibrio cholerae* and suppresses viability of *Acanthamoeba castellanii*, **Int. J. Microbiol.**, v. 2014, n. 610190, 2014.

VANAJA, S. K. et al. Bacterial outer membrane vesicles mediate cytosolic localization of LPS and caspase-11 activation. **Cell**, v. 165, n. 5, p. 1–14, 2016.

VASCONCELOS A., T., R., ALMEIDA D., F., HUNGRIA M., 106 other authors. The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 100, p. 11660-11665 2003.

WINTHER-LARSEN, H. C., et al. *Neisseria gonorrhoeae* PilV, a type IV pilus-associated protein essential to human epithelial cell adherence. **PNAS**, v. 98, n. 26, 15276-15281, 2001.

WU, C., et al. Two DsbA proteins are important for *Vibrio parahaemolyticus* pathogenesis. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 1103, 2019.

WU, X., et al. Outer membrane protein OmpW of *Escherichia coli* is required for resistance to phagocytosis. **Research in Microbiology**, v. 164, p. 848-855, 2013.

YANG, C., H.; LI, Y., H. *Chromobacterium violaceum* infection: A clinical review of an important but neglected infection. **J Chin Med Ass**, v. 74, p. 435-441, 2011.

YU, J., KROLL, J. S. DsbA: a protein-folding catalyst contributing to bacterial virulence. **Microbes Infect.**, v. 1, n. 14, p. 1221-1228, 1999.

ZINGL, F. G., et al. Outer membrane vesiculation facilitates surface exchange and in vivo adaptation of *Vibrio cholerae*. **Cell Host Microbe**, v. 27, p. 225–237.e8, 2020.

8. APÊNDICE

Artigos de primeira autoria:

01. **Batista JH**, Leal FC, Fukuda TTH, Alcoforado Diniz J, Almeida F, Pupo MT, da Silva Neto JF. (2020) Interplay between two quorum sensing-regulated pathways, violacein biosynthesis and VacJ/Yrb, dictates outer membrane vesicle biogenesis in *Chromobacterium violaceum*. *Environ Microbiol.* doi: 10.1111/1462-2920.15033.

02. **Batista JH**, da Silva Neto JF. (2017) *Chromobacterium violaceum* pathogenicity: updates and insights from genome sequencing of novel *Chromobacterium* species. *Front Microbiol.* **8**:2213. doi: 10.3389/fmicb.2017.02213.

Artigo de co-autoria:

01. Barroso KCM, Previato-Mello M, Batista BB, **Batista JH**, da Silva Neto JF (2018) EmrR-dependent upregulation of the efflux pump EmrCAB contributes to antibiotic resistance in *Chromobacterium violaceum*. *Front. Microbiol.* **9**:2756. doi: 10.3389/fmicb.2018.02756.