

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

ANA LAURA BOECHAT BORGES

**Caracterização da superexpressão do fator sigma ECF σ^x
em *Pseudomonas aeruginosa* PA14**

**Versão corrigida da tese conforme resolução CoPGr5890
A original encontra-se disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
02/05/2013

ANA LAURA BOECHAT BORGES

**Caracterização da superexpressão do fator sigma ECF σ^x em
Pseudomonas aeruginosa PA14**

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)*

Orientadora: Prof^a Dr^a Regina Lúcia Baldini

São Paulo
2013

Ana Laura Boechat Borges

Caracterização da superexpressão do fator sigma ECF σ^x em *Pseudomonas aeruginosa* PA14

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)*

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

*À minha mãe, que me ensinou a acreditar em mim e nas
pessoas ao meu redor. Ao meu marido e à minha filha,
minha nova família formada no curso deste doutorado,
pelo exercício constante de paciência e amor.*

AGRADECIMENTOS

À CAPES e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.

Ao Laboratório de Espectrometria de Massa, no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), CNPEN, Campinas, SP, pela identificação das proteínas por HPLC-MS/MS.

À Prof^a. Dr^a. Regina Baldini, pela orientação, sempre com paciência e total dedicação. Também agradeço por servir como exemplo de amor ao que faz.

À Dr^a. Suely Lopes Gomes pelo apoio e disponibilidade do espaço físico e de materiais necessários para este trabalho.

Ao professor Dr. Mário José Politi, pelo auxílio com os ensaios de anisotropia.

Aos Doutores Éric Déziel e François Lépine, do Institut Armand-Frappier, Laval, Canadá, pelas ricas discussões e sugestões.

Aos docentes que participaram da minha banca de qualificação, Dr^a. Ana Maria Carmona Ribeiro, Dr^a. Deborah Schechtman e Dr. Eduardo Moraes Rego Reis, pelas sugestões.

A todos os professores que, com aulas, discussões informais e acesso a equipamentos e reagentes, contribuíram para a realização deste trabalho e para a minha formação acadêmica, em especial, Dr^a. Marilis do Valle Marques.

Aos amigos que passaram pelo laboratório de Regulação da Expressão Gênica em Microrganismos, Eliezer, Patrícia, André, Anne, César, Christian, Karina, Raphaela e Rogério, pela ajuda, sugestões e ótimos momentos de descontração. Em especial ao Diogo, pela verdadeira amizade e companheirismo sempre!

Aos amigos do grupo da professora Regina e da professora Suely, Ana Paula, Duilio, Gabriela, Gianluca, Gilberto, Juliana e Thays, pela ajuda sempre com boa vontade,

discussões e certeza de um bom ambiente de trabalho. Ainda a Gilberto Hideo Kaihama, por realizar os ensaios de anisotropia.

À amiga Sandra Mara pelas deliciosas conversas, paciência e dedicação ao trabalho de base.

A Doris e Ivanilde pela competência no trabalho de base.

A Luci Deise Navarro pela eficiência no serviço de seqüenciamento e prontidão em ajudar sempre.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação pela atenção e ajuda sempre que necessário.

Aos demais amigos e conhecidos do departamento de Bioquímica. Em especial a Nathália pelo companheirismo e apoio nas horas mais diversas.

Às velhas amigadas que resistiram ao tempo e à distância, pela certeza da presença constante; aos amigos mais queridos da época da faculdade e ao “Clube da Lulu”, pela tradução mais fiel da amizade. Aos novos amigos, que vão surgindo a cada novo ciclo da minha vida.

À minha mãe, Ana Carolina, sempre ao meu lado, com sua força, alegria, incentivo e amor.

Ao meu padrasto, Affonso, e à sua família: D. Aldina, Cristina, Cristiano e Aparecida por acreditarem em mim e pelo interesse constante em meus estudos.

Aos meus padrinhos Isaac, Carolina e Maria Amélia, tios – Atalíbia, Marciano, Edith, Gagaça, Cyrillo e Dionéia – e primos que souberam me dar apoio e bons momentos de descontração mesmo com toda a distância física.

Aos meus sogros Vanda Maria e Edvaldo e à minha cunhada Everlyn por todo apoio sempre que necessário nos cuidados com a minha filha, para que eu pudesse me dedicar a essa tese.

Ao querido Everton, pela companhia, compreensão e amor.

Por fim, a Deus, que está sempre comigo.

RESUMO

Boechat Borges, A.L. **Caracterização da superexpressão do fator sigma ECF σ^x em *Pseudomonas aeruginosa* PA14.** 2013. 100 p. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Pseudomonas aeruginosa é uma proteobactéria do grupo gama muito versátil, capaz de colonizar ambientes variados e infectar hospedeiros filogeneticamente distintos, incluindo humanos imunocomprometidos. Os fatores sigma de função extracitoplasmática (ECF) são membros de sistemas de sinalização de superfície celular (CSS), abundantes em *P. aeruginosa*. Vinte genes codificando fatores sigma ECF estão presentes nos genomas sequenciados de *P. aeruginosa*, a maioria fazendo parte de sistemas TonB relacionados à captação de ferro. Neste trabalho, seis fatores sigma pobremente caracterizados foram superexpressos na linhagem PA14 a partir de um promotor induzível por arabinose para investigar seu papel na expressão dos sistemas de dois componentes PvrSR e RcsCB, que atuam na regulação da fímbria CupD, além de sua influência no crescimento de culturas de *P. aeruginosa*. Não foi observado efeito positivo de nenhum dos fatores sigma testados na expressão dos sistemas de dois componentes e a superexpressão de cinco deles tampouco levou a qualquer alteração no crescimento, porém a produção de piocianina foi alterada na superexpressão de PA14_55550 e a superexpressão de PA14_26600 e PA14_46810 levou a um discreto aumento no início da formação de biofilme em PA14. Por outro lado, culturas superexpressando σ^x (ALB04) apresentaram um perfil alterado de lipopolissacarídeo e uma curva de crescimento bifásica, alcançando precocemente uma fase estacionária seguida de uma recuperação do crescimento até uma segunda fase estacionária. Durante a primeira fase estacionária, a maior parte das células aumenta de tamanho e morre, mas as células remanescentes retornam à morfologia selvagem e seguem para a segunda fase de crescimento

exponencial. Isso não acontece devido a mutações compensatórias, uma vez que células coletadas de pontos tardios da curva e diluídas em meio novo repetem este comportamento. Apesar de trabalhos com a linhagem PAO1 associarem σ^x à transcrição de *oprF*, que codifica a principal porina não específica de *Pseudomonas*, nas condições dos nossos ensaios em PA14 a expressão dessa porina não foi induzida pela superexpressão de σ^x . Assim, os efeitos observados nessa superexpressão também não podem ser atribuídos a OprF. A transcrição de *oprF* em PA14 mostrou-se majoritariamente dependente da região promotora a que se atribui a ligação de σ^{70} , ao contrário dos relatos na literatura da dependência da região de ligação a σ^x . Análises proteômicas foram realizadas para investigar os elementos envolvidos nesses efeitos de superexpressão de σ^x , o que revelou a indução de diversas enzimas envolvidas na via de biossíntese de ácidos graxos. As células superexpressando σ^x apresentam uma maior proporção de ácidos hexadecanoico (C16) e hexadecenoico (C16:1) e dados de anisotropia mostram uma maior fluidez da(s) membrana(s). Este trabalho é o primeiro relato de um fator sigma ECF envolvido em biossíntese de lipídeos em *P. aeruginosa*.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*, fatores sigma ECF, biossíntese de lipídeos, fluidez de membrana

ABSTRACT

Boechat Borges, A.L. **Characterization of the ECF sigma factor σ^x overexpression in *Pseudomonas aeruginosa* PA14.** 2013. 100 p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Pseudomonas aeruginosa is a very versatile gammaproteobacteria, able to colonize different environments and to infect phylogenetically distinct hosts, including immunocompromised humans. The extracytoplasmic function sigma factors (ECFs) are members of cell signaling systems (CSS), abundant in *P. aeruginosa*. Twenty genes coding for ECF sigma factors are present in the sequenced genomes of *P. aeruginosa*, most of them being part of TonB systems related to iron uptake. In this work, six poorly characterized sigma factors were overexpressed in strain PA14 from an arabinose inducible promoter to investigate their role in the expression of the two-component systems PvrSR and RcsCB, which regulates CupD fimbria, and their influence in *P. aeruginosa* cultures growth. None of the tested sigma factors led to two-component systems upregulation and overexpression of five of them caused no change in the growth profile, but pyocyanin production was altered in PA14_55550 overexpression and PA14_26600 and PA14_46810 overexpression led to a slight increase in biofilm initiation in PA14. By the other side, cultures overexpressing σ^x (ALB04) presented an altered lipopolysaccharide profile and a biphasic growth curve, reaching an early stationary phase followed by a growth resuming until a second stationary phase. During the early stationary phase, most cells swells and dies, but the remaining cells return to wild type morphology and proceed to the second exponential phase of growth. This is not due to compensatory mutations, since cells collected from late points of the curve and diluted in fresh medium repeat this behavior. Although studies with strain PAO1 associate σ^x with transcription of *oprF*, encoding the major nonspecific porin of *Pseudomonas*, under our experiments

conditions with PA14, this porin expression is not induced by σ^x overexpression. Thus, the effects observed in this overexpression cannot be attributed to OprF. Transcription of *oprF* in PA14 proved to be mainly controlled by the σ^{70} -dependent promoter region, instead of the σ^x -dependent promoter region reported in the literature. Proteomic analyses were performed to investigate the elements involved in these effects of σ^x overexpression, which revealed the induction of several enzymes involved in fatty acids biosynthesis. Cells overexpressing σ^x exhibit a greater proportion of hexadecanoic (C16) and hexadecenoic (C16: 1) acids and anisotropy data show higher fluidity of the membrane (s). This work is the first report of an ECF sigma factor involved in lipid biosynthesis in *P. aeruginosa*.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, ECF sigma factors, lipid biosynthesis, membrane fluidity

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Biossíntese de ácidos graxos em <i>P. aeruginosa</i>	27
Figura 2. Curvas de crescimento de PA14 superexpressando os fatores sigma 21550 (ALB02), 26600 (ALB03), σ^x (ALB04), 28970 (ALB05), 46810 (ALB06) e 55550 (ALB07).....	47
Figura 3. A superexpressão de PA14_55550 altera a produção de piocianina.....	48
Figura 4. Ensaio de início de formação de biofilme com PA14 superexpressando os fatores sigma ECF.....	49
Figura 5. Ensaio de atividade dos promotores de <i>pvrSR</i> e <i>rcsCB</i> em células superexpressando os fatores sigma ECF escolhidos.....	50
Figura 6. A sobrevivência e a morfologia das células são alteradas pela superexpressão de σ^x	52
Figura 7. A superexpressão de <i>sigX</i> durante a fase exponencial do crescimento mantém o perfil bifásico da curva e o perfil de sobrevivência das células de <i>P. aeruginosa</i> PA14.....	54
Figura 8. A recuperação do crescimento na curva bifásica da linhagem superexpressando <i>sigX</i> independe de <i>MvfR</i> ou <i>RhlR</i>	56
Figura 9. Separação de LPS em gel de gradiente de 8 a 18% de poliacrilamida.....	57
Figura 10. Ensaio de atividade do promotor de <i>sigX</i> em PA14 mostra sua indução em baixa osmolaridade.....	59
Figura 11. Esquema das três regiões clonadas independentemente no Mini-CTX_lacZ para a construção das linhagens repórteres ALB117, ALB119 e ALB121.....	61
Figura 12. Ensaio de atividade do promotor de <i>oprF</i> dependente de σ^{70} em ALB121 mostra sua indução em baixa osmolaridade, enquanto o promotor dependente de σ^x em ALB119 não apresenta atividade nas condições testadas.....	61
Figura 13. Região codificadora de <i>sigX</i> e suas adjacências.....	62
Figura 14. A atividade do promotor do operon <i>cmaX-crfX-cmpX</i> mostra independência em relação à concentração de sal no meio, mas parece variar quanto à fase de crescimento.....	63
Figura 15. Ensaio de atividade do promotor de <i>sigX</i> mostra uma autorregulação negativa, enquanto o promotor de <i>cmaX</i> não sofre influência da superexpressão de <i>sigX</i>	64
Figura 16. A atividade da região regulatória de <i>oprF</i> resulta somente do promotor dependente de σ^{70} e é reduzida na superexpressão de <i>sigX</i>	65
Figura 17. Ensaios de qRT-PCR mostram que a superexpressão plasmidial mais drástica de σ^x em PA14 causa redução no nível de mRNA de <i>oprF</i> em 6 horas de crescimento, porém a indução de <i>sigX</i> na fase exponencial não causa efeito nos níveis do mRNA de <i>oprF</i>	67
Figura 18. Níveis de indução do mRNA de <i>sigX</i> nas linhagens ALB04 (construção plasmidial para superexpressão de <i>sigX</i>) e ALB09 (construção de superexpressão integrada no cromossomo), comparados com ALB01 contendo arabinose.....	68

Figura 19. A superexpressão de <i>sigX</i> a partir da construção integrada no cromossomo de PA14 não causa efeito na transcrição de <i>oprF</i>	69
Figura 20. RpoS atua na transcrição de <i>sigX</i> , <i>cmaX</i> e <i>oprF</i>	71
Figura 21. Região regulatória de <i>oprF</i>	73
Figura 22. A expressão de σ^x em ALB04 é controlada ao longo da curva de crescimento.....	74
Figura 23. Exemplos de géis bidimensionais usados nas análises proteômicas de ALB04 em comparação com ALB01.....	75
Figura 24. <i>Weblogo</i> do consenso encontrado nas regiões a montante das unidades transcricionais, cujos produtos foram induzidos na superexpressão de <i>sigX</i>	78
Figura 25. <i>fabD</i> , <i>fabH3</i> e <i>fabG</i> são regulados em nível de transcrição na superexpressão de <i>sigX</i>	80
Figura 26. PA14_21550 é regulado por σ^x e não é responsável pela expressão diferencial das enzimas da via biossintética de ácidos graxos observada na análise proteômica.....	82
Figura 27. ALB04 apresenta uma maior proporção de ácidos graxos de cadeia mais curta e sua membrana é mais fluida, comparada a ALB01.....	86
Tabela 1. Genes coficando fatores sigma ECF em <i>P. aeruginosa</i> PAO1 e PA14.....	22
Tabela 2. Linhagens utilizadas neste trabalho.....	31
Tabela 3. Plasmídeos utilizados neste trabalho.....	33
Tabela 4. Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.....	34
Tabela 5. Soluções usadas para o preparo das amostras e corrida da eletroforese bidimensional.....	44
Tabela 6. Proteínas de <i>P. aeruginosa</i> PA14 com expressão diferencial em células superexpressando o fator sigma ECF σ^x	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D: bidimensional

ACC: acetil-CoA carboxilase

ACP: proteína carreadora de acil (*acyl carrier protein*)

Ara: arabinose

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

C12-AHL: *N*-3-oxododecanoil-L-homoserinolactona

C4-AHL: *N*-butanoil-L-homoserinolactona

cDNA: DNA complementar

CSS: sistema de sinalização de superfície celular (*cell-surface signaling system*)

DNA: ácido desoxirribonucleico

DO: densidade óptica

DPH: 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno

ECF: fator sigma de função extracitoplasmática (*extracytoplasmic function*)

FAME: metil éster de ácidos graxo (*fatty acid methyl ester*)

FASI: sistema de síntese de ácidos graxos tipo I (*fatty acid synthesis type I*)

FASII: sistema de síntese de ácidos graxos tipo II (*fatty acid synthesis type II*)

GC-MS: cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

HPLC-MS/MS: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a dois espectrômetros de massa

LB: meio de cultura Luria-Bertani

LPS: lipopolissacarídeo

mRNA: RNA mensageiro

NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido

NADP⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidado

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido

ONPG: orto-nitrofenol-D-galactopiranosídeo

ORF: quadro aberto de leitura (*open reading frame*)

PCR: reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)

PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonil

PQS: sinal de quinolona de *Pseudomonas* (*Pseudomonas quinolone signal*)

qRT-PCR: RT-PCR quantitativo

RNA: ácido ribonucleico

Rpm: rotações por minuto

RT-PCR: *reverse transcriptase – polymerase chain reaction*

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

UFC: unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

1. Introdução.....	16
1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
1.1.1. A linhagem UCBPP-PA14	16
1.2. Fatores sigma	18
1.2.1. Fatores sigma ECF	19
1.2.2. σ^x em <i>P. aeruginosa</i>	22
1.3. Biossíntese de ácidos graxos.....	24
2. Objetivos.....	29
3. Material e métodos	30
3.1. Linhagens, plasmídeos, oligonucleotídeos e condições de cultura.....	30
3.1.1. Obtenção das linhagens repórteres para ensaios de β -galactosidase.....	35
3.1.2. Construção dos plasmídeos para a superexpressão dos fatores sigma ECF selecionados.....	36
3.2. Técnicas Básicas de Biologia Molecular	36
3.3. Curvas de crescimento e ensaios de viabilidade	37
3.4. Ensaio de início da formação de biofilme.....	38
3.5. Análise do perfil de lipopolissacarídeo (LPS)	38
3.6. Análise da expressão gênica	39
3.6.1. RT-PCR quantitativo	39
3.6.2. Ensaio de atividade de β -galactosidase.....	40
3.7. Obtenção do anticorpo policlonal anti-SigX e ensaios de <i>immunoblotting</i>	41
3.8. Análise proteômica	42
3.9. Análise da composição de ácidos graxos totais de ALB01 e ALB04	44
3.10. Análise de anisotropia.....	44
4. Resultados e discussão	46
4.1. Caracterização das linhagens com superexpressão dos fatores sigma ECF em <i>P. aeruginosa</i> PA14.....	46
4.2. Efeito das superexpressões dos fatores sigma ECF nos promotores de <i>pvrSR</i> e <i>rscCB</i>	49
4.3. Efeito da superexpressão de σ^x na sobrevivência e morfologia das células de <i>P. aeruginosa</i> PA14.....	50
4.4. Envolvimento dos sistemas de <i>quorum sensing</i> na curva bifásica de ALB04.....	55
4.5. Efeito da superexpressão de <i>sigX</i> no perfil de lipopolissacarídeo de <i>P. aeruginosa</i> PA14.....	56
4.6. Efeito da osmolaridade do meio na atividade promotora de <i>sigX</i>	58

4.7. Regulação de <i>oprF</i> e <i>cmaX</i> em PA14.....	59
4.8. Efeito da superexpressão de σ^x nos promotores de <i>sigX</i> , <i>oprF</i> e do operon <i>cmaX</i> ...	63
4.9. Investigação da participação de RpoS no perfil bifásico da curva de crescimento de PA14 superexpressando <i>sigX</i>	69
4.10. Os níveis da proteína σ^x são controlados ao longo do crescimento em condição de superexpressão de <i>sigX</i>	73
4.11. Análise proteômica da superexpressão de σ^x indica seu envolvimento na biossíntese de ácidos graxos	74
4.12. Validação da análise proteômica e descrição dos alvos da superexpressão de <i>sigX</i> .	79
4.12.1. FabD e FabG	79
4.12.2. FabH3 e o operon <i>fabH3</i> -PA14_21550-PA14_21560.....	80
4.12.3. FabY, FabB e FabF2	82
4.12.4. Outras proteínas induzidas na superexpressão de <i>sigX</i>	83
4.13. Proteínas induzidas nas células recuperadas.....	84
4.14. Composição de ácidos graxos e fluidez da membrana de ALB01 e ALB04.....	85
5. Conclusões.....	88
6. Referências	90

1. Introdução

1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é uma proteobactéria do grupo gama ubíqua, capaz de infectar uma ampla gama de hospedeiros, entre eles protozoários, insetos, plantas e mamíferos (Mahajan-Miklos *et al.*, 2000). A presença de um grande número de sistemas de sinalização codificados em seu genoma contribui para a habilidade dessa bactéria colonizar uma grande variedade de ambientes e hospedeiros e esse tema tem sido um importante foco de estudos (Stover *et al.*, 2000). Em humanos, caracteriza-se como um patógeno oportunista, chegando a ser relacionada à cerca de 10 a 20 % de todas as infecções hospitalares (Ikeno *et al.*, 2007). Além disso, *P. aeruginosa* é o patógeno predominante em pulmões de pacientes com fibrose cística e em infecções em queimados graves (Lyczak *et al.*, 2002). O tratamento é dificultado pelo fato dessa bactéria ser naturalmente resistente a vários tipos de antibióticos, portanto muito difícil de ser eliminada (Govan e Deretic, 1996; Hoiby, 1993). A capacidade de *P. aeruginosa* crescer em forma de biofilme e colonizar com sucesso as mais variadas superfícies bióticas e abióticas agrava o problema das infecções nosocomiais (Costerton *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 2000). Assim, explica-se o interesse de muitos grupos de pesquisa na compreensão dos mecanismos de adaptação e de patogenicidade desse microrganismo, a fim de encontrar estratégias alternativas de tratamento contra as infecções causadas por ele.

1.1.1. A linhagem UCBPP-PA14

A linhagem UCBPP-PA14 (Rahme *et al.*, 1995) ou simplesmente PA14, usada no presente trabalho, é um isolado de queimadura em humano e que teve virulência comprovada em hospedeiros filogeneticamente distintos (An *et al.*, 2009; Mahajan-Miklos *et al.*, 2000). Durante o sequenciamento de seu genoma (Lee *et al.*, 2006), foram observadas regiões

variáveis em relação ao primeiro genoma sequenciado de *P. aeruginosa*, o da linhagem PAO1. Mais recentemente, em uma análise comparativa de genomas com PAO1 e outras quatro linhagens de *P. aeruginosa*, provenientes de isolados clínicos, foi relatado que PA14 possui o maior número de segmentos de ORFs únicos dessa linhagem. Esses segmentos linhagem-específicos são denominados regiões de plasticidade genômica (RGP, de *region of genomic plasticity*) e incluem qualquer região de, no mínimo, quatro ORFs contíguas ausente em pelo menos um dos genomas analisados (Mathee *et al.*, 2008). Entre essas RGPs destaca-se a ilha de patogenicidade 1 de *P. aeruginosa*, ou PAPI-1 (He *et al.*, 2004), parte da qual está presente também nas quatro das linhagens comparadas no trabalho de Mathee e colaboradores, excetuando PAO1, e contém todas as 33 ORFs definidas como *core* de uma família de ilhas genômicas presentes em beta e gamaproteobactérias (Mohd-Zain *et al.*, 2004), além de regiões particulares à linhagem PA14. Nessa linhagem, entre as 115 ORFs anotadas em PAPI-1, muitas são genes potencialmente ligados a mecanismos conservados de patogenicidade presentes também nos genomas de outras bactérias encontradas em associação a plantas e animais (He *et al.*, 2004), o que pode contribuir para o amplo espectro de hospedeiros de PA14.

Dentro dessa ilha de patogenicidade PAPI-1 encontram-se, entre duas repetições diretas, um grupo de genes codificando uma fímbria montada pelo sistema *chaperone-usher* (*cupDI-5*) e dois operons codificando sistemas de dois componentes (*rscCB* e *pvrSR*), que atuam na regulação dos genes da fímbria CupD (Mikkelsen *et al.*, 2009; Nicastro *et al.*, 2009). Essa regulação tem sido foco de estudo do nosso grupo e foi mostrada em trabalhos anteriores (Boechat, 2008; Nicastro, 2008; Nicastro *et al.*, 2009), entretanto ainda não são conhecidos os fatores ambientais que regulam as cascatas de sinalização dos sistemas PvrSR e RcsCB e, conseqüentemente, a expressão dos genes *cupD*. Também não há informações a respeito da existência de um controle da expressão gênica dos próprios sistemas de dois componentes em

nível de transcrição, sendo que a busca dessa regulação foi um dos objetivos iniciais deste trabalho.

1.2. Fatores sigma

Fatores sigma (σ) são subunidades dissociáveis e essenciais para a atividade da RNA polimerase de bactérias, as quais estão envolvidas no reconhecimento do promotor e na iniciação da transcrição, que depois pode ser continuada e terminada sem sua presença. Além do σ^{70} , o fator sigma principal que permite à RNA polimerase reconhecer a maioria dos promotores, *Escherichia coli* possui outros seis fatores sigma alternativos, que se acumulam em resposta a situações ou estresses específicos e competem com σ^{70} pela ligação ao cerne da RNA polimerase, culminando na transcrição de genes importantes para aquela condição ambiental (revisado por Ishihama, 2000). Fatores sigma alternativos são amplamente distribuídos em bactérias (Wosten, 1998).

Os fatores sigma são divididos em duas famílias estruturalmente não relacionadas, σ^{70} e σ^{54} , sendo a última não abordada no presente trabalho. A grande maioria dos fatores sigma pertence à família σ^{70} , que se subdivide em quatro subfamílias, com base na similaridade de sequência e arquitetura de domínios da proteína. A subfamília dos fatores sigma primários, que são os mais relacionados a σ^{70} de *E. coli*, incluem fatores sigma essenciais ao crescimento da bactéria e altamente similares entre diferentes organismos, mantendo entre eles uma identidade de aminoácidos de pelo menos 51%, sendo especialmente conservadas as regiões responsáveis pela ligação ao promotor dos genes alvo. A segunda subfamília abrange os fatores sigma dispensáveis para o crescimento celular exponencial, mas que ainda são altamente similares aos primários, principalmente nas regiões de ligação ao DNA, como RpoS (σ^s) de *E. coli* que, de fato, tem parte do seu regulon sobreposto ao do σ^{70} , indicando que eles reconhecem sequências similares. Na terceira subfamília estão os outros fatores sigma

alternativos que apresentam, no máximo, 27% de identidade de aminoácidos com os fatores sigma primários. São exemplos os fatores sigma de choque térmico, como RpoH (σ^H) de *E. coli*; fatores sigma de flagelo (FliA e SigD, de *Salmonella enterica* Typhimurium e *Bacillus subtilis*, respectivamente) e fatores sigma de esporulação de *B. subtilis*. Por fim, a mais numerosa subfamília é composta pelos fatores extracitoplasmáticos ou ECFs (σ^E), descritos com mais detalhes a seguir (revisado por Hengge-Aronis, 2002; Lonetto *et al.*, 1992; Paget e Helmann, 2003; Staron *et al.*, 2009).

1.2.1. Fatores sigma ECF

Os fatores sigma ECF (de *extracytoplasmic function*) foram assim denominados porque os primeiros membros descritos estão relacionados com a resposta a estresses extracitoplasmáticos ou com a expressão de proteínas periplasmáticas ou extracelulares, embora alguns membros tenham funções diversas, como a adaptação ao estresse oxidativo na fase estacionária (revisado por Helmann, 2002; Missiakas e Raina, 1998).

Fatores sigma ECF são membros de sistemas de sinalização da superfície celular (CSS, de *cell-surface signaling systems*), compostos ainda de reguladores que modulam a função do fator sigma ECF e proteínas responsáveis por detectar os sinais ambientais, aos quais a bactéria precisa responder (Braun *et al.*, 2006; Llamas *et al.*, 2008; Visca *et al.*, 2002).

Exemplos de fatores sigma ECF incluem σ^E e FecI de *E. coli*, σ^W de *Bacillus subtilis*, σ^E de *Rhodobacter sphaeroides* e σ^E de *Streptomyces coelicolor* (Ades, 2004; Alba e Gross, 2004; Braun e Mahren, 2005; Dufour *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2002). Essas proteínas compartilham várias características a respeito dos mecanismos de transdução de sinal e regulação gênica mediados por elas. Geralmente, fatores sigma ECF têm sua expressão autorregulada e os genes que codificam os fatores ECF são expressos em conjunto com genes codificando fatores anti-sigma cognatos. Na ausência do estímulo, o anti-sigma permanece

fortemente ligado ao fator sigma, mantendo-o inativo. Quando o sinal apropriado é recebido, o anti-sigma é inativado ou por proteólise (σ^E de *E. coli* ou σ^W de *B. subtilis*), por mudanças conformacionais (σ^E de *S. coelicolor* e *R. sphaeroides*) ou pela sua interação com um anti-anti-sigma (Lourenço *et al.*, 2011), o que resulta em liberação e consequente ativação do fator sigma ECF (Ades, 2008; Brooks e Buchanan, 2008; Campbell *et al.*, 2008).

O fator σ^E de *E. coli* regula a expressão de CpxAR, que por sua vez ativa os genes do pilus P, montado pelo sistema *chaperone-usher*. Em *E. coli* e bactérias relacionadas, membros do regulon de σ^E desempenham funções conhecidamente importantes para a patogenicidade. Em *P. aeruginosa*, o fator sigma ECF AlgU foi bastante estudado por sua relação com a produção de alginato e a conversão ao fenótipo mucóide, comumente encontrado em isolados coletados dos pulmões de pacientes com fibrose cística (Deretic *et al.*, 1993). Seu regulon inclui genes para toxinas, fatores secretados, proteínas de transporte, enzimas e lipoproteínas, e sua função foi interpretada como uma resposta de adaptação ao ambiente do hospedeiro (Firoved e Deretic, 2003). Essa relação dos fatores sigma ECF com a regulação de fímbrias e outros fatores importantes para a virulência bacteriana, associada à abundância de CSS em *P. aeruginosa*, instigou-nos a investigar esses sistemas e sua possível relação com a regulação da fímbria CupD.

A análise *in silico* da sequência genômica de *P. aeruginosa* PAO1 revelou a presença de 19 ORFs codificando supostas proteínas com mais de 47% de similaridade com membros da família ECF (Llamas *et al.*, 2008). Após uma busca por ORFs similares a essas da linhagem PAO1 em PA14 feita com a ferramenta BLAST no site www.pseudomonas.com (Winsor *et al.*, 2011), pudemos encontrar as 19 anteriormente citadas e, pela procura de similaridade com fatores sigma de *E. coli*, encontramos uma ORF adicional sem ortólogo em PAO1, com a descrição de proteína hipotética com domínio de σ^{70} . Entre esses 20 fatores sigma ECF preditos em *P. aeruginosa*, AlgU e VreI estão relacionados respectivamente à

produção de alginato e virulência (Llamas *et al.*, 2009; Mathee *et al.*, 1997), e outros 12 estão caracterizados como envolvidos com a captação de sideróforos, incluindo o bem caracterizado PvdS, o qual também desempenha um importante papel na virulência (Banin *et al.*, 2005; Beare *et al.*, 2003; Lamont *et al.*, 2002; Leoni *et al.*, 2000; Llamas *et al.*, 2008; Llamas *et al.*, 2006; Ochsner *et al.*, 2000). Entretanto, seis outros fatores sigma ECF (destacados em negrito na tabela 1), permanecem pobremente ou não caracterizados e foram escolhidos para serem estudados no contexto deste trabalho. Mais recentemente, entretanto, o ortólogo em PAO1 de uma das ORFs escolhidas, a PA14_55550, teve sua função relacionada com virulência de *P. aeruginosa* em *zebrafish* e seu produto foi denominado VreI, de *virulence regulator involving ECF sigma factor* (Llamas *et al.*, 2009), o que não a tornou menos interessante para estudo por nosso grupo, já que esse trabalho não revelou o regulon de VreI. Na linhagem PAO1, foi demonstrado que σ^x é requerido para o crescimento da bactéria em baixa osmolaridade e para a transcrição de *oprF*, que codifica a principal porina inespecífica de *P. aeruginosa* (Brinkman *et al.*, 1999; Bouffartigues *et al.*, 2012). O estudo desses fatores sigma ECF pode revelar mecanismos inéditos de adaptação dessa bactéria tão versátil.

Tabela 1. Genes codificando fatores sigma ECF em *P. aeruginosa* PAO1 e PA14.

Anotação em PAO1	Anotação em PA14	Função	Referência
PA0149	PA14_01840	Absorção de ferro	(Llamas <i>et al.</i> , 2008)
PA0472	PA14_06180	Absorção de ferricromo	(Llamas <i>et al.</i> , 2006)
PA0675 (<i>vreI</i>)	PA14_55550	Envolvido em virulência	(Llamas <i>et al.</i>, 2009)
PA0762	PA14_54430 (<i>algU</i>)	Produção de alginato	(Mathee <i>et al.</i> , 1997)
PA1300	PA14_47400	Absorção de heme	(Llamas <i>et al.</i> , 2008)
PA1351	PA14_46810	desconhecida	-
PA1363	PA14_46660	Absorção de alcaligina	(Llamas <i>et al.</i> , 2008)
PA1776	PA14_41575 (<i>sigX</i>)	desconhecida	-
PA1912	PA14_39800	Absorção de micobactina/ carboximicobactina	(Llamas <i>et al.</i> , 2008)
PA2050	PA14_37990	Absorção de metal	(Llamas <i>et al.</i> , 2008)
PA2093	PA14_37430	Absorção de sideróforo	(Llamas <i>et al.</i> , 2008)
PA2387	PA14_33800	Absorção de pioverdina	(Beare <i>et al.</i> , 2003)
PA2426	PA14_33260 (<i>pvdS</i>)	Produção de pioverdina, exotoxina A e endoprotease PrpL	(Lamont <i>et al.</i> , 2002)
PA2468	PA14_32710 (<i>foxI</i> da linhagem Les)	Absorção de ferrioxamina	(Llamas <i>et al.</i> , 2006)
PA2896	PA14_26600	desconhecida	-
PA3285	PA14_21550	desconhecida	-
PA3410	PA14_19990	Absorção de heme	(Ochsner <i>et al.</i> , 2000)
PA3899	PA14_13460	Absorção de citrato de ferro	(Banin <i>et al.</i> , 2005)
PA4896	PA14_64700	Absorção de sideróforos	(Llamas <i>et al.</i> , 2008)
S/ ortólogo em PAO1	PA14_28970	proteína hipotética com domínio de sigma 70	-

Em negrito: fatores sigma pobremente caracterizados, estudados neste trabalho.

1.2.2. σ^x em *P. aeruginosa*

Na literatura é relatado que, em PAO1, σ^x controla a transcrição de um dos promotores de *oprF* (Bouffartigues *et al.*, 2012; Brinkman *et al.*, 1999; Nestorovich *et al.*, 2006), que codifica a principal porina não específica de *Pseudomonas spp.*, a qual desempenha um importante papel na manutenção da forma celular e é requerida para o crescimento da cultura

em meio com baixa osmolaridade (Gotoh *et al.*, 1989; Hancock *et al.*, 1981; Nicas e Hancock, 1983).

OprF participa ainda de vários processos, incluindo a adesão a células eucarióticas (Azghani *et al.*, 2002) e a formação de biofilme sob condições anaeróbicas (Hassett *et al.*, 2002; Yoon *et al.*, 2002). Já foi demonstrada também a interação de interferon- γ e OprF, o que resulta na produção de dois fatores de virulência, a lectina PA-1L e a fenazina piocianina (Wu *et al.*, 2005), sugerindo que OprF poderia ser um sensor que permitiria à bactéria perceber o sistema imune do hospedeiro (Wagner *et al.*, 2006). Num trabalho que simula a estrutura de OprF na membrana, foram detectadas fortes interações entre as regiões de alça dessa proteína e grupos funcionais do LPS (Straatsma e Soares, 2009).

Mais recentemente, foi demonstrado que OprF é requerida também para a virulência de *P. aeruginosa*, com sua ausência tendo resultado na desorganização da rede de *quorum sensing*, que consiste em dois sistemas baseados em *N*-acil-L-homoserina lactona (*las* e *rhl*) ligados via um sistema dependente de 4-quinolona (PQS, de *Pseudomonas quinolone signal*) (Fito-Boncomppte *et al.*, 2010). Conseqüentemente, a produção dos diversos fatores de virulência dependentes de *quorum sensing*, como a elastase LasB, a fenazina piocianina, a lectina PA1-L e a exotoxina A, além do sistema de secreção tipo III (T3SS) está prejudicada no mutante *oprF*, destacando o papel de OprF no processo infeccioso (Fito-Boncomppte *et al.*, 2010). Esse mesmo trabalho relata a redução ou atraso na produção das moléculas sinais C12-AHL (*N*-3-oxododecanoil-L-homoserinolactona) e C4-AHL (*N*-butanoil-L-homoserinolactona) dos sistemas *las* e *rhl*, respectivamente, e o atraso na síntese de PQS, com acúmulo de seu precursor na linhagem mutante para *oprF*.

1.3. Biossíntese de ácidos graxos

A síntese de ácidos graxos representa um processo central e conservado em todos os organismos, devido à importância de seus produtos, que são componentes essenciais de membranas e elementos cruciais no armazenamento de energia. Além disso, os ácidos graxos ou intermediários da sua via de síntese em bactérias são incorporados em coenzimas, moléculas sinal de *quorum sensing*, sideróforos e biossurfactantes, tornando-os essenciais para a maioria dos processos celulares (revisado em Parsons e Rock, 2013). Apesar das reações de síntese de ácidos graxos serem conservadas, dois sistemas biossintéticos distintos são responsáveis pela montagem dessas moléculas. Mamíferos e levedura utilizam o sistema de síntese de ácidos graxos tipo I (FASI, de *fatty acid synthesis type I*), no qual as funções individuais envolvidas na síntese de ácidos graxos citosólica são desempenhadas por múltiplos domínios em uma ou, no máximo, duas cadeias polipeptídicas distintas (Smith, 1994; Smith *et al.*, 2003; Tehlivets *et al.*, 2007). Por outro lado, plantas e a maioria das bactérias geralmente utilizam FASII, que é composta de enzimas discretas para a síntese *de novo* de ácidos graxos (Cronan, 1996; Gago *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2004; Schweizer e Hofmann, 2004; White *et al.*, 2005). Esse tipo de sistema dá flexibilidade à bactéria, tornando-a mais versátil na montagem de diversos ácidos graxos com composição e estrutura diferentes, enquanto organismos que dispõem de FASI estão normalmente limitados à síntese de cadeias de ácidos graxos longas e saturadas (White *et al.*, 2005). Por exemplo, *E. coli* e *Streptococcus pneumoniae* produzem ácidos graxos saturados e insaturados de cadeia não ramificada e número par de carbonos, mas muitas Gram-positivas, como *B. subtilis* e *Staphylococcus aureus* produzem predominantemente ácidos graxos de cadeia ramificada e com número ímpar de carbonos (Choi *et al.*, 2000; Khandekar *et al.*, 2001). As diferenças entre os sistemas I e II fazem das enzimas de FASII bons alvos para agentes antibacterianos,

já que estas não estão presentes em mamíferos (Heath *et al.*, 2001, 2002; Payne *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2006).

O advento da biologia molecular e a abundância de informação e técnicas com *E. coli* fizeram com que esse organismo despontasse e permanecesse por décadas como modelo na pesquisa do metabolismo de lipídeos em bactéria. O isolamento de mutantes defeituosos em determinados aspectos da via levou à identificação de genes e enzimas adicionais envolvidos na biossíntese de ácidos graxos e definiram suas funções fisiológicas. Atualmente, a disponibilidade de sequências genômicas de um número crescente de microrganismos expande constantemente o conhecimento acerca da FASII para muito além do modelo de *E. coli* (revisado por Rock e Jackowski, 2002 e Parsons e Rock, 2013). O sistema de síntese de ácidos graxos de *P. aeruginosa* é similar ao de *E. coli*, porém existem algumas particularidades já descritas (Heath *et al.*, 2001; Hoang e Schweizer, 1999; Kutchma *et al.*, 1999; Yuan *et al.*, 2012a; Yuan *et al.*, 2012b) e isoformas de várias enzimas que ainda não foram estudadas. Comparada a *E. coli*, *P. aeruginosa* apresenta um número maior de genes cujos produtos estão previstos como enzimas de síntese de ácidos graxos, o que pode estar relacionado com a maior versatilidade dessa bactéria. As reações principais da FASII em *P. aeruginosa* estão brevemente descritas abaixo e esquematizadas na figura 1.

No módulo de iniciação da FASII a acetil-CoA carboxilase (ACC) catalisa a produção de malonil-CoA a partir de acetil-CoA, adicionando CO₂ do íon bicarbonato. Em seguida, malonil-CoA é transferido para a proteína carreadora de acil (ACP) por FabD (malonil-CoA-(ACP) transacilase), gerando malonil-ACP, que é condensado com acetil-CoA na reação catalisada por FabY (3-oxoacil-(ACP)-sintase), gerando o intermediário β-oxobutiril-ACP, que entra no módulo de alongação para ter sua cadeia saturada estendida de duas unidades carbônicas por ciclo (Yuan *et al.*, 2012b). Malonil-ACP também pode ser condensado com octanoil-CoA proveniente da β-oxidação na reação catalisada por FabH3, gerando decenil-

ACP, que também segue no ciclo de alongação (Yuan *et al.*, 2012a). Nenhuma das quatro enzimas de *P. aeruginosa* homólogas a FabH são essenciais para essa bactéria, enquanto *E. coli* apresenta apenas uma isoforma que é crucial para o início da síntese de ácidos graxos (Lai e Cronan, 2003). Em *B. subtilis*, as duas isoformas de FabH discriminam entre a síntese de ácidos graxos de cadeias lineares ou ramificadas, modulando assim a fluidez da membrana (Choi *et al.*, 2000; Kingston *et al.*, 2011).

No módulo de alongação, β -oxoacil-ACP é reduzida por FabG (3-cetoacil-(ACP)-redutase), numa reação dependente de NADPH, gerando β -hidroxiacil-ACP, que tem seu grupo hidroxila removido por FabA (3-hidroxiacil-(ACP)-desidratase) ou FabZ ((3R)-hidroxiacil-(ACP)-desidratase), resultando em uma dupla ligação, a qual é reduzida em uma reação dependente de NADH, catalisada por uma enoil-(ACP)-redutase, que em *P. aeruginosa* pode ser FabI ou FabV (Zhu *et al.*, 2010). Nesse ponto, o ciclo recomeça com a condensação do acil-ACP com outro grupo malonil-ACP, mas dessa vez catalisada por FabB (3-oxoacil-ACP-sintase I) ou FabF (3-oxoacil-ACP-sintase II) (revisado por Chan e Vogel, 2010) (figura 1).

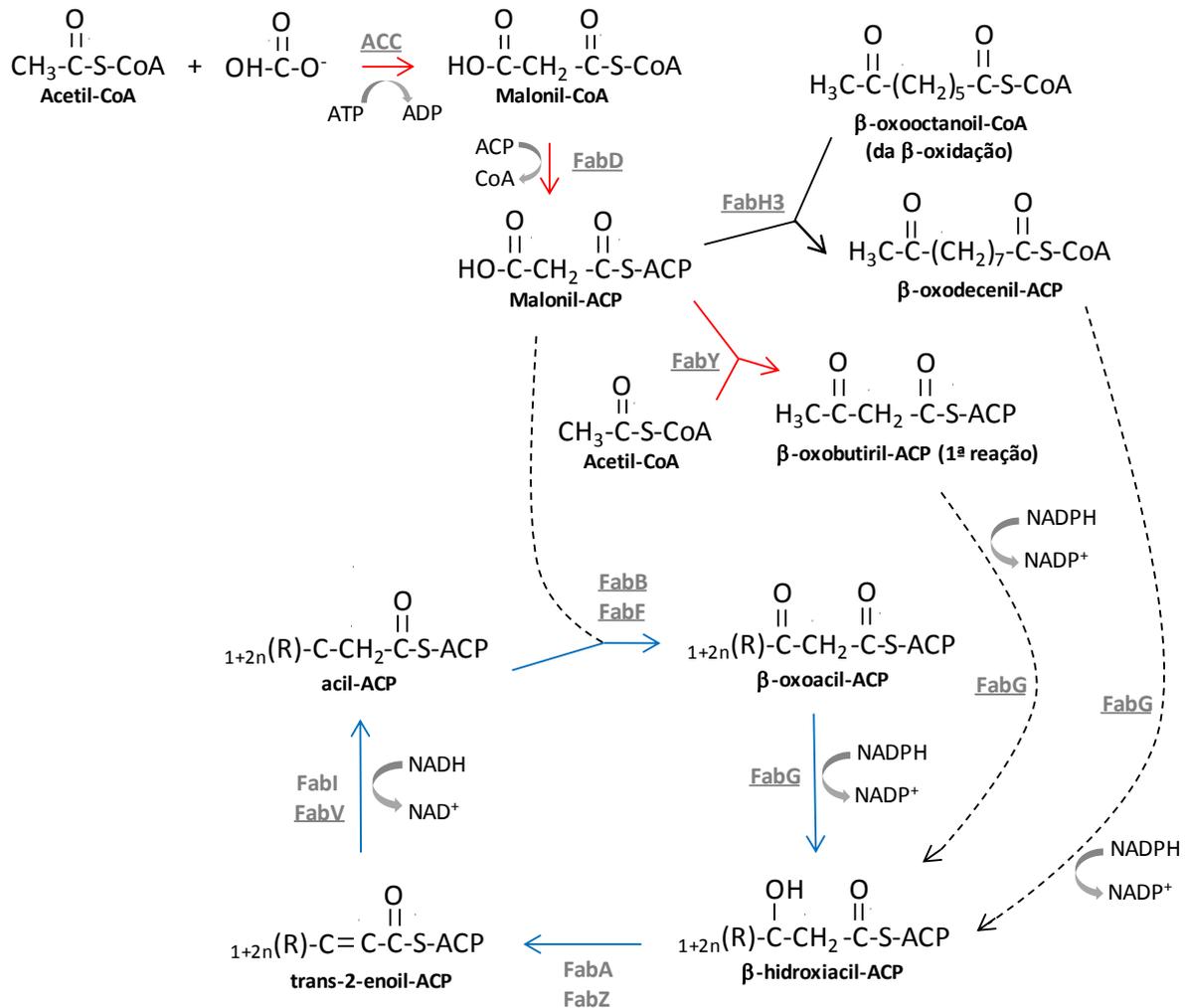


Figura 1. Biossíntese de ácidos graxos em *P. aeruginosa*. Após a iniciação da biossíntese da cadeia acil (reações representadas pelas setas vermelhas), o ciclo biossintético é repetido múltiplas vezes até a obtenção de cadeias C₁₆ ou C₁₈ acil-ACP (setas azuis). As setas tracejadas representam a entrada da molécula no módulo de alongação. (Baseado em Chan e Vogel, 2010; Parsons e Rock, 2013; Yuan *et al.*, 2012a; Yuan *et al.*, 2012b). As enzimas sublinhadas foram induzidas na superexpressão de σ^x neste trabalho (Tabela 6, seção de Resultados e Discussão).

O acil-ACP produzido no ciclo de alongação pode ser usado em reações de aciltransferases que produzem ácido fosfatídico, o precursor universal de fosfolipídeos em bactéria (revisado por Yao e Rock, 2013). Vários intermediários gerados no módulo de alongação também são requeridos para outros processos celulares essenciais, como a síntese de ácido lipoico, coenzima requerida para a atividade da piruvato desidrogenase (Jordan e Cronan, 1997). A biotina, cofator da ACC, também é produzida a partir de intermediários do

ciclo de elongação de ácidos graxos (Lin *et al.*, 2010). Além disso, os β -hidroxi-ácidos derivados da FASII são componentes estruturais essenciais do LPS, por formarem o lipídeo A, que corresponde à sua âncora hidrofóbica e que não podem ser substituídos por outros ácidos graxos (Raetz *et al.*, 2007). Moléculas que regulam a atividade celular, como as acil-homoserina lactonas, os sinais de quinolona e os ramnolipídeos também têm sua porção acil derivada da via canônica de biossíntese de lipídeos (Bi *et al.*, 2012; Bredenbruch *et al.*, 2005; More *et al.*, 1996; Val e Cronan, 1998; Zhu e Rock, 2008).

A via descrita acima (figura 1) gera ácidos graxos saturados. A produção de ácidos graxos insaturados, um aspecto importante da homeostase da membrana de bactérias, é realizada por mecanismos diversos entre elas. *E. coli*, *P. aeruginosa* e outras γ -proteobactérias utilizam a enzima bifuncional FabA na reação de desidratação do β -hidroxiacil-ACP a *trans*-2-enoil-ACP e a isomerização do *trans*-2-decenoil-ACP a *cis*-2-decenoil-ACP especificamente no estágio de 10 carbonos do ciclo de elongação (Heath e Rock, 1996). O produto da isomerização por FabA deve ser utilizado por FabB para pular a reação de redução catalisada por FabI ou FabV e iniciar a elongação do ácido graxo monoinsaturado (Hoang e Schweizer, 1997). Além da via anaeróbica de FabA/B, *P. aeruginosa* pode gerar ácidos graxos insaturados em duas vias dependentes de oxigênio em que dessaturases modificam fosfolipídeos já formados (sistema DesA) ou ácidos graxos saturados exógenos (DesBC) (Zhu *et al.*, 2006).

2. Objetivos

- Verificar se a transcrição dos operons *pvrSR* e *rscCB* de *P. aeruginosa* é dependente de fatores sigma ECF.
- Caracterizar o papel do fator sigma ECF σ^x no crescimento e fisiologia de *P. aeruginosa*.

3. Material e métodos

3.1. Linhagens, plasmídeos, oligonucleotídeos e condições de cultura

P. aeruginosa PA14 foi usada como receptora das construções para a superexpressão dos fatores sigma ECF e repórteres. *Escherichia coli* DH5- α e S17-1 foram usadas respectivamente para as construções e para conjugação com a *P. aeruginosa* receptora. As linhagens construídas neste trabalho estão descritas nas subseções abaixo e listadas na tabela 2. Os plasmídeos e oligonucleotídeos utilizados nas construções estão descritos, respectivamente, nas tabelas 3 e 4.

As culturas de *P. aeruginosa* e *E. coli* foram feitas rotineiramente em meio Luria-Bertani (LB) acrescido de antibióticos quando necessário (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tetraciclina; 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de carbenicilina; 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido nalidíxico para *P. aeruginosa* e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina; 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tetraciclina; 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de canamicina para *E. coli*). Para a superexpressão dos fatores sigma ECF, 0,2% de arabinose foi adicionado ao meio com gentamicina desde o início da cultura ou a partir da terceira hora de crescimento, conforme indicado em cada ensaio. O crescimento se deu a 37°C e 240 rpm, salvo quando explicitado no texto.

Tabela 2. Linhagens utilizadas neste trabalho.

Linhagem	Descrição	Referência
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>supE44 lacU169(80 lacZM15) hsdR17 recA1 endA11 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Invitrogen
S17-1	F ⁻ λ <i>thi pro recA hsdM⁺</i> , derivada de RP4	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
<i>P. aeruginosa</i>		
PA14	Isolado clínico UCBPP-PA14	(Rahme <i>et al.</i> , 1995)
PA14 <i>rpoS::mar7</i>	Mutante por inserção do transposon <i>mariner</i> na região codificadora de <i>rpoS</i> proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14 <i>mvfR</i> ⁻	PA14 contendo uma mutação pontual em <i>mvfR</i>	(Cao <i>et al.</i> , 2001)
PA14 <i>rhIR</i> ⁻	<i>rhIR::Tc</i> derivada de PA14	(Déziel <i>et al.</i> , 2005)
ALB01	PA14/pJN105	Este trabalho
ALB02	PA14/pALB02	Este trabalho
ALB03	PA14/pALB03	Este trabalho
ALB04	PA14/pALB04	Este trabalho
ALB05	PA14/pALB05	Este trabalho
ALB06	PA14/pALB06	Este trabalho
ALB07	PA14/pALB07	Este trabalho
ALB01 <i>mvfR</i> ⁻	PA14 <i>mvfR</i> ⁻ transformada com pJN105	Este trabalho
ALB04 <i>mvfR</i> ⁻	PA14 <i>mvfR</i> ⁻ transformada com pALB04	Este trabalho
ALB01 <i>rhIR</i> ⁻	PA14 <i>rhIR</i> ⁻ transformada com pJN105	Este trabalho
ALB04 <i>rhIR</i> ⁻	PA14 <i>rhIR</i> ⁻ transformada com pALB04	Este trabalho
ALB09	PA14/pALB09	Este trabalho
ALB101	PA14:: <i>pvrS_lacZT</i>	Este trabalho
ALB103	PA14:: <i>rscC_lacZT</i>	Este trabalho
ALB113	PA14:: <i>psigX_lacZ</i>	Este trabalho
ALB115	PA14:: <i>pcmaX_lacZ</i>	Este trabalho
ALB117	PA14:: <i>poprF1_lacZ</i>	Este trabalho
ALB119	PA14:: <i>poprF2_lacZ</i>	Este trabalho
ALB121	PA14:: <i>poprF3_lacZ</i>	Este trabalho
ALB123	PA14:: <i>pfabD_lacZ</i>	Este trabalho
ALB125	PA14:: <i>pfabH3_lacZ</i>	Este trabalho
ALB113 <i>rpoS::mar7</i>	PA14 <i>rpoS::mar7</i> com <i>psigX_lacZ</i> integrada no cromossomo	Este trabalho
ALB115 <i>rpoS::mar7</i>	PA14 <i>rpoS::mar7</i> com <i>pcmaX_lacZ</i> integrada no cromossomo	Este trabalho
ALB117 <i>rpoS::mar7</i>	PA14 <i>rpoS::mar7</i> com <i>poprF1_lacZ</i> integrada no cromossomo	Este trabalho
ALB01:: <i>pvrS_lacZ</i>	PA14:: <i>pvrS_lacZT</i> , carregando o plasmídeo pJN105; Tc ^R , Gm ^R	Este trabalho

Linhagem	Descrição	Referência
ALB02::pvrS_lacZ	PA14::pvrS_lacZT, carregando o plasmídeo pALB02; Tc ^R , Gm ^R	Este trabalho
ALB03::pvrS_lacZ	PA14::pvrS_lacZT, carregando o plasmídeo pALB03; Tc ^R , Gm ^R	Este trabalho
ALB04::pvrS_lacZ	PA14::pvrS_lacZT, carregando o plasmídeo pALB04; Tc ^R , Gm ^R	Este trabalho
ALB05::pvrS_lacZ	PA14::pvrS_lacZT, carregando o plasmídeo pALB05; Tc ^R , Gm ^R	Este trabalho
ALB06::pvrS_lacZ	PA14::pvrS_lacZT, carregando o plasmídeo pALB06; Tc ^R , Gm ^R	Este trabalho
ALB07::pvrS_lacZ	PA14::pvrS_lacZT, carregando o plasmídeo pALB07; Tc ^R , Gm ^R	Este trabalho
ALB01::rcsC_lacZ	PA14::rcsC_lacZT, carregando o plasmídeo pJN105; Tc ^R , Gm ^R	Este trabalho
ALB02::rcsC_lacZ	PA14::rcsC_lacZT, carregando o plasmídeo pALB02; Tc ^R , Gm ^R	Este trabalho
ALB03::rcsC_lacZ	PA14::rcsC_lacZT, carregando o plasmídeo pALB03; Tc ^R , Gm ^R	Este trabalho
ALB04::rcsC_lacZ	PA14::rcsC_lacZT, carregando o plasmídeo pALB04; Tc ^R , Gm ^R	Este trabalho
ALB05::rcsC_lacZ	PA14::rcsC_lacZT, carregando o plasmídeo pALB05; Tc ^R , Gm ^R	Este trabalho
ALB06::rcsC_lacZ	PA14::rcsC_lacZT, carregando o plasmídeo pALB06; Tc ^R , Gm ^R	Este trabalho
ALB07::rcsC_lacZ	PA14::rcsC_lacZT, carregando o plasmídeo pALB07; Tc ^R , Gm ^R	Este trabalho
ALB01::psigX_lacZ	PA14::psigX_lacZ, carregando o plasmídeo pJN105; Tc ^R , Gm ^R	Este trabalho
ALB04::psigX_lacZ	PA14::psigX_lacZ, carregando o plasmídeo pALB04; Tc ^R , Gm ^R	Este trabalho
ALB01::pcmaX_lacZ	PA14::pcmaX_lacZ, carregando o plasmídeo pJN105; Tc ^R , Gm ^R	Este trabalho
ALB04::pcmaX_lacZ	PA14::pcmaX_lacZ, carregando o plasmídeo pALB04; Tc ^R , Gm ^R	Este trabalho
ALB01::poprF1_lacZ	PA14::poprF1_lacZ, carregando o plasmídeo pJN105; Tc ^R , Gm ^R	Este trabalho
ALB04::poprF1_lacZ	PA14::poprF1_lacZ, carregando o plasmídeo pALB04; Tc ^R , Gm ^R	Este trabalho
ALB01::poprF2_lacZ	PA14::poprF2_lacZ, carregando o plasmídeo pJN105; Tc ^R , Gm ^R	Este trabalho
ALB04::poprF2_lacZ	PA14::poprF2_lacZ, carregando o plasmídeo pALB04; Tc ^R , Gm ^R	Este trabalho
ALB01::poprF3_lacZ	PA14::poprF3_lacZ, carregando o plasmídeo pJN105; Tc ^R , Gm ^R	Este trabalho
ALB04::poprF3_lacZ	PA14::poprF3_lacZ, carregando o plasmídeo pALB04; Tc ^R , Gm ^R	Este trabalho
ALB01::fabD_lacZ	PA14::pfabD_lacZ, carregando o plasmídeo pJN105; Tc ^R , Gm ^R	Este trabalho
ALB04::fabD_lacZ	PA14::pfabD_lacZ, carregando o plasmídeo pALB04; Tc ^R , Gm ^R	Este trabalho
ALB01::fabH3_lacZ	PA14::pfabH3_lacZ, carregando o plasmídeo pJN105; Tc ^R , Gm ^R	Este trabalho
ALB02::fabH3_lacZ	PA14::pfabH3_lacZ, carregando o plasmídeo pALB02; Tc ^R , Gm ^R	Este trabalho
ALB04::fabH3_lacZ	PA14::pfabH3_lacZ, carregando o plasmídeo pALB04; Tc ^R , Gm ^R	Este trabalho

Tabela 3. Plasmídeos utilizados neste trabalho.

Plasmídeos	Características	Referência
pGEM-T/ pGEM-T easy	Vetor de clonagem para produtos de PCR, Ap ^R	Promega
pJN105	Vetor de expressão contendo o promotor <i>araBAB</i> induzível por arabinose e o regulador <i>araC</i> , Gm ^R	(Newman e Fuqua, 1999)
pET43-a	Vetor de expressão de sequências peptídicas fusionadas com a proteína de 491 aminoácidos Nus.Tag™. Adiciona cauda de poli-histidina nas posições N- ou C-terminal do produto do gene clonado	EMD Biosciences
Mini-CTX2	Vetor de integração auto proficiente derivado do mini-CTX1, Tc ^R	(Hoang <i>et al.</i> , 1998)
Mini-CTX_ <i>lacZ</i>	Vetor para construção de fusões de transcrição com <i>lacZ</i> integradas ao cromossomo, Tc ^R	(Hoang <i>et al.</i> , 1998)
pUC18-mini-Tn7T-Gm-LacZ20	Vetor derivado do mini-Tn7T para construção de proteínas de fusão com β -galactosidase, Gm ^R (segundo quadro de leitura)	(Choi e Schweizer, 2006)
pTNS3	Vetor suicida, expressando a transposase T7; usado como <i>helper</i> nas transformações com os vetores derivados do mini-Tn7T	(Choi <i>et al.</i> , 2005)
pNPTS138	Vetor suicida contendo <i>sacB</i> , Km ^R	Alley D.
<i>pvrS</i> _ CTX- <i>lacZ</i>	Região promotora de <i>pvrSR</i> no mini-CTX_ <i>lacZ</i> ; Tc ^R	Este trabalho
<i>rcsC</i> _ CTX- <i>lacZ</i>	Região promotora de <i>rcsCB</i> no mini-CTX_ <i>lacZ</i> ; Tc ^R	Este trabalho
<i>psigX</i> _ <i>lacZ</i>	Região promotora de <i>sigX</i> no mini-CTX_ <i>lacZ</i> ; Tc ^R	Este trabalho
<i>pcmaX</i> _ <i>lacZ</i>	Região promotora de <i>cmaX</i> no mini-CTX_ <i>lacZ</i> ; Tc ^R	Este trabalho
<i>poprF1</i> _ <i>lacZ</i>	Região regulatória de <i>oprF</i> , incluindo o promotor dependente de σ^x e o dependente de σ^{70} clonada no mini-CTX_ <i>lacZ</i>	Este trabalho
<i>poprF2</i> _ <i>lacZ</i>	Promotor de <i>oprF</i> dependente de σ^x clonado no mini-CTX_ <i>lacZ</i>	Este trabalho
<i>poprF3</i> _ <i>lacZ</i>	Promotor de <i>sigX</i> dependente de σ^{70} clonado no mini-CTX_ <i>lacZ</i>	Este trabalho
<i>pfabD</i> _ <i>lacZ</i>	Região promotora de <i>fabD</i> no mini-CTX_ <i>lacZ</i> ; Tc ^R	Este trabalho
<i>pfabH3</i> _ <i>lacZ</i>	Região promotora de <i>fabH3</i> no mini-CTX_ <i>lacZ</i> ; Tc ^R	Este trabalho
pALB02	Região codificadora de PA14_21550 no pJN105; Gm ^R	Este trabalho
pALB03	Região codificadora de PA14_26600 no pJN105; Gm ^R	Este trabalho
pALB04	Região codificadora de <i>sigX</i> no pJN105; Gm ^R	Este trabalho
pALB05	Região codificadora de PA14_28970 no pJN105; Gm ^R	Este trabalho
pALB06	Região codificadora de PA14_46810 no pJN105; Gm ^R	Este trabalho
pALB07	Região codificadora de PA14_55550 no pJN105; Gm ^R	Este trabalho
pALB09	Região codificadora de <i>sigX</i> sob controle do promotor <i>araBAD</i> e do regulador <i>araC</i> , extraída de pALB04 e ligada no CTX2; Tc ^R	Este trabalho

Tabela 4. Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

Nome	Sequência ^a	Utilização	Hibridização
21550_ <i>EcoRI</i> 21550_ <i>SpeI</i>	GAATTC GATCGGTAGCGTGATCC ACTAGT GTCAGTTGCCCATCGAG	Amplificação da região codificadora de PA14_21550 para superexpressão	55°C
28970_ <i>EcoRI</i> 28970_ <i>PstI</i>	GAATTC CCGCTTCGGGCGTAAATAG CTGCAG TCCAGCACCTCGATCTCC	Amplificação da região codificadora de PA14_28970 para superexpressão	55°C
26600_ <i>EcoRI</i> 26600_ <i>PstI</i>	GAATTC TCGGTTCGCCTTTGACAC CTGCAG CTCGCGGAATGCTTCTGT	Amplificação da região codificadora de PA14_26600 para superexpressão	55°C
41575_ <i>EcoRI</i> 41575_ <i>PstI</i>	GAATTC GCCCGGCTTACGATATGA CTGCAG CATGTTGCGAACGCTGTC	Amplificação da região codificadora de <i>sigX</i> para superexpressão	55°C
46810_ <i>EcoRI</i> 46810_ <i>SpeI</i>	GAATTC CAGCCATTGAGGGAGCAC ACTAGT GGTGGGTTGCTACATGCT	Amplificação da região codificadora de PA14_46810 para superexpressão	55°C
55550_ <i>EcoRI</i> 55550_ <i>PstI</i>	GAATTC CATCCTGTTGCTGCCGAAG CTGCAG AATGGCTCATGGGATGGA	Amplificação da região codificadora de PA14_55550 para superexpressão	55°C
<i>pvrS</i> _FT_ <i>XhoI</i> <i>pvrS</i> _FT_ <i>HindIII</i>	CTCGAG AGTCGACCATCCCGGTCT AAGCTT CTTCAACTTCATGCCGAAA	Fusão de transcrição da região promotora de <i>pvrSR</i> no Mini-CTX_ <i>lacZ</i>	60°C
<i>rcsC</i> _FT_ <i>XhoI</i> <i>rcsC</i> _FT_ <i>HindIII</i>	CTCGAG GTTCGACGCTACCGGTCTG AAGCTT AGCAGACTTCACGGGATG	Fusão de transcrição da região promotora de <i>rcsCB</i> no Mini-CTX_ <i>lacZ</i>	60°C
<i>psigX</i> _Ftran_ <i>HindIII</i> <i>psigX</i> _Ftran_ <i>Bam</i>	AAGCTT CTGGTGAACAGCGTCGTG GGATCC CTGTGACAGGGGGTGAGG	Fusão de transcrição da região promotora de <i>sigX</i> no Mini-CTX_ <i>lacZ</i>	60°C
p41630_ Ftran_ <i>XhoI</i> p41630_ Ftran_ <i>Hin</i>	CTCGAG TCGAACCCATGTTTCAGCA AAGCTT ACCCGACTCGTACGCTTG	Fusão de transcrição da região promotora de <i>cmx</i> no Mini-CTX_ <i>lacZ</i>	60°C
<i>poprF1</i> _ <i>Hin</i> <i>poprF1</i> _ <i>Bam</i>	AAGCTT GAGGGCAAGTCGAAGTTCA GGATCC AGCCGATGACAACGCCTA	Fusão de transcrição da região promotora completa de <i>oprF</i> no Mini-CTX_ <i>lacZ</i>	60°C
<i>poprF2</i> _ <i>Hin</i> <i>poprF2</i> _ <i>Bam</i>	AAGCTT ATGCGGGAAGTTCTGATA GGATCC AGTAGTACTTCAGACCAG	Fusão de transcrição da região promotora de <i>oprF</i> dependente de σ^x no Mini-CTX_ <i>lacZ</i>	60°C
<i>poprF1</i> _ <i>Hin</i> <i>poprF3</i> _ <i>Bam</i>	AAGCTT GAGGGCAAGTCGAAGTTCA GGATCC TTGGGTGGCAAGTTTATCAG	Fusão de transcrição da região promotora de <i>oprF</i> dependente de σ^{70} no Mini-CTX_ <i>lacZ</i>	60°C
<i>fabD</i> _Ft_ <i>Hin</i> <i>fabD</i> _Ft_ <i>Bam</i>	AAGCTT AAGACCCCTGCCGGTATC GGATCC GACGAATGCGAGGGATG	Fusão de transcrição da região promotora de <i>fabD</i> no Mini-CTX_ <i>lacZ</i>	60°C

Nome	Sequência ^a	Utilização	Hibridização
<i>fabHb_Ft_Hin</i> <i>fabHb_Ft_Bam</i>	AAGCTT GGGGCTGCTTCCTTGTGAA GGATCC GTACTGGCGCACGAAGGT	Fusão de transcrição da região promotora de <i>fabH3</i> no Mini-CTX_ <i>lacZ</i>	60°C
<i>sigX_Bam</i> <i>sigX_Eco</i>	GGATCC GCCCGGCTTACGATATGA GAATTC AGCCGATGACAACGCCTA	Amplificação da região codificadora de <i>sigX</i> para expressão em <i>E. coli</i> a partir do pET43-a	60°C
<i>nadB up</i> <i>nadB low</i>	CTACCTGGACATCAGCCACA GGTAATGTCGATGCCGAAGT	Normalizador no qRT-PCR	60°C
<i>sigX_qRT_L</i> <i>sigX_qRT_R</i>	CCAGGAGGTGATGCTGAAAAG CTGAGCGCATCCATCAATC	qRT-PCR de <i>sigX</i>	60°C
<i>oprF_qRT_L</i> <i>oprF_qRT_R</i>	ACAGCGTTCGCAACATGA TAGGTGCCACGAACGTCA	qRT-PCR de <i>oprF</i>	60°C
qRT_21550_L qRT_21550_R	TCATCGGCAGATCGCATA ATGGTCAGCAGCCAGGTC	qRT-PCR de PA14_21550	60°C
qRT_ <i>fabHb</i> _L qRT_ <i>fabHb</i> _R	CCAACAACATCCGCAACA GACCATCGGGCAGACATC	qRT-PCR de PA14_25540 (<i>fabH3</i>)	60°C
qRT_ <i>fabD</i> _L qRT_ <i>fabD</i> _R	CGTAGGGGCCAACTGATG CACAGGCCGCCAATACAT	qRT-PCR de <i>fabD</i>	60°C
qRT_ <i>fabG</i> _L qRT_ <i>fabG</i> _R	CGTTTCCAGCGACGAATC GATGCCGGCGTTATTGAC	qRT-PCR de <i>fabG</i>	60°C
qRT_ <i>acc</i> _L qRT_ <i>acc</i> _R	CCTTCCATCATGCGTTCC ACGGTACAGCACGGCTTC	qRT-PCR de <i>accD</i>	60°C

¹Os sítios de restrição incorporados nos produtos de PCR estão destacados em negrito.

3.1.1. Obtenção das linhagens repórteres para ensaios de β -galactosidase

As regiões promotoras de *pvrSR*, *rcsCB*, *sigX*, *cmaX-crfX-cmpX*, *oprF*, *fabD* e *fabH3* foram amplificadas por PCR a partir de DNA genômico extraído de *P. aeruginosa* PA14, utilizando o High Fidelity PCR Enzyme Mix (Fermentas) com oligonucleotídeos iniciadores capazes de se parear com as regiões em questão e contendo sítios de restrição adequados à posterior ligação do fragmento ao vetor correspondente. Após ser purificado com o HiYield Gel/PCR DNA extraction kit (Real Genomics), o produto de PCR foi ligado ao pGEM-T (Promega), segundo protocolo do fabricante, e a ligação foi inserida por eletroporação em células de *E. coli* DH5- α , de onde o plasmídeo foi posteriormente extraído e conferido por sequenciamento. Os insertos corretos foram retirados do vetor de clonagem, pela ação de enzimas de restrição e ligados no Mini-CTX_ *lacZ*, para a construção das fusões de transcrição. O produto dessas ligações foi analisado em *E. coli* e transferido para células de *P.*

aeruginosa PA14 e/ou para as linhagens de superexpressão de fator sigma ECF por conjugação, gerando as linhagens repórteres descritas na tabela 2.

Para essas conjugações, culturas de *E. coli* S17-1 carregando as devidas construções crescidas em LB sólido com tetraciclina (12,5 µg/ mL) foram plaqueadas em LB junto com a *P. aeruginosa* receptora, as quais após cerca de 8-16 horas foram plaqueadas em LB com tetraciclina (100 µg/ mL) e ácido nalidíxico (20 µg/ mL) para selecionar somente colônias de *P. aeruginosa* que tenha recebido o plasmídeo contendo a construção repórter.

3.1.2. Construção dos plasmídeos para a superexpressão dos fatores sigma ECF selecionados.

Foram desenhados oligonucleotídeos que se pareiam com as extremidades das regiões codificadoras de PA14_21550, PA14_26600, PA14_28970, *sigX*, PA14_46810 e PA14_55550 contendo sítios de restrição compatíveis com os encontrados no pJN105 (tabela 3), um vetor contendo um promotor induzível por arabinose usado aqui para superexpressar os fatores sigma de forma controlada. As linhagens contendo essas construções foram obtidas por eletroporação, segundo protocolo de Choi e colaboradores (Choi *et al.*, 2006) e estão listadas na tabela 2.

3.2. Técnicas Básicas de Biologia Molecular

Isolamento de DNA plasmidial, digestão, reações de polimerase em cadeia (PCRs), ligações, transformação e outras técnicas básicas de biologia molecular foram realizadas de acordo com metodologia padrão descrita em manuais de referência (Ausubel *et al.*, 1996; Sambrook *et al.*, 1989). DNA genômico de *P. aeruginosa* foi isolado pela técnica de Chen e Kuo (Chen e Kuo, 1993). Isolamento de RNA total foi realizado com o reagente Trizol (Invitrogen), segundo as indicações do fabricante, acrescentando um passo de incubação a

65°C por 10 minutos após a adição do reagente. Sequenciamento de DNA para a confirmação de amplicons e construções foi realizado após reação com o kit BigDye (Applied Biosystems), de acordo com protocolo do fabricante adaptado pela técnica Luci Deise Navarro e análise na plataforma de sequenciamento ABI Prism 3130XL Genetic Analyser (Hitachi), do Serviço de Sequenciamento de DNA do Instituto de Química da USP (SSDNA).

3.3. Curvas de crescimento e ensaios de viabilidade

Tanto para as curvas de crescimento quanto de sobrevivência, as culturas foram feitas a partir da diluição de uma cultura em fase estacionária até $DO_{600} = 0,1$ em 25 mL de LB adicionado de gentamicina e arabinose sob agitação de 240 rpm a 37°C. DO_{600} foi medida periodicamente utilizando um espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) e, para a curva de sobrevivência, uma diluição seriada foi plaqueada em LB ágar 1,5%. Após 16 horas de incubação a 37°C, as colônias foram contadas e o resultado foi analisado em gráfico como uma média de triplicatas biológicas.

As figuras de microscopia de fluorescência foram obtidas após lavagem das células de ALB01 e ALB04 duas vezes com $MgSO_4$ 10mM e incubação com LIVE/DEAD *BacLight* bacterial viability kit (Invitrogen), segundo protocolo do fabricante. Utilizou-se um microscópio invertido Nikon TE 300, contendo os filtros adequados. As imagens capturadas foram processadas utilizando-se os softwares Metamorph (Universal Imaging, Media, PA) e Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Para o ensaio de citometria de fluxo, as culturas de ALB01 e ALB04 foram induzidas a partir da 3ª hora de crescimento, com uma DO_{600} de, aproximadamente, 1,5. Para cada tempo do ensaio, 1 mL de cultura foi coletado, lavado duas vezes com $MgSO_4$ 10 mM e sua DO_{600} foi ajustada para 3,0. Essa amostra ajustada foi diluída 1:100 e utilizada no ensaio após incubação com 0,5 μ L da mistura de corantes do LIVE/DEAD *BacLight* bacterial viability kit (Invitrogen) para cada 1 mL da cultura diluída (1

x 10^5 células). As análises foram feitas no citômetro de fluxo Beckman Coulter FC500 MPL, da Central Analítica do Instituto de Química da USP.

3.4. Ensaio de início da formação de biofilme

Os ensaios de biofilme foram realizados a partir de culturas inoculadas em 900 μ L de LB com antibiótico e com 0,2% de arabinose, no caso da indução, a uma $DO_{600}=0,01$, que foram incubadas a 30°C, por cerca de 18 horas, em tubos de vidro de 15 mL. Ao final desse tempo de incubação, foi verificada a absorvância da cultura planctônica a 600 nm, após o que essas culturas foram descartadas, os tubos foram lavados com água corrente para a retirada das células não aderidas e incubados com 1 mL de cristal violeta 1% por 3 minutos. Para a retirada do excesso de corante, os tubos foram lavados vigorosamente com água morna e, após serem secos na bancada, foram fotografados e, em seguida foi adicionado 1 mL de DMSO para solubilizar a camada corada e aderida de células e essa solução teve a absorvância medida a 590 nm. O valor de absorvância a 590 nm, referente à quantidade de células aderidas, iniciando o biofilme, foi normalizado dividindo-o pela absorvância a 600 nm, referente à abundância de células na cultura.

3.5. Análise do perfil de lipopolissacarídeo (LPS)

Células de ALB01 e ALB04 foram cultivadas em 20 mL de meio LB líquido com gentamicina a partir da $DO_{600}=0,1$ e alíquotas foram retiradas após 2, 6 e 16 horas. O volume das alíquotas foi ajustado de forma que se obtivesse $DO_{600}=3,0$ na suspensão com 1 mL de N-lauril-sarcosina 1% no primeiro passo, após a centrifugação por 3 minutos a 12000 g em temperatura ambiente e o descarte do sobrenadante. Essa suspensão foi incubada por 1 hora a 37°C, centrifugada por 10 minutos a 12000 g em temperatura ambiente e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Ao precipitado foi adicionada novamente a solução de N-

lauril-sarcosina 1% e os passos subsequentes foram repetidos até juntar o novo sobrenadante com o reservado, onde foram adicionados 4 volumes de etanol 100%. Essa mistura foi incubada a 4°C por cerca de 16 horas. As amostras foram então centrifugadas a 4°C por 15 minutos a 8000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi dissolvido em 1 mL de água. Esse material foi centrifugado a 300000 g por 1 hora a 4°C, utilizando uma ultracentrífuga TLX Optima e tubos de 3,2 mL no rotor TL110. O sobrenadante foi descartado e o precipitado novamente dissolvido em 1 mL de água. A ultracentrifugação foi repetida e o pellet dissolvido em 500 µL de água, onde foi adicionado 0,1 mg/mL de RNase, 20 ku de DNase, 4mM de MgCl₂ 4 mM de CaCl₂. Após 24 horas de incubação a 37°C, às amostras foram adicionados 0,1 mg/mL de protease e 0,1 mg/mL de proteinase K. Após outras 24 horas de incubação, dessa vez a 56°C, procedeu-se nova ultracentrifugação a 300000 g por 1 hora a 4°C, o descarte do sobrenadante e a dissolução do precipitado em 1 mL de água. A centrifugação foi repetida e ao precipitado final foram acrescentados 100 µL de água e 100 µL do tampão de amostra 2x (100 mM de Tris-HCl pH=6,8; 4% de SDS; 20% de glicerol; azul de bromofenol).

As amostras foram analisadas por eletroforese em um gel de gradiente de concentração de 8 a 18% de poliacrilamida, como descrito por Laemmli (Laemmli, 1970), porém sem a adição de SDS no gel de separação. O LPS foi corado por impregnação por prata, utilizando-se o kit BioRad Silver Stain, segundo protocolo do fabricante.

3.6. Análise da expressão gênica

3.6.1. RT-PCR quantitativo

O RNA total das células crescidas conforme indicado em cada experimento foi extraído, tratado com DNase I (Thermo Scientific) e utilizado como molde para a síntese de

cDNA com a transcriptase reversa Superscript III (Invitrogen) e oligonucleotídeos randômicos. O cDNA foi então amplificado com os oligonucleotídeos específicos indicados na tabela 4 com o Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific) em triplicatas técnicas no 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems), utilizando o seguinte programa: 60°C por 2 minutos; 95°C por 10 minutos; 40 ciclos de 95°C por 15 segundos; 60 °C 1 minuto. As taxas de expressão foram calculadas de acordo com o método de $-2^{\Delta\Delta C_t}$ (Livak e Schmittgen, 2001). O gene *nadB* foi utilizado como normalizador.

Para o cálculo $\Delta\Delta C_T$ ser válido, as eficiências de amplificação dos genes alvo e do normalizador devem ser aproximadamente iguais. Isso foi verificado para todos os genes testados, observando-se como o ΔC_T variava conforme a diluição do cDNA molde e construindo um gráfico do ΔC_T (C_T do gene alvo – C_T do gene normalizador) contra o logaritmo em base 10 da diluição do cDNA, cuja inclinação da reta deve ser próxima de 0, segundo (Livak e Schmittgen, 2001).

3.6.2. Ensaios de atividade de β -galactosidase

As linhagens repórteres foram crescidas de maneira indicada para cada experimento e os ensaios foram realizados segundo Miller (Miller, 1972) com algumas modificações. Periodicamente, a DO_{600} foi medida e 100 μ L da cultura foram coletados, aos quais foram adicionados 800 μ L de tampão Z (Na_2HPO_4 40 mM, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 60 mM, KCl 10 mM, $MgSO_4$ 10 mM, β -mercaptoetanol 37 mM), 50 μ L de SDS 10% e 50 μ L de clorofórmio. Essas amostras foram agitadas em vortex durante 10 segundos e incubadas 5 minutos a temperatura ambiente, seguindo-se a adição de 200 μ L de ONPG 4 mg/mL. As amostras foram novamente incubadas em temperatura ambiente pelo tempo necessário para o aparecimento de uma coloração amarelada, após o que a reação foi interrompida com a adição

de 400 μL de Na_2CO_3 1M. Os tubos foram centrifugados por 3 minutos a 12000 rpm em temperatura ambiente e a fase aquosa teve sua absorvância a 420 nm medida. A atividade de β -galactosidase, em unidades Miller, foi obtida de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Unidades Miller} = \frac{\text{DO}_{420 \text{ nm}} \times 1000}{\text{DO}_{600 \text{ nm}} \times \text{vol. inicial de cultura (mL)} \times \text{tempo (min)}}$$

3.7. Obtenção do anticorpo policlonal anti-SigX e ensaios de *immunobloting*

A região codificadora de *sigX* foi clonada sob o comando de um promotor induzível por IPTG no plasmídeo pET43-a (EMD Biosciences). Essa construção foi inserida em *E. coli* DH5 α , que teve σ^x superexpresso em culturas crescendo em 100 mL de LB a 30°C sob agitação de 200 rpm por 6 horas após a adição de 0,6 mM de IPTG. Após essa incubação, as culturas foram centrifugadas e as células suspensas em 10 mL de tampão de lise (20 mM de fosfato de sódio pH 7.4; 500 mM de NaCl; 20 mM de imidazol; 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF)). As suspensões celulares foram submetidas a quatro ciclos de 30 segundos de sonicação em banho de gelo. Nus-His- σ^x foi purificada usando uma coluna Ni-NTA (Invitrogen) e a fração eluída com 300 mM de imidazol foi digerida com 0,02 U/mg de enteroquinase (Sigma) adicionada de 2mM de CaCl_2 e 1% de Tween 20, durante 16 horas a 37°C. As bandas correspondendo a His- σ^x (30,7 KDa) e Nus foram separadas por SDS-PAGE e a banda de His- σ^x foi cortada do gel preparativo 15%, macerada em um homogeneizador, adicionada de um volume igual de adjuvante de Freund completo (Sigma) e inoculada em uma coelha de um mês e meio de idade. O segundo inóculo foi feito 24 dias após o primeiro e a sangria para a obtenção do soro policlonal usado nos *immunoblottings* foi realizada 22 dias após o segundo inóculo. Foram feitos ensaios de *immunobloting* em cada etapa de

imunização, que permitem assegurar o reconhecimento com sucesso da banda de interesse (30,7 KDa) pelo soro obtido, porém reconhecendo também bandas inespecíficas de tamanho maior que σ^x , não interferindo nos resultados de ensaios subsequentes. O protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética em Cuidados e Uso Animal (CECUA) do IQ-USP.

Para os ensaios de *immunoblotting*, células de ALB01 e ALB04 foram crescidas em LB com gentamicina e arabinose, quando indicado. Periodicamente, 1 mL de cada cultura foi centrifugado (13000 g, 2 minutos), suspenso em tampão de amostra para SDS-PAGE em um volume normalizado pela DO_{600} , fervido por 5 minutos e centrifugado novamente por 5 minutos. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE em um gel 15% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando metodologia padrão. Quantidades iguais de proteína foram confirmadas pela coloração com Coomassie de géis idênticos corridos em paralelo com os géis submetidos à transferência. As membranas foram incubadas com o soro policlonal α - σ^x na proporção de 1:1000 (v/v) em TBS-leite 5% por aproximadamente 16 horas. A detecção secundária foi feita com o anticorpo Anti-Rabbit IgG Alkaline Phosphatase Conjugate (Sigma) na concentração de 1:30000 em TBS-T e a membrana foi revelada segundo método padrão.

3.8. Análise proteômica

Duas análises independentes foram realizadas, como se segue. Na primeira, três culturas distintas de ALB01 e ALB04 foram induzidas com 0,2% de arabinose na terceira hora de crescimento ($DO_{600}=1.3 - 1.5$) e tiveram suas proteínas totais extraídas após 3 horas de indução. Uma segunda análise, com culturas induzidas com arabinose após 1,5 hora de crescimento ($DO_{600} = 0.34 - 0.4$) e proteínas extraídas após 3 e 28 horas de indução foi realizada. Em ambos os casos, a indução tardia com arabinose foi escolhida para minimizar a diferença drástica de crescimento entre ALB01 e ALB04. Nas duas análises, após o tempo de

indução já citado, as células foram centrifugadas, (13000 *g* por 2 minutos) e lavadas sequencialmente em Tris-HCl 100 mM e Tris-HCl 10 mM, ambas as soluções com pH 8.0. As células foram então suspensas em tampão de lise (tabela 5) e quebradas por ultrassom em quatro ciclos de 15 segundos. A concentração proteica foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) e 350 µg de proteína na solução de reidratação (tabela 3) em um volume final de 350 µL foram incubados com fitas de 18 cm pH 3-10 não linear (GE) durante 16 horas em temperatura ambiente. As fitas impregnadas com a solução proteica foram submetidas à focalização isoeétrica no IPGphor III (GE Healthcare). Proteínas separadas pelo ponto isoeétrico foram posteriormente separadas em géis de poliacrilamida 12% a 10W por 17 horas. Os géis foram fixados em etanol e ácido acético, corados com uma solução de azul brilhante de Coomassie coloidal e descorados com água antes de serem digitalizados no ImageScanner III (GE Healthcare). O tratamento estatístico dos *spots* usando teste *t* ($p < 0,05$) foi realizado com a ajuda do *software* Delta 2D (Decodon), considerando uma média de volumes normalizados $< 0,7$ ou $> 1,3$. A caracterização por massa das proteínas extraídas do gel e digeridas com tripsina foi feita por HPLC-MS/MS no Institut Armand-Frappier, Laval, Canadá, ou no Laboratório de Espectrometria de Massas no Laboratório Nacional de Biociências, CNPEM-ABTLuS, em Campinas - SP.

As sequências de peptídeos obtidas foram submetidas a alinhamento contra o genoma de *P. aeruginosa* PA14 com a ferramenta BLAST do site www.pseudomonas.com (Winsor *et al.*, 2011).

Tabela 5. Soluções usadas para o preparo das amostras e corrida da eletroforese bidimensional

Solução	Composição
Solução de lise	Ureia 8M, tioureia 2M, CHAPS 2%, DTT 40 mM, inibidor de protease Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail tablets (Roche) - 1 tablete/10mL de solução
Solução de reidratação	Ureia 8M, tioureia 2M, CHAPS 2%, DTT 40 mM, inibidor de protease Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail tablets (Roche) - 1 tablete/10mL de solução, Pharmalyte 2%, glicerol 10%, uma pitada de azul de bromofenol
Fixador	Etanol 40%, ácido acético 10% em água
Corante Coomassie coloidal	Azul brilhante de Coomassie 0,08%, H ₃ HPO ₄ 1,6 %, (NH ₄) ₂ SO ₄ 600 mM, metanol 20%

3.9. Análise da composição de ácidos graxos totais de ALB01 e ALB04

Culturas de ALB01 e ALB04 crescendo com arabinose durante 4 horas foram lavadas duas vezes com MgSO₄ 10 mM e liofilizadas. A composição de ácidos graxos das células inteiras foi determinada pela análise dos metil ésteres de ácidos graxos (FAME, de *fatty acid methyl ester*), que foram extraídos com metanol e ácido sulfúrico a 100°C durante uma hora. FAMES foram então injetados (1 µL) em uma coluna 30m DB-5 conectada a um espectrômetro de massa. Foi usado naftaleno (tempo de retenção RT=7,84 min) como controle interno para quantificar os vários congêneres. A extração dos FAMES e análise no GC-MS foram feitas no serviço do INRS-Institut Armand-Frappier, em Laval, Canadá, tendo a colaboração do Dr. François Lépine para o desenho do experimento e a interpretação dos resultados.

3.10. Análise de anisotropia

Os ensaios de anisotropia foram realizados pelo doutorando Gilberto H. Kaihama, orientado pela Professora Regina Baldini, em colaboração com o Professor Mário José Politi,

como descrito (Badaoui Najjar *et al.*, 2007). Brevemente, culturas de ALB01 e ALB04 crescidas nas mesmas condições que para a análise da composição de ácidos graxos foram centrifugadas e lavadas por duas vezes em uma solução de MgSO₄ 10mM estéril e em seguida, suspensas a uma DO_{600nm} = 0,4 na mesma solução. DPH (1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno) foi adicionado a uma concentração final de 4 x 10⁻⁶ M à suspensão bacteriana e os tubos foram incubados por 30 minutos à 37°C. Após esse período, a anisotropia da membrana foi determinada.

A luz de excitação foi ajustada para 365 nm e as intensidades de fluorescência foram medidas a 425 nm paralelamente (IVV) e perpendicularmente (IVH) à luz de excitação. A anisotropia (r) foi calculada utilizando-se as intensidades antes (I⁰VV e I⁰VH) e após (I'VV e I'VH) a adição de DPH de acordo com a seguinte equação (Shinitzky e Barenholz, 1978):

$$r = \frac{(I'vv - I^0vv) - G(I'vh - I^0vh)}{(I'vv - I^0vv) - 2G(I'vh - I^0vh)}$$

O fator de correção G é a razão da intensidade de fluorescência vertical para horizontal quando a luz de excitação é polarizada na posição horizontal (Litman e Barenholz, 1982). Um alto grau de anisotropia de fluorescência implica em um maior grau de ordem da bicamada lipídica (menor fluidez).

4. Resultados e discussão

4.1. Caracterização das linhagens com superexpressão dos fatores sigma ECF em *P. aeruginosa* PA14

Para investigar o desenvolvimento das culturas superexpressando cada um dos fatores sigma ECF escolhidos, curvas de crescimento com as linhagens ALB01 a ALB07 foram feitas com ou sem adição de arabinose, em triplicatas biológicas.

Como pode ser visto na figura 2, somente a superexpressão de σ^x leva a alterações no crescimento, o que será mostrado e discutido em mais detalhes nas seções seguintes, enquanto as células em que os outros fatores sigma foram superexpressos pela adição de arabinose crescem de forma semelhante aos controles, ao longo da curva. A simples adição de arabinose ao meio não influencia o crescimento da bactéria, como pode ser observado nas curvas controle com ALB01.

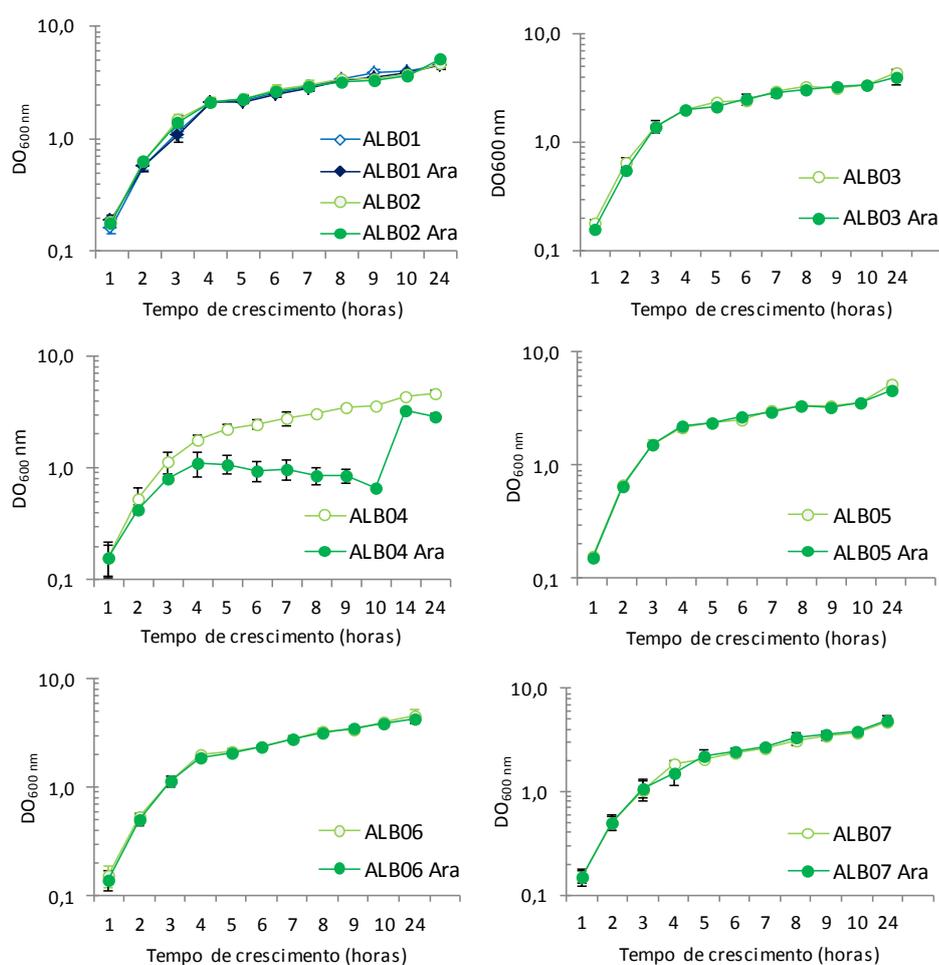


Figura 2. Curvas de crescimento de PA14 superexpressando os fatores sigma 21550 (ALB02), 26600 (ALB03), σ^x (ALB04), 28970 (ALB05), 46810 (ALB06) e 55550 (ALB07). As culturas controle estão representadas por símbolos abertos e as culturas adicionadas de 0,2% de arabinose, por símbolos cheios. As curvas de PA14 carregando pJN105 (ALB01, controle do vetor) estão mostradas em azul no primeiro gráfico. Esses experimentos foram feitos em triplicatas biológicas, com as barras de erro representando o desvio padrão mostradas em cada gráfico.

Além da curva de crescimento, o perfil de lipopolissacarídeo (LPS) foi verificado para cada linhagem superexpressando os fatores sigma ECF (não mostrado) e, novamente, somente a bactéria superexpressando σ^x mostrou-se com esse perfil alterado. Todos os resultados referentes à linhagem ALB04 superexpressando σ^x serão discutidos em seções dedicadas somente aos efeitos desse fator sigma ECF.

Com relação a outras características, somente a superexpressão de PA14₅₅₅₅₀ (ALB07) revelou uma diferença marcante na coloração da cultura, quando comparada ao

controle (figura 3). Quando a superexpressão desse sigma ECF é induzida, apesar de apresentar crescimento normal (figura 2), a cultura não adquire a coloração verde na DO₆₀₀ próximo a 2,0, observada ao longo da curva para as demais linhagens. Mesmo após 24 horas, a cor verde brilhante não é observada, permanecendo um tom mais amarelado (não mostrado). Essa coloração verde azulada de *P. aeruginosa* em meio LB é atribuída à produção de piocianina, um pigmento azul envolvido com estresse oxidativo no hospedeiro (Muller, 2002) e cuja provável função na fisiologia de *P. aeruginosa* é de possibilitar a reoxidação do NADH em condições de anaerobiose (Hernandez e Newman, 2001). Como já foi mencionado, uma linhagem de PAO1 superexpressando o ortólogo de PA14_55550 mostrou-se mais virulenta em *zebrafish* que a linhagem selvagem (Llamas *et al.*, 2009).

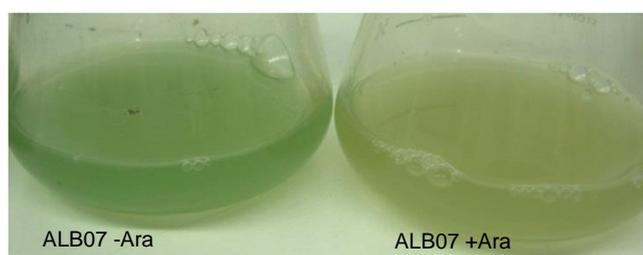


Figura 3. A superexpressão de PA14_55550 altera a produção de piocianina. Culturas de ALB07 sem e com arabinose, 7 horas após o inóculo, com DO₆₀₀ de aproximadamente 2,5.

A capacidade de formar biofilmes também foi verificada nessas linhagens superexpressando os fatores sigma escolhidos. Como pode ser visto na figura 4A, tanto a superexpressão de PA14_26600 (ALB03), quanto a de PA14_46810 (ALB06) levam a um discreto aumento na iniciação da formação do biofilme, porém a superexpressão das outras ORFs não levam a uma alteração nesse fenótipo. Apesar da barra de erros nas colunas referentes a ALB03 aproximarem a superexpressão do controle, a simples visualização dos tubos em que o experimento foi feito mostra essa tendência de aumento na iniciação do biofilme (figura 4B).

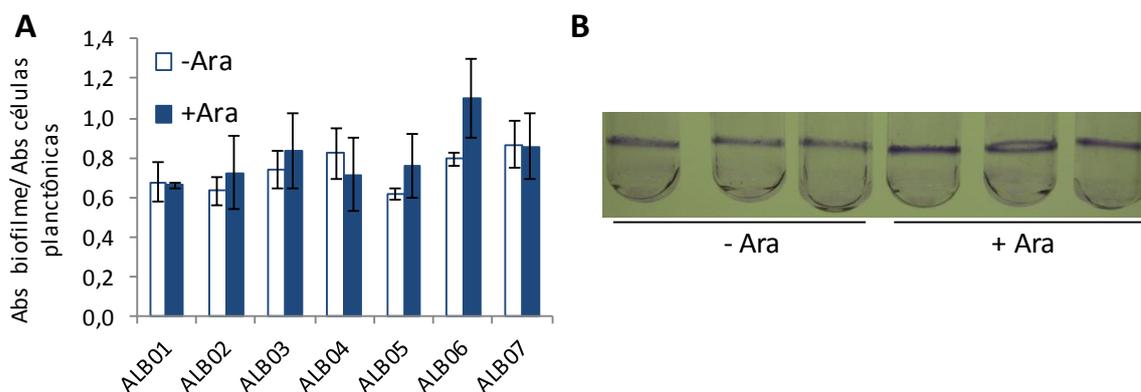


Figura 4. Ensaio de início de formação de biofilme com PA14 superexpressando os fatores sigma ECF. A. Gráfico representativo de três ensaios independentes com a superexpressão de cada um dos seis sigmas escolhidos e a linhagem controle. As colunas referem-se às médias dos valores da DO_{590nm} normalizados de cada uma das três replicatas técnicas, mostrando o desvio padrão referente a esses valores. **B.** Anéis de biofilme da linhagem ALB03 corados com cristal violeta, sem e com arabinose. Os tubos mostrados tratam-se de triplicatas técnicas.

4.2. Efeito das superexpressões dos fatores sigma ECF nos promotores de *pvrSR* e *rscCB*

Com o objetivo de verificar se os operons codificando os sistemas de dois componentes PvrSR e RcsCB seriam regulados pelos sigmas ECF, a atividade de seus promotores em fusão com *lacZ* em células superexpressando cada um dos fatores sigma escolhidos para estudo foi verificada através de atividade da enzima β -galactosidase. Analisando a figura 5, observa-se que a expressão de *pvrSR* e *rscCB* não é alterada na superexpressão de nenhum dos fatores sigma ECF testados na fase exponencial do crescimento da cultura. Em contrapartida, σ^x diminuiu levemente a atividade do promotor de *rscCB* testado no início da fase estacionária, porém esse efeito pode ser indireto, por consequência da competição de σ^x com σ^{70} pela RNA polimerase. A superexpressão de PA14_26600 (ALB03) também pareceu diminuir a atividade desse promotor em fase estacionária. Portanto, nenhum dos fatores sigma testados é responsável por iniciar a transcrição desses sistemas de dois componentes, para assim disparar uma cascata de regulação.

Esses ensaios também permitiram observar que os operons não são regulados em conjunto, pois *pvrSR* apresenta transcrição maior na fase exponencial de crescimento, enquanto o promotor de *rscCB* é mais expresso na fase estacionária.

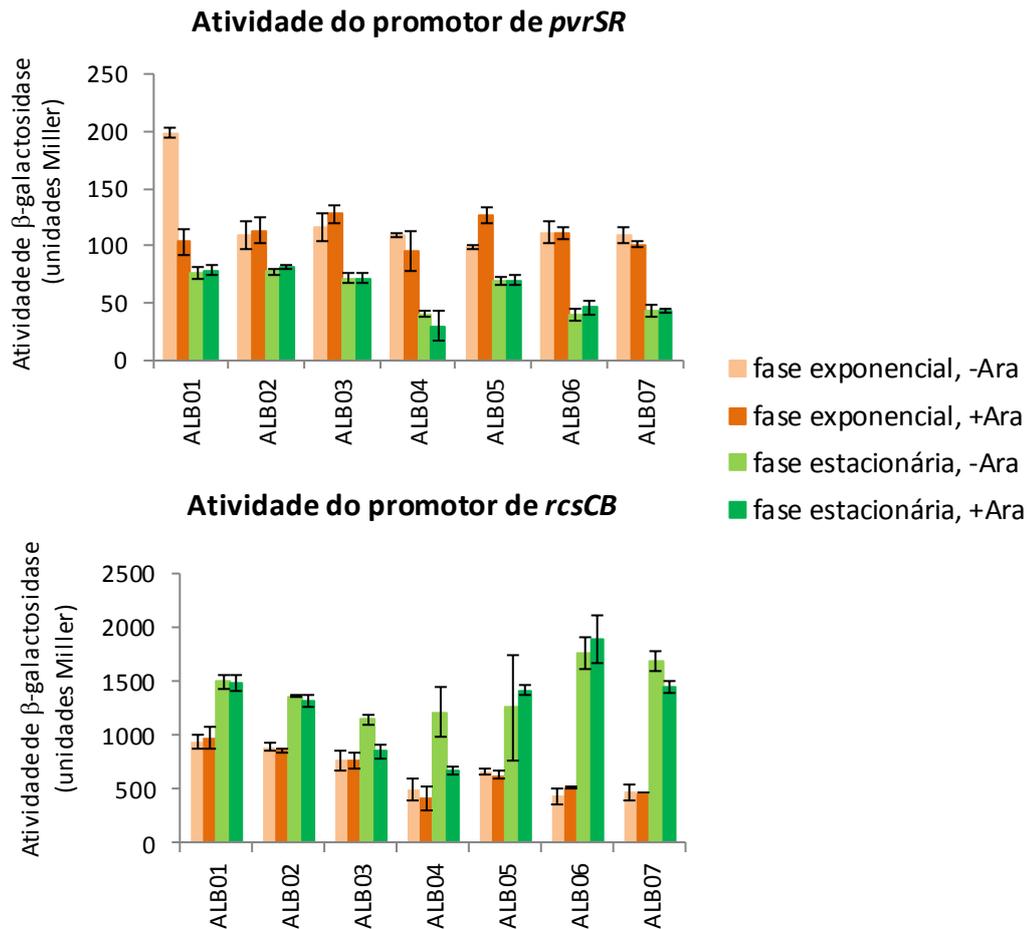


Figura 5. Ensaio de atividade dos promotores de *pvrSR* e *rscCB* em células superexpressando os fatores sigma ECF escolhidos. As colunas referem-se às médias dos valores de unidades Miller obtidos para cada uma de três replicatas biológicas, mostrando o desvio padrão referente a esses valores.

4.3. Efeito da superexpressão de σ^x na sobrevivência e morfologia das células de *P. aeruginosa* PA14

P. aeruginosa PA14 superexpressando σ^x (ALB04 na presença de arabinose) apresenta uma curva de crescimento bifásica, na qual a fase estacionária ocorre precocemente

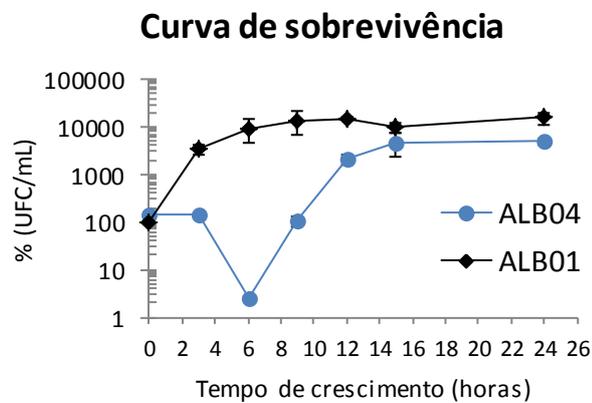
em relação ao controle (figura 2). Essa fase estacionária precoce, que dura cerca de seis horas a 37°C, é seguida por um segundo estirão, alcançando uma segunda fase estacionária, como pode ser visto na figura 2. A recuperação do crescimento não é devido a uma mutação supressora e não parece resultar de uma expressão diferencial de σ^x na população celular, onde somente os indivíduos com expressão mais baixa sobreviveriam e seriam responsáveis pela retomada de crescimento da cultura, uma vez que uma amostra da cultura na fase estacionária tardia diluída em meio novo repete o perfil bifásico da curva de crescimento (não mostrado). Como pode ser visto na figura 6A, a curva de sobrevivência acompanha o perfil observado na figura 2 para a curva de crescimento, mostrando a recuperação da viabilidade das células a partir da 6ª hora de incubação com arabinose (figura 6A). Essa retomada de viabilidade só é detectada em termos de densidade ótica a partir da 10ª hora (figura 2).

A morfologia das células também é alterada com a superexpressão de σ^x ao longo da curva de crescimento. Durante a fase estacionária precoce de ALB04 com arabinose, uma grande parcela da população é composta por células com tamanho aumentado em relação ao controle (figura 6B). Essa alteração morfológica, que consiste em células maiores tanto no comprimento quanto na largura, pode ser observada a partir da terceira ou quarta hora de cultivo, sendo a diferença mais drástica observada a partir da sexta hora (figura 6B), que corresponde ao início da fase estacionária dos controles. Curiosamente, culturas de ALB04 após a retomada de crescimento e já na segunda fase estacionária (24h) apresentam uma predominância de células com tamanho normal.

A observação da morfologia por microscopia de contraste de fase foi acompanhada da visualização em microscópio de fluorescência de células previamente coradas com o kit “LIVE/DEAD *BacLight*” (Invitrogen), cujo sistema permite identificar células mortas, que fluorescem na região do vermelho, devido à entrada do corante iodeto de propídio pela membrana danificada. As células intactas fluorescem no verde devido à entrada somente do

corante Syto 9. Ainda na figura 6B, nota-se que a maior proporção de células mortas encontra-se entre aquelas de maior dimensão, presentes principalmente durante a fase estacionária precoce. Nesse mesmo tempo de crescimento, a maioria das células vivas também apresenta aspecto “inchado”. Nos tempos mais tardios da curva, observa-se uma típica predominância de células mortas nos controles, enquanto ALB04 revela uma prevalência de células intactas e de dimensões normais.

A



B

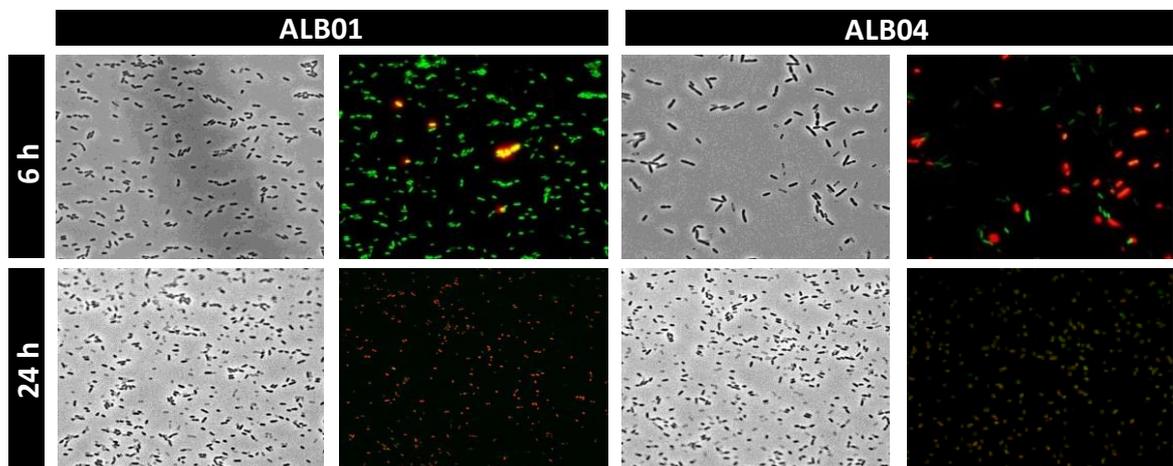


Figura 6. A sobrevivência e a morfologia das células são alteradas pela superexpressão de σ^x . **A.** Curva de sobrevivência feita com amostras retiradas nos tempos indicados, diluídas e semeadas em meio LB com gentamicina para contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). Os valores no gráfico são médias de triplicatas biológicas e as barras de erro correspondem ao desvio padrão. **B.** Microscopia de contraste de fase e de fluorescência de ALB01 e ALB04 com arabinose. Em ambos os painéis, a coluna da esquerda mostra as células em contraste de fase e a da direita, as células previamente coradas com o kit de viabilidade bacteriana LIVE/DEAD BacLight (Invitrogen) em microscópio de fluorescência, que permite identificar as células mortas, coradas em vermelho. As figuras estão na mesma escala e são representativas de triplicatas biológicas.

Na tentativa de minimizar os danos causados na célula pela superexpressão de σ^x durante a fase lag do crescimento, o promotor *ara* da construção para superexpressão desse fator sigma foi induzido com arabinose na terceira hora de crescimento ($DO_{600}=1,2$ a $1,5$) da cultura. Assim, a superexpressão se iniciou na fase exponencial de crescimento.

Nessas condições, o perfil bifásico da curva se repete, mas dessa vez a entrada na fase estacionária de ALB04 ocorre ao mesmo tempo e na mesma densidade celular que do controle (figura 7A). A queda na densidade celular na fase estacionária precoce de ALB04 com arabinose adicionada na terceira hora de crescimento é menor que a queda observada quando esse açúcar é adicionado no início da cultura. O perfil de sobrevivência obtido por análise de citometria de fluxo com culturas submetidas às mesmas condições (figura 7B) corrobora o perfil da curva de sobrevivência com células superexpressando σ^x desde o início da cultura (figura 6A): enquanto o número de células vivas na cultura controle diminui com o tempo, células superexpressando *sigX* retomam o crescimento após se manterem em fase estacionária por um período de cerca de 10-12 horas. Ainda na figura 7B, observa-se que a maior porcentagem de células mortas encontra-se na 16ª hora de indução (19ª hora de crescimento), na qual a diferença de crescimento entre as células superexpressando *sigX* e as células controle (figura 7A) corresponde à sexta hora de crescimento/indução dos ensaios realizados com arabinose adicionada no início da cultura (figuras 2 e 6 A).

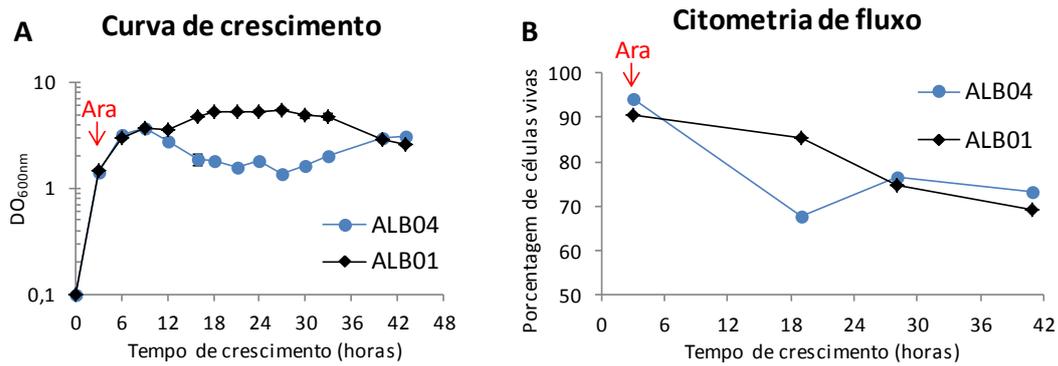


Figura 7. A superexpressão de *sigX* durante a fase exponencial do crescimento mantém o perfil bifásico da curva e o perfil de sobrevivência das células de *P. aeruginosa* PA14. A. Curva de crescimento de ALB01 e ALB04 com arabinose adicionada na terceira hora de crescimento. **B.** Análise da sobrevivência por citometria de fluxo de ALB01 e ALB04 nas mesmas condições da curva de crescimento após incubação por 5 minutos com o kit “LIVE/DEAD BacLight” (Invitrogen), conforme protocolo do fabricante. A seta vermelha indica adição de arabinose.

Esses dados são, de fato, resultado da superexpressão de σ^x e não um efeito geral de superexpressão de um fator sigma qualquer na célula, uma vez que, como mostrado na figura 2 e discutido na seção 4.1, a superexpressão de outros cinco fatores sigma ECF não resultou em qualquer alteração no crescimento ou morfologia celulares.

O fato da superexpressão de σ^x alterar o perfil de crescimento normal da bactéria pode levar a interpretações complexas, uma vez que um fator sigma pode regular outros genes reguladores, que terão um efeito final positivo ou negativo na expressão de genes *downstream*. A grande quantidade desse sigma alternativo na célula poderia ainda competir pela ligação ao cerne da RNA polimerase com o σ^{70} primário, responsável pela transcrição dos genes essenciais. A retomada do crescimento dessa cultura após 10 horas do inóculo levou ainda à hipótese da competição de σ^x com RpoS (ou σ^s), que é o fator sigma alternativo predominante na fase estacionária do crescimento e em diversas situações de estresse e que tem parte de seu regulon sobreposto ao do σ^{70} (revisado por Hengge-Aronis, 2002 e Battesti *et al.*, 2011). A hipótese seria que, nessa fase, RpoS estaria competindo com sucesso pelo cerne da RNA polimerase, deslocando o excesso de σ^x e fazendo com que os genes

necessários para manter a célula fossem transcritos eficientemente, tendo como consequência a retomada de crescimento da cultura.

4.4. Envolvimento dos sistemas de *quorum sensing* na curva bifásica de ALB04

Uma vez que é relatado para PAO1 que σ^x controla a transcrição de um dos promotores de *oprF* (Brinkman *et al.*, 1999; Nestorovich *et al.*, 2006; Bouffartigues *et al.*, 2012) e já foi demonstrado o envolvimento de OprF na regulação da rede de *quorum sensing* (Fito-Boncompte *et al.*, 2010), pode-se supor que a superexpressão de σ^x resultaria em excesso dessa porina nas células, o que poderia levar a um descontrole da produção dos sinais de *quorum sensing*. Assim, essa condição de excesso de OprF poderia mimetizar uma alta densidade populacional, fazendo com que as células diminuíssem precocemente sua taxa de crescimento. A retomada do crescimento, nesse caso, poderia acontecer devido à degradação do sinal. Então, na ausência dos sinais, não deveria ser observado o perfil bifásico da curva de crescimento. Para testar essa hipótese de modo rápido utilizando linhagens disponíveis no laboratório, os mutantes para as proteínas reguladoras de transcrição MvfR e RhlR, que atuam ligadas às moléculas sinais PQS e C4-AHL, respectivamente, foram transformados com pJN105 e pALB04. Como pode ser observado na figura 8, o perfil de crescimento desses mutantes superexpressando σ^x é semelhante ao observado para o *background* selvagem, podendo-se concluir que o efeito de σ^x na curva de crescimento não depende da presença de RhlR ou MvfR. Pode-se também descartar um efeito em LasR, pois como este regulador está interligado a RhlR e MvfR na cascata de regulação por *quorum sensing*, as linhagens mutantes utilizadas poderiam indicar um defeito também neste sistema, o que não foi observado.

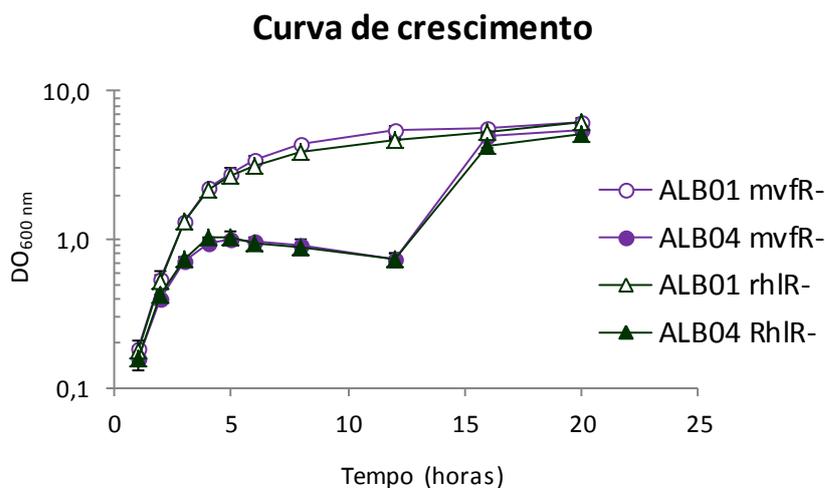


Figura 8. A recuperação do crescimento na curva bifásica da linhagem superexpressando *sigX* independe de *MvfR* ou *RhlR*. As linhagens PA14 *mvfR*⁻ e PA14 *rhIR*⁻ transformadas com pJN105 ou pALB04 foram cultivadas em LB com gentamicina e arabinose durante 20 horas, nas quais alíquotas foram retiradas periodicamente e tiveram a absorbância medida a 600 nm. Os valores plotados são referentes a triplicatas biológicas, com as barras de erro referindo-se ao desvio padrão das amostras.

4.5. Efeito da superexpressão de *sigX* no perfil de lipopolissacarídeo de *P.*

aeruginosa PA14

Outro efeito que chama a atenção na superexpressão de *sigX* é o perfil de lipopolissacarídeo (LPS), que apresenta bandas com maior massa molecular na amostra extraída após 16 horas, quando a taxa de crescimento está recuperada (figura 9). Analisando ainda a figura 9, observa-se a presença de bandas de um certo tamanho (marcadas em azul) apenas nas amostras de culturas em crescimento, que correspondem aos controles tanto na fase exponencial (2 horas), quanto no início da fase estacionária (6 horas) e à linhagem superexpressando *sigX* no ponto de 16 horas. Esse conjunto de bandas está ausente, entretanto, no controle em 16 horas e nos tempos iniciais de ALB04, sugerindo que a superfície das células desta última cultura se apresenta, na sua fase estacionária precoce, como a de uma célula selvagem em fase estacionária normal.

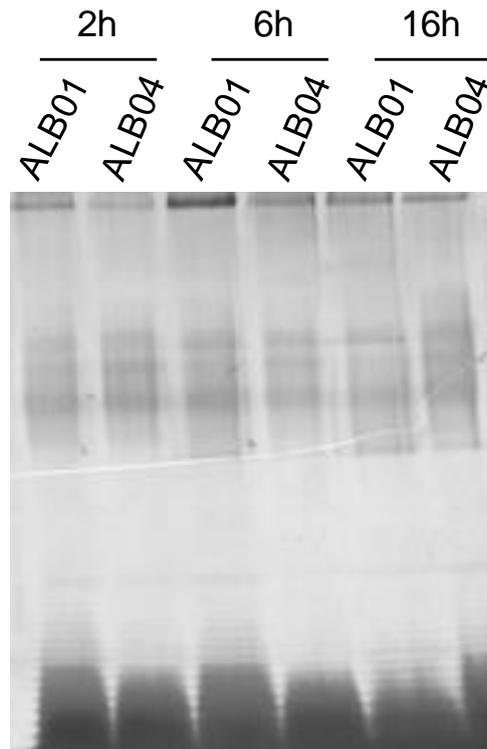


Figura 9. Separação de LPS em gel de gradiente de 8 a 18% de poliacrilamida. Cada banda representa moléculas com uma unidade de lipídeo A, o cerne e números crescentes de repetições de unidades de antígeno O. A faixa destacada em vermelho refere-se à região das bandas com maior número de repetições do antígeno O e a ponta de seta mostra um aumento do comprimento das cadeias de antígeno O em ALB04 16 h. Em azul, destaca-se a localização das bandas que foram observadas somente nas culturas em fase de crescimento, mostrando-se ausente em ALB04 nos tempos de 2 e 6 horas, mas presente quando sua taxa de crescimento é normalizada (16 horas).

Uma vez que já foram detectadas fortes interações entre as regiões de alça de OprF e os grupos funcionais do LPS (Straatsma e Soares, 2009), surgiu a hipótese de que esse efeito da superexpressão de σ^x no perfil de LPS ocorresse via OprF. Entretanto, fusões de transcrição de *PoprF-lacZ* não tiveram sua atividade induzida em células superexpressando σ^x (mostrado na seção 4.8), sugerindo que a regulação de *oprF* não se altera pela maior concentração de σ^x na célula. Este resultado pode ser interpretado como uma diferença entre as linhagens PA14 e PAO1, ou ainda indicar que outros fatores além de σ^x atuam na transcrição de *oprF*.

4.6. Efeito da osmolaridade do meio na atividade promotora de *sigX*

Como já mencionado, foi relatado que a transcrição de *oprF* é parcialmente dependente de σ^x e que OprF é essencial para o crescimento de PAO1 em meios com baixa osmolaridade (Brinkman *et al.*, 1999). A fim de verificar se a transcrição de *sigX* também sofre influência da osmolaridade do meio, a atividade de seu promotor foi medida durante o crescimento da cultura a 37°C em LB sem NaCl ou contendo 8 mM, 171 mM (quantidade presente no LB regular) ou 500 mM desse sal.

A linhagem ALB113, que contém uma fusão de transcrição da região regulatória de *sigX* com *lacZ* integrada em cópia única no sítio *ctx* de PA14 (Tabela 3) foi utilizada para se analisar a transcrição de *sigX*. Os dados mostrados na figura 10 foram obtidos por ensaios de atividade de β -galactosidase ao longo da curva de crescimento e revelaram que a indução do promotor de *sigX* ocorre, de fato, em condições de baixa osmolaridade, podendo indicar que há uma maior disponibilidade de σ^x nessas condições. Em baixa concentração de sal ocorre o aumento gradual na atividade do promotor de *sigX* ao longo da curva de crescimento, com indução de cerca de quatro vezes após 6 horas de incubação, correspondendo ao início da fase estacionária. A indução continua até 24 horas, chegando a um valor sete vezes maior, em relação ao tempo zero. Essa indução é bem menos pronunciada na condição normal de cultivo (LB com 171 mM de NaCl), sendo de apenas 2-2,5 vezes e estabilizando-se a partir de 6 horas de crescimento. Assim, a dependência da fase de crescimento é maior quando o promotor de *sigX* já está induzido, indicando que, sob condições normais de cultivo, o gene tem uma expressão basal relativamente constante. Isso foi confirmado pelo nível de RNA mensageiro de *sigX* em PA14 crescendo em LB (171 mM NaCl), que permanece relativamente constante desde a fase exponencial ao início da fase estacionária do crescimento, somente caindo após 16 horas de cultivo, quando é comum a queda na expressão de diversos genes (não mostrado). As diferenças na expressão de *sigX* de acordo com a salinidade não se devem a variações nas

taxas de crescimento entre as culturas em 0, 8 ou 171 mM de NaCl, uma vez que elas crescem igualmente nessas concentrações de sal (não mostrado). Já em 500 mM de NaCl, a indução do promotor de *sigX* não foi observada, provavelmente devido ao crescimento mais lento da cultura nessa condição, indicando um estresse mais acentuado.

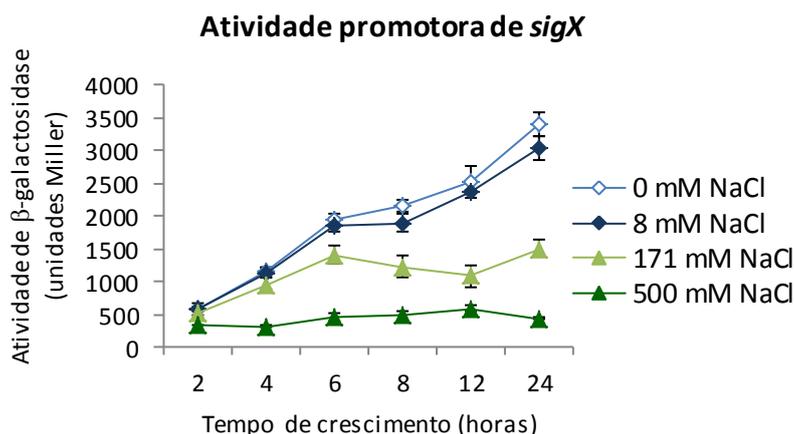


Figura 10. Ensaio de atividade do promotor de *sigX* em PA14 mostra sua indução em baixa osmolaridade. Alíquotas de culturas da linhagem ALB113 foram retiradas ao longo da curva de crescimento e submetidas ao ensaio de atividade de β -galactosidase. Os pontos na curva referem-se às médias dos valores de atividade obtidos para cada uma das três replicatas biológicas, e as barras de erro correspondem ao desvio padrão dessas amostras. O gráfico é representativo de dois ensaios independentes.

A observação de que *sigX* é mais expresso em baixa osmolaridade levou-nos a pensar que a superexpressão desse gene poderia simular a resposta a uma condição de baixa osmolaridade, na qual as células devem resistir a uma possível lise devido à entrada excessiva de água. Os dados obtidos sugerem que σ^x poderia atuar na regulação de genes envolvidos na proteção da célula à baixa osmolaridade.

4.7. Regulação de *oprF* e *cmaX* em PA14

Como há relatos na literatura de que a transcrição de *oprF* é regulada em nível de transcrição por σ^x em PAO1, decidiu-se verificar se os efeitos da superexpressão de σ^x em PA14 seriam devido a um aumento na concentração da porina OprF. No trabalho de Brinkman e colaboradores (Brinkman *et al.*, 1999), foram sugeridas duas regiões promotoras

para *oprF*, uma com consenso de ligação a σ^{70} , e outra com consenso de ligação a σ^x (baseado em regiões -35 de promotores dependentes de outros fatores sigma ECF), após serem detectados dois inícios de transcrição para *oprF*. Para verificar a contribuição de cada um desses promotores na transcrição de *oprF*, foram contruídas três linhagens repórteres distintas (figura 11), sendo uma para o promotor de *oprF* dependente de σ^x (ALB119), uma para o promotor dependente de σ^{70} (ALB121) e, finalmente, uma contendo ambas as regiões (ALB117) (tabela 3).

A atividade dos promotores de *oprF* foi medida durante o crescimento da cultura a 37°C em LB contendo 8 mM ou 171 mM de NaCl e os resultados para a fusão de transcrição contendo os dois promotores revelam a indução de *oprF* em condições de baixa osmolaridade, conforme o esperado (figura 12). Entretanto, o promotor supostamente dependente de σ^x apresentou atividade muito baixa durante todo o ensaio, enquanto a atividade obtida para o promotor independente de σ^x é comparável à atividade da região regulatória completa (figura 12). Isso indica que o promotor responsável pela atividade induzida por baixa osmolaridade é o promotor distal, dependente de σ^{70} e que, ao menos nas condições dos nossos ensaios, o promotor de *oprF* dependente de σ^x descrito na literatura (Brinkman *et al.*, 1999) não está ativo ou contribui muito pouco para a expressão de *oprF*.

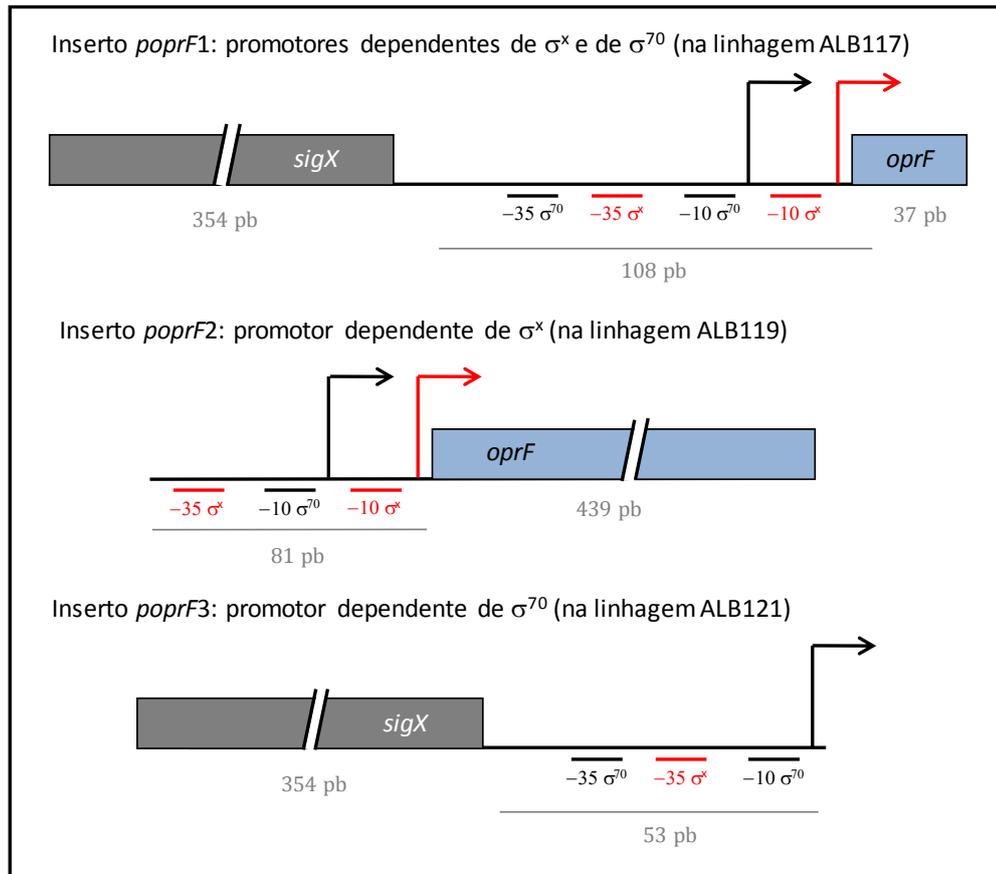


Figura 11. Esquema das três regiões clonadas independentemente no Mini-CTX_ *lacZ* para a construção das linhagens repórteres ALB117, ALB119 e ALB121. A seta quebrada vermelha representa o promotor proximal dependente de σ^x e a preta, o promotor distal dependente de σ^{70} .

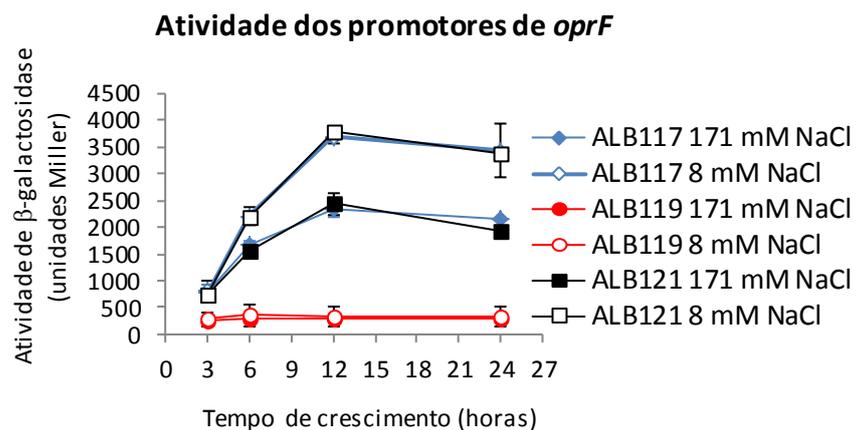


Figura 12. Ensaio de atividade do promotor de *oprF* dependente de σ^{70} em ALB121 mostra sua indução em baixa osmolaridade, enquanto o promotor dependente de σ^x em ALB119 não apresenta atividade nas condições testadas. Alíquotas foram retiradas ao longo da curva de crescimento e submetidas ao ensaio de atividade de β -galactosidase. Os pontos na curva referem-se às médias dos valores de unidades Miller obtidos para cada uma das três replicatas biológicas, e as barras de erro correspondem ao desvio padrão dessas amostras.

Analisando a região de *sigX* com a ferramenta GBrowse do endereço www.pseudomonas.com (Winsor *et al.*, 2011) (figura 13) foi visto que, assim como descrito para *P. aeruginosa* H103 e *P. fluorescens* (Brinkman *et al.*, 1999), um operon transcrito na mesma orientação de *sigX* localiza-se adjacente a esse gene em PA14. Esse operon é composto por três genes - *cmaX*, *crfX* e *cmpX* - codificando, respectivamente, uma proteína associada à membrana citoplasmática, uma proteína hipotética e uma proteína de membrana citoplasmática, todas sem função conhecida, que poderiam, junto com *sigX*, fazer parte de um sistema CSS (*cell-surface signaling*). Assim, um repórter de transcrição da região promotora de *cmaX* foi construído e sua atividade foi monitorada por ensaios de β -galactosidase, como descrito para os promotores de *sigX* e *oprF*. Ao contrário destes, a transcrição desse operon não é dependente da concentração de sal do meio (figura 14), o que sugere que sua transcrição seja independente da indução de *sigX*. Entretanto, o aumento brusco da atividade do promotor de *cmaX* após 12 horas de cultivo indica uma expressão dependente de fase estacionária. A dependência de RpoS nessa indução foi verificada e está descrita na seção 4.9.

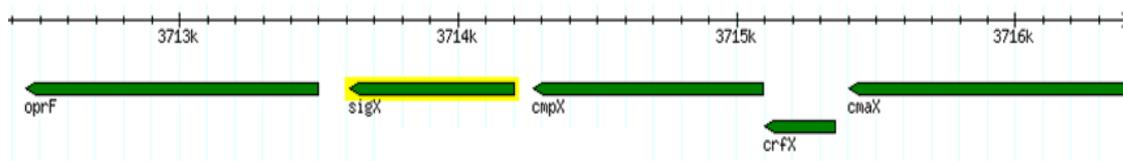


Figura 13. Região codificadora de *sigX* e suas adjacências. Figura extraída da ferramenta GBrowse do endereço www.pseudomonas.com (Winsor *et al.*, 2011).

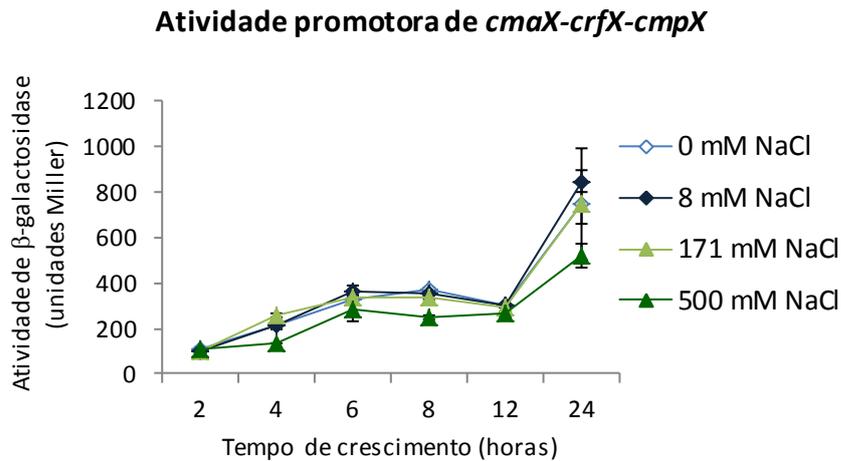


Figura 14. A atividade do promotor do operon *cmaX-crfX-cmpX* mostra independência em relação à concentração de sal no meio, mas parece variar quanto à fase de crescimento. Alíquotas da linhagem ALB115 foram retiradas ao longo da curva de crescimento e submetidas ao ensaio de atividade de β -galactosidase, mostrando um aumento de atividade na fase estacionária tardia. Os dados plotados referem-se às médias dos valores de unidades Miller obtidos para cada uma das três replicatas biológicas, com as barras de erro correspondendo ao desvio padrão dessas amostras. O gráfico é representativo de dois ensaios independentes.

4.8. Efeito da superexpressão de σ^x nos promotores de *sigX*, *oprF* e do operon *cmaX*

Visando investigar a autorregulação de σ^x e sua participação na transcrição dos genes localizados nas suas adjacências (figura 13), ensaios de atividade de β -galactosidase foram realizados com as linhagens repórteres para *sigX*, *oprF* e *cmaX* descritas na tabela 3, carregando o plasmídeo pALB04. O vetor pJN105 também foi inserido independentemente nessas linhagens, como controle. As alíquotas para medir a atividade promotora de *sigX* e *cmaX* foram retiradas ao longo da curva de crescimento. Arabinose foi adicionada no início da curva ou a partir da terceira hora de cultivo (DO_{600} em torno de 1,5), para minimizar os possíveis danos às células causados pelo excesso de σ^x na célula durante a fase lag do crescimento. Em ambos os casos, a superexpressão de σ^x teve, surpreendentemente, um efeito negativo sobre seu próprio promotor (figura 15 A e B). Não foi detectado nenhum efeito da superexpressão de *sigX* sobre o promotor de *cmaX* nas condições ensaiadas (figura 15 A e B).

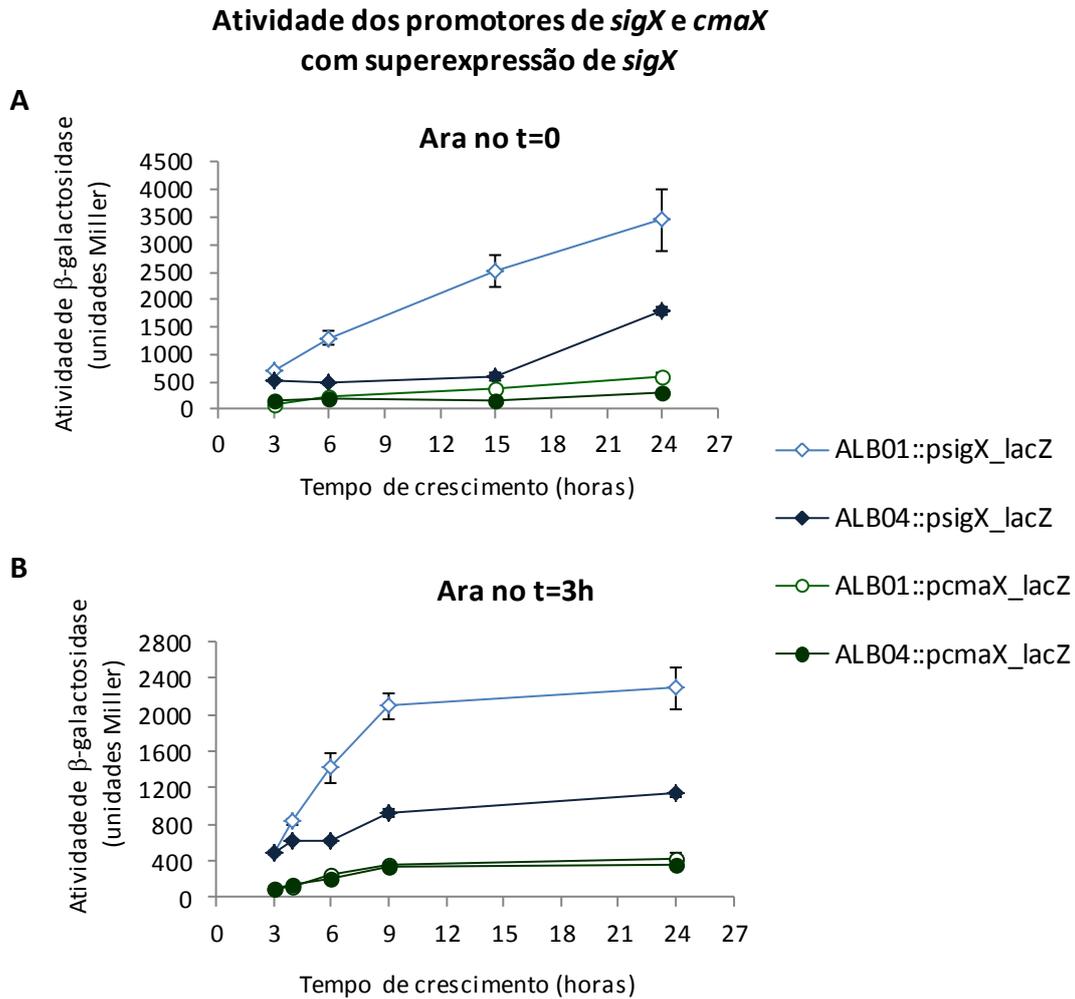


Figura 15. Ensaio de atividade do promotor de *sigX* mostra uma autorregulação negativa, enquanto o promotor de *cmaX* não sofre influência da superexpressão de *sigX*. Alíquotas para os ensaios de atividade de β -galactosidase foram retiradas ao longo da curva de crescimento em meio LB com 8mM de NaCl e arabinose adicionada desde o início da cultura (A) ou após três horas de crescimento (B). Os pontos nas curva referem-se às médias dos valores de unidades Miller obtidos para cada uma das três replicatas biológicas e as barras de erro correspondem ao desvio padrão dessas amostras. Os gráficos são representativos de três ensaios independentes.

As três fusões repórteres para *oprF* também foram submetidas a ensaios de expressão em condições de superexpressão de *sigX* e, como no caso do promotor de *sigX*, mostraram uma atividade de β -galactosidase reduzida na superexpressão de σ^x (figura 16). Os ensaios com as linhagens ALB04::*poprF1_lacZ* e ALB04::*poprF2_lacZ* e controles foram realizados, inicialmente, com culturas crescendo em LB com 8mM NaCl, nas mesmas condições descritas para os ensaios de atividade dos promotores de *sigX* e *cmaX*. Entretanto, como a

atividade de β -galactosidase detectada na linhagem repórter controle já era alta, foi questionado se, caso ocorresse indução de *poprF* por σ^x , ela não seria detectada, uma vez que a atividade do fator sigma endógeno já estaria no seu nível máximo. Assim, os ensaios passaram a ser feitos com culturas inoculadas em LB com 171 mM NaCl. Porém, tanto em baixa osmolaridade (não mostrado) quanto nas condições normais de cultivo, houve queda na atividade da construção de *oprF* contendo os dois promotores e não houve alteração na atividade do promotor dependente de σ^x , que permaneceu muito baixa durante todo o ensaio. O promotor dependente de σ^{70} comportou-se como a região promotora completa, corroborando os outros resultados encontrados para essas regiões (figura 13) e indicando novamente que o promotor supostamente dependente de σ^x está inativo nas nossas condições experimentais. A região regulatória de *oprF* apresenta 100% de identidade entre PA14 e PAO1, descartando um possível efeito *in cis*. Para todos os ensaios com os promotores de *oprF*, a arabinose foi adicionada na terceira hora do crescimento da cultura.

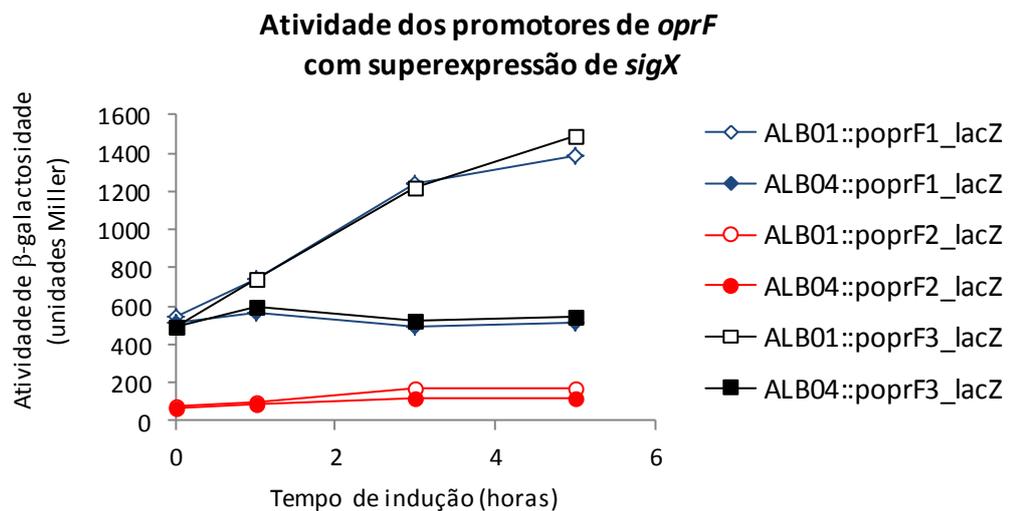


Figura 16. A atividade da região regulatória de *oprF* resulta somente do promotor dependente de σ^{70} e é reduzida na superexpressão de *sigX*. Alíquotas foram retiradas ao longo da curva de crescimento em LB e submetidas ao ensaio de β -galactosidase. Arabinose foi adicionada em 3 horas de crescimento. Os dados plotados referem-se às médias dos valores de unidades Miller obtidos para cada uma das três replicatas biológicas, com as barras de erro correspondendo ao desvio padrão dessas amostras.

Para se descartar a hipótese de que a repressão observada nos promotores testados era um efeito do estresse celular causado pelo excesso de σ^x na estabilidade ou atividade da enzima β -galactosidase, gerando uma interpretação equivocada do resultado, os níveis relativos de mRNA de *oprF* foram analisados tanto na superexpressão de σ^x desde o início do crescimento, como na indução após 3h de cultura. Como se pode observar na figura 17 A, ocorre também um decréscimo nos níveis de mRNA de *oprF* após 6 horas na presença de arabinose, quando o efeito no fenótipo das células é severo, concordando com os dados dos ensaios de β -galactosidase. A redução do nível de mRNA de *oprF* não é observada quando arabinose é adicionada à cultura em fase exponencial de crescimento, provavelmente devido ao menor estresse sofrido pelas células nessas condições (figura 17 B). Esse não é um efeito geral da superexpressão de *sigX* na transcrição ou estabilidade de mRNAs, pois outros transcritos tiveram seus níveis aumentados nessa condição, como mostrado adiante (seção 4.12).

Esses resultados, somados aos dados de expressão do promotor de *oprF* dependente de σ^x em baixa osmolaridade (seção 4.7) e aos de proteoma (descritos abaixo), indicam que o efeito observado no crescimento e na morfologia da linhagem superexpressando *sigX* não é consequência de um aumento da porina OprF, visto que esta não tem sua expressão regulada por σ^x nas condições analisadas neste trabalho. De fato, no trabalho de Brinkman e colaboradores (Brinkman *et al.*, 1999), a complementação com OprF codificado *in trans* na linhagem de *P. aeruginosa* PAO1 mutante para *sigX* não restaurou os fenótipos associados à ausência desse gene, indicando que σ^x está envolvido na regulação de outros genes em *P. aeruginosa*.

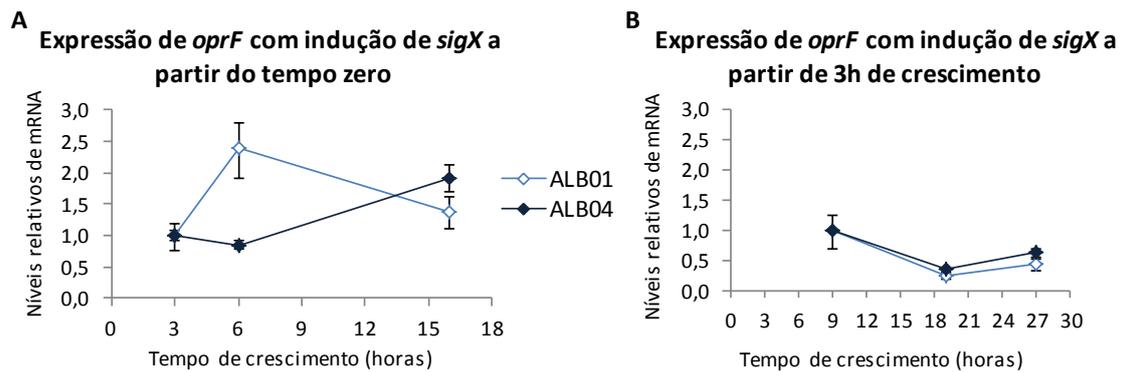


Figura 17. Ensaio de qRT-PCR mostram que a superexpressão plasmidial mais drástica de σ^x em PA14 causa redução no nível de mRNA de *oprF* em 6 horas de crescimento, porém a indução de *sigX* na fase exponencial não causa efeito nos níveis do mRNA de *oprF*. Os ensaios foram realizados em triplicatas técnicas, a partir de RNA total extraído de alíquotas retiradas periodicamente de culturas crescendo a partir da $DO_{600}=0,1$ em LB com gentamicina a 37°C e 240 rpm induzidas com arabinose desde o tempo zero de crescimento (A) ou na fase exponencial (B).

O efeito negativo da superexpressão de σ^x em *oprF* pode ser interpretado como um efeito colateral do excesso de σ^x competindo pelo cerne da RNA polimerase com o σ^{70} ou outro sigma alternativo, necessário para a ativação do que parece ser o promotor mais forte de *oprF*.

Visando obter uma superexpressão mais branda e controlada de σ^x , uma linhagem de PA14 com a região codificadora de *sigX* sob o comando do promotor *araBAD* integrada no sítio *ctx* em cópia única (ALB09, na tabela 2) teve seu RNA total extraído e utilizado como molde para a síntese do cDNA usado nas PCRs quantitativas. A indução por arabinose na linhagem ALB09 resultou no nível de mRNA de *sigX* 5 vezes maior que na linhagem controle ALB01 (PA14/pJN105), mas cerca de 10 vezes menor que em ALB04 (pBAD*sigX* plasmidial) em arabinose. Na linhagem ALB04 sem arabinose, ainda é possível detectar cerca de 3,3 vezes mais transcrito de *sigX* que em PA14/pJN105, enquanto esse vazamento não é observado para ALB09 sem arabinose (figura 18).

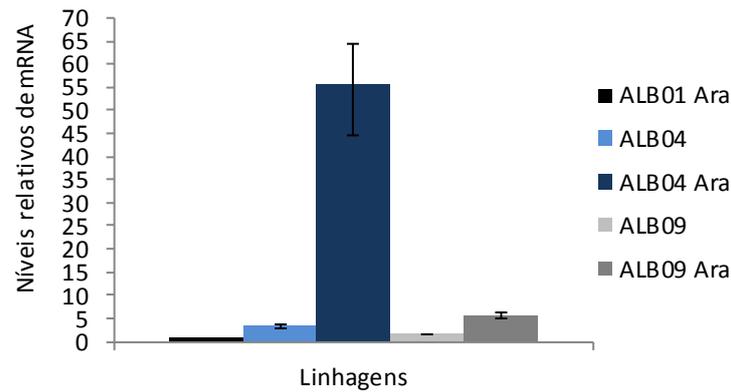


Figura 18. Níveis de indução do mRNA de *sigX* nas linhagens ALB04 (construção plasmidial para superexpressão de *sigX*) e ALB09 (construção de superexpressão integrada no cromossomo), comparados com ALB01 contendo arabinose. O ensaio de qRT-PCR foi realizado em triplicatas técnicas, a partir de RNA total extraído de culturas de ALB09 e ALB04 crescendo por 6 horas a partir da $DO_{600}=0,1$ em LB e LB com 50 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina, respectivamente, a 37°C e 240 rpm. Arabinose foi adicionada desde o início do crescimento (indicado por “Ara” na legenda). Culturas sem adição de arabinose também foram ensaiadas para testar o vazamento das construções não induzidas.

Nesse contexto de superexpressão mais branda de σ^x , o nível de mRNA de *oprF* em ALB09 após 6 horas de crescimento na presença de arabinose mostrou-se semelhante ao encontrado para ALB09 sem arabinose (figura 19), podendo indicar que níveis moderados de σ^x parecem não ser suficientes para causar a repressão do promotor de *oprF* observada nos ensaios de β -galactosidase (figura 17). Como também não houve aumento nos níveis de mRNA de *oprF*, esse dado suporta a hipótese de que nas condições testadas no nosso laboratório, o promotor de *oprF* não responde diretamente à maior expressão de σ^x em PA14.

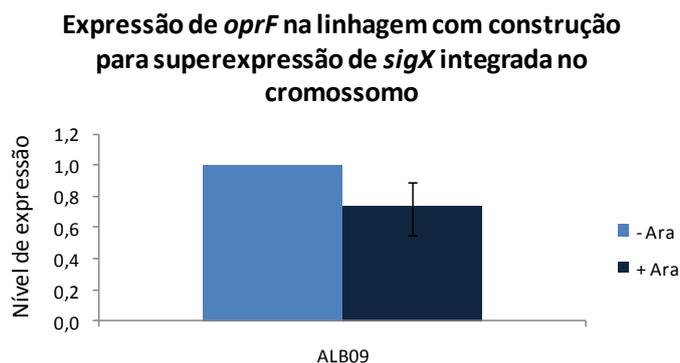


Figura 19. A superexpressão de *sigX* a partir da construção integrada no cromossomo de PA14 não causa efeito na transcrição de *oprF*. O ensaio de qRT-PCR foi realizado em triplicatas técnicas, a partir de RNA total extraído de culturas crescendo por 6 horas a partir da $DO_{600}=0,1$ em LB a 37°C e 240 rpm. As barras clara e escura indicam a ausência ou presença de arabinose desde o início do crescimento, respectivamente.

O conjunto dos resultados, aliado à informação de que a expressão de OprF é diminuída num mutante *sigX* em PAO1 (Brinkman *et al.*, 1999) parece indicar que a atividade de σ^x seria mais importante para a ativação de seu regulon, do que a simples presença de maiores quantidades desse fator sigma na célula. Apesar de inúmeras tentativas, não foi possível obter um mutante nulo de *sigX* em PA14, o que também parece indicar um papel diferente desse fator sigma nas duas linhagens, ou ainda pode sugerir que o mutante *sigX* descrito na literatura apresente uma mutação secundária, não detectada pelos autores, que compensaria a falta de σ^x .

4.9. Investigação da participação de RpoS no perfil bifásico da curva de crescimento de PA14 superexpressando *sigX*

Tão intrigante quanto a parada precoce do crescimento de ALB04 com a superexpressão de σ^x induzida é a recuperação do crescimento após 10 a 14 horas de cultivo (figura 2). Como essa recuperação se trata de um fenômeno observado na fase estacionária do crescimento, foi levantada a hipótese de que o fator sigma RpoS poderia estar levando vantagem na competição com σ^x nos tempos mais tardios da curva, consequentemente restabelecendo o crescimento da cultura. Para analisar a participação de RpoS na transcrição

dos genes em estudo, as construções *psigX_lacZ*, *pcmaX_lacZ* e *poprF1_lacZ*, foram integradas em cópia única no sítio *ctx* do cromossomo do mutante *rpoS::mar7*, originando, respectivamente, as três linhagens repórteres de transcrição, ALB113 *rpoS::mar7*, ALB115 *rpoS::mar7* e ALB117 *rpoS::mar7* (tabela 2).

Ensaio de atividade de β -galactosidase com os promotores de *sigX*, *oprF* e *cmaX* foram realizados tanto com as linhagens repórteres crescendo em LB contendo 171 mM de NaCl, quanto em LB contendo 8 mM de NaCl, uma vez que os promotores de *sigX* e *oprF* são induzidos em baixa concentração de sal (figuras 10 e 12).

Observou-se uma redução na atividade do promotor de *sigX* no mutante *rpoS::mar7* em ambas as condições de salinidade testadas (figura 20 A). Foi possível também detectar uma redução na atividade do promotor de *cmaX* na ausência de RpoS em meio com baixa concentração de sal (figura 20 B). Semelhante ao que ocorre nos promotores de *sigX* e *cmaX*, a região promotora de *oprF* apresenta atividade mais baixa no mutante de *rpoS* (figura 20 C).

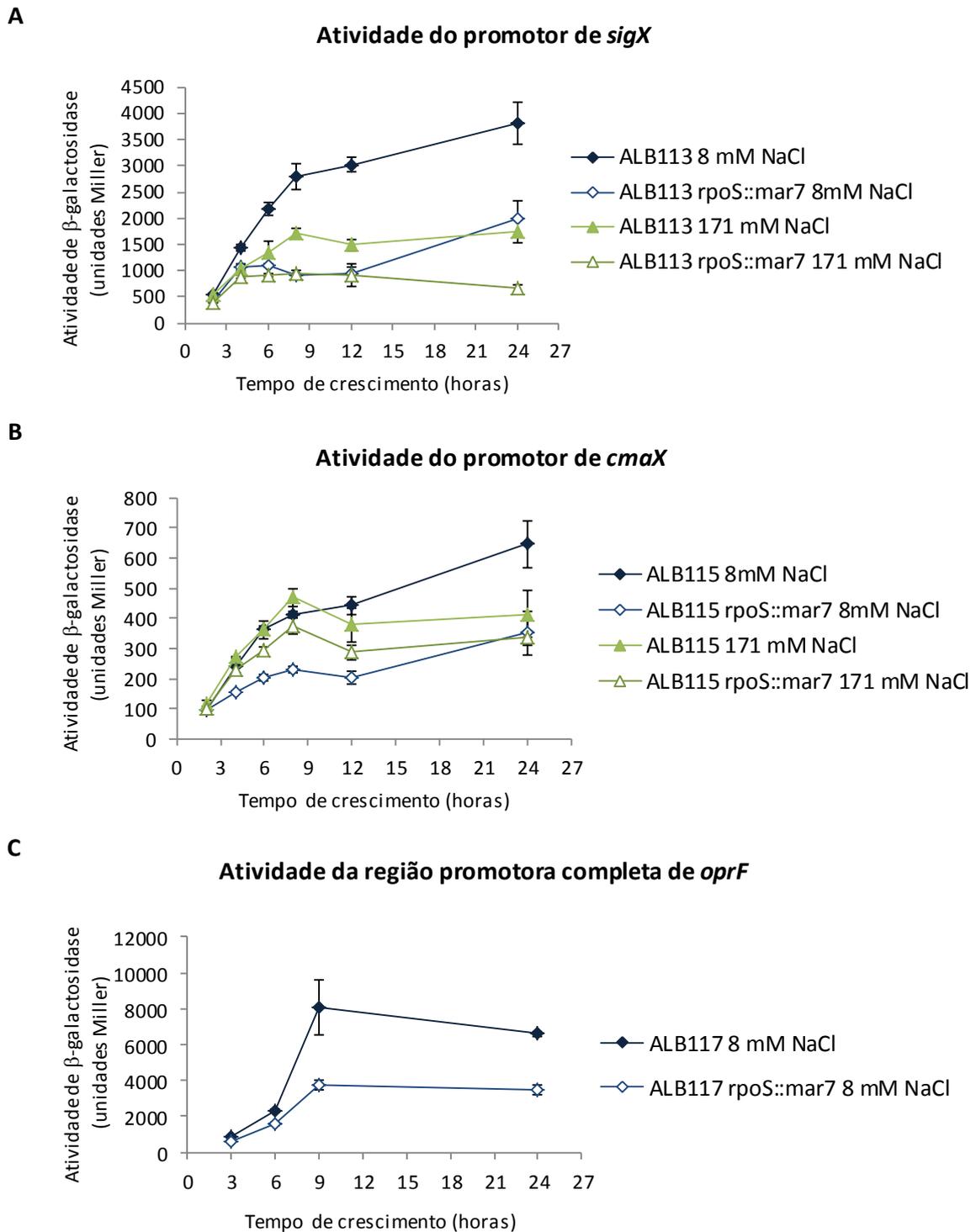


Figura 20. RpoS atua na transcrição de *sigX*, *cmaX* e *oprF*. Atividade do promotor de *sigX* (A) e *cmaX* (B) em 8 e 171 mM de NaCl. C. Atividade do promotor de *oprF* em 8 mM de NaCl. Para todos os ensaios, alíquotas foram retiradas ao longo da curva de crescimento e submetidas ao ensaio de atividade de β -galactosidase. Os pontos na curva referem-se às médias dos valores de unidades Miller obtidos para cada uma das três replicatas biológicas e as barras de erro correspondem ao desvio padrão dessas amostras. Os ensaios foram feitos nas linhagens repórteres derivadas da selvagem (símbolos cheios) e mutante em *rpoS* (símbolos vazios).

Pelos resultados obtidos nos ensaios de atividade de β -galactosidase, pode-se afirmar que a transcrição de *sigX* e *oprF* é dependente de RpoS a partir do início da fase estacionária (aproximadamente a sexta hora de crescimento), momento no qual ocorre a indução da expressão de RpoS (Fujita *et al.*, 1994). Apesar dos resultados para o promotor de *cmaX* terem sido evidentes apenas em baixa concentração de sal, dados de transcriptoma de *P. aeruginosa* publicados no trabalho de Schuster e colaboradores (Schuster *et al.*, 2004) mostram que esse gene é 2,1 vezes mais expresso na linhagem selvagem comparada ao mutante de *rpoS* na fase estacionária em LB, confirmando o resultado obtido no presente trabalho para a atividade de β -galactosidase em condições que aumentam a atividade do promotor (figura 20 B). Esse efeito de diminuição da transcrição também não se deve a um efeito global da ausência de RpoS, visto que ensaios de qRT-PCR para *rcsC* não mostraram alteração da quantidade relativa de mRNA em seu mutante (não mostrado).

Apesar de não ter sido encontrado o consenso para ligação de RpoS (Schuster *et al.*, 2004) nas regiões promotoras de *sigX*, *oprF* e *cmaX* utilizando o programa *Consensus* (Hertz e Stormo, 1999), disponível no endereço [HTTP://rsat.ulb.ac.be/rsat/](http://rsat.ulb.ac.be/rsat/), é possível observar que a sequência de ligação de RpoS em *P. aeruginosa*, CTATACT, sobrepõe-se à região identificada como -10 do início de transcrição de *oprF* dependente de σ^{70} já mostrada (Brinkman *et al.*, 1999) (figura 21). Assim, é provável que RpoS se ligue no DNA a ser transcrito no mesmo sítio onde se prevê a ligação de σ^{70} .

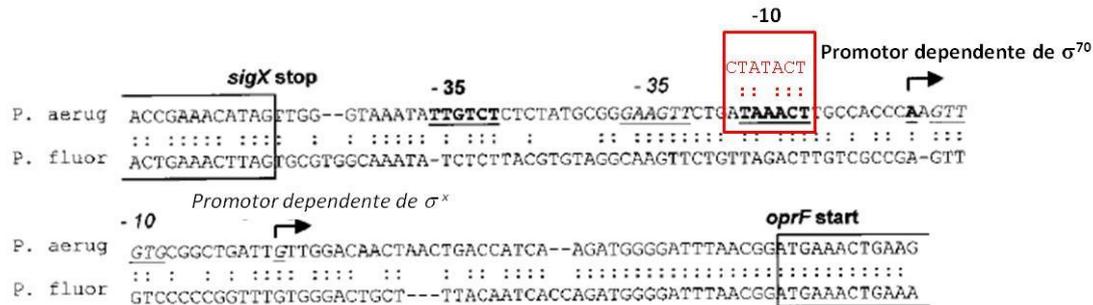


Figura 21. Região regulatória de *oprF*. São mostrados os inícios de transcrição e prováveis sítios de ligação da RNA polimerase identificados por Brinkman e colaboradores (Brinkman *et al.*, 1999). A caixa vermelha destaca também em vermelho o consenso de ligação de RpoS (Schuster *et al.*, 2004), que se sobrepõe ao sítio de ligação de σ^{70} e destacado em negrito dentro da mesma caixa (figura adaptada de Brinkman *et al.*, 1999).

4.10. Os níveis da proteína σ^x são controlados ao longo do crescimento em condição de superexpressão de *sigX*

Para investigar a presença de σ^x nas células de ALB01 e ALB04 ao longo do crescimento, ensaios de *immunobloting* foram realizados com extratos proteicos coletados após 6 e 18 horas de crescimento com arabinose e anticorpos policlonais contra σ^x recombinante. A banda de aproximadamente 23,5 kDa correspondendo a σ^x está presente em 6 horas de superexpressão em ALB04. Entretanto, em 18 horas, quando as células estão na segunda fase exponencial de crescimento, essa banda não é detectável (Figura 22 A). Como a superexpressão plasmidial é mantida durante toda a curva de crescimento através da pressão seletiva de antibiótico e a arabinose não é consumida ao longo do crescimento, podemos inferir que o excesso da proteína σ^x é controlado. Os níveis de RNA mensageiro de *sigX* acompanham o mesmo perfil da proteína em ALB04 (Figura 22 B), sugerindo também uma regulação em nível de síntese ou estabilidade do mensageiro. Cabe ressaltar que a diminuição da indução não se deve a mutações no plasmídeo (ver item 4.3).

Não foi possível verificar o nível de σ^x em PA14 ao longo do crescimento, provavelmente devida à baixa concentração endógena desse sigma ECF.

O fato da superexpressão de σ^x ser controlada e o nível dessa proteína decrescer após um tempo de cultivo em ALB04 explica tanto a retomada de crescimento na curva bifásica (figuras 2 e 6), quanto a presença de bandas características de células em crescimento no perfil de LPS (figura 9).

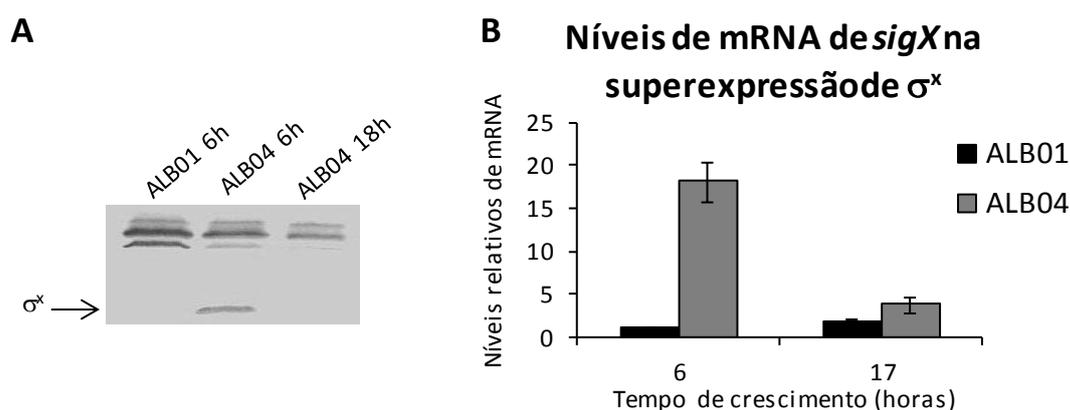


Figura 22. A expressão de σ^x em ALB04 é controlada ao longo da curva de crescimento. **A.** *Immunoblotting* com soro policlonal anti- σ^x . **B.** Resultado de qRT-PCR de *sigX*. As barras referem-se às médias de triplicatas técnicas e as barras de erro representam o desvio padrão.

4.11. Análise proteômica da superexpressão de σ^x indica seu envolvimento na biossíntese de ácidos graxos

Na tentativa de elucidar os elementos que levam aos fenótipos alterados das células superexpressando σ^x , foram realizadas análises proteômicas em dois conjuntos de géis bidimensionais (figura 23). Nas condições ensaiadas (seção 3.8), comparando-se os géis com extratos proteicos totais de ALB01 induzida (3 horas) com ALB04 nas mesmas condições e após 28 horas de indução, com o crescimento já recuperado, a análise estatística realizada no programa Delta 2D (Decodon) permitiu detectar mais de 100 *spots* diferencialmente expressos (considerando uma média de volumes normalizados $< 0,7$ ou $> 1,3$). Dos 85 *spots* recortados dos géis e submetidos às análises, um total de 44 proteínas distintas foram identificadas com sucesso, sendo 27 delas induzidas nas células superexpressando *sigX* (ALB04 3h), quando

comparadas a ALB01 3h. Dessas, a maioria não permanece com a expressão induzida nas células recuperadas (ALB04 28h), como pode ser visto na tabela 6.

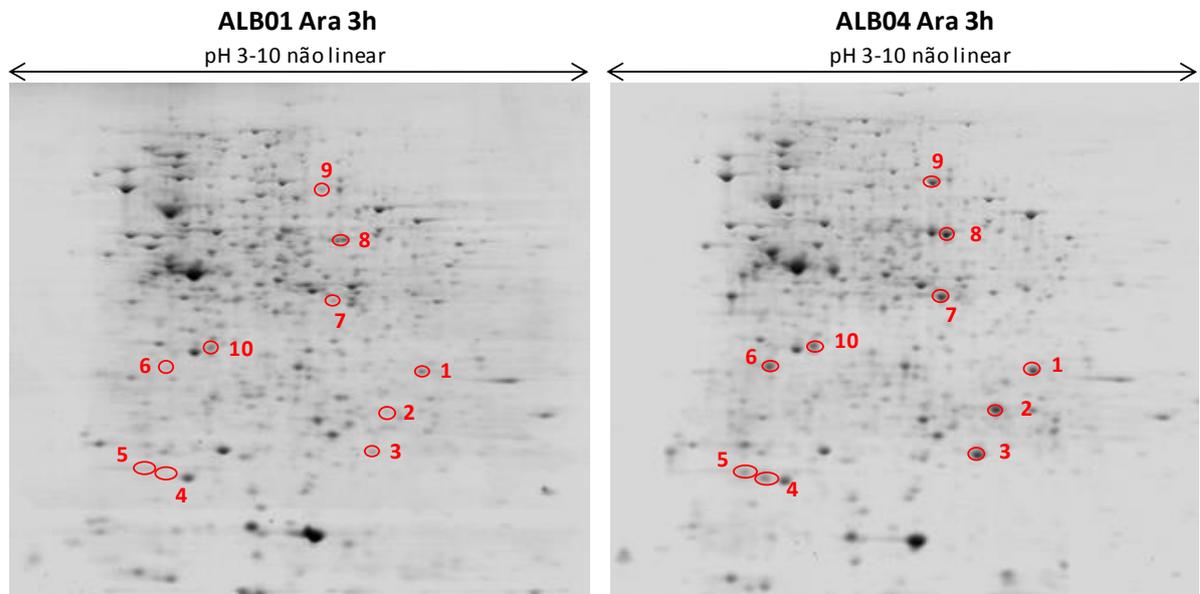


Figura 23. Exemplos de géis bidimensionais usados nas análises proteômicas de ALB04 em comparação com ALB01. Estão destacados alguns dos *spots* induzidos em ALB04 que puderam ser identificados a olho nu. A expressão diferencial desses e dos demais *spots* foi detectada e confirmada após análise estatística no software Delta 2-D (Decodon).

Tabela 6. Proteínas de *P. aeruginosa* PA14 com expressão diferencial em células superexpressando o fator sigma ECF σ^x .

Locus ^a	Função ou classe ^b	ALB04 3h x ALB01 3h ^c	ALB04 28h x ALB01 3h ^d	ALB04 28h x ALB04 3h ^d
Proteínas envolvidas na biossíntese de ácidos graxos				
PA14_17270 (<i>accA</i>)	acetyl-CoA carboxylase carboxyltransferase subunit alpha	1.98	ND	ND
PA14_64100 (<i>accB</i>)	acetyl-CoA carboxylase biotin carboxyl carrier protein subunit	4.17	ND	ND
PA14_23860 (<i>accD</i>)	acetyl-CoA carboxylase subunit beta	2.12	ND	ND
PA14_01240	carbonic anhydrase	5.77	ND	ND
PA14_05460 (<i>bioA</i>)	adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate transaminase	4.19	ND	ND
PA14_25650 (<i>fabD</i>)	malonyl-CoA-(acyl-carrier-protein) transacylase	6.42	2.40	0.37
PA14_21540 (<i>fabH3</i>)	3-oxoacyl-(acyl carrier protein) synthase III	4.12	1.19	0.29
PA14_68360 (<i>fabY</i>)	putative beta-ketoacyl synthase	4.19	0.28	0.07
PA14_25660 (<i>fabG</i>)	3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) reductase	3.30	0.63	0.19
PA14_57050 (<i>fabG2</i>)	3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) reductase (short chain?)	6.80	0.78	0.12
PA14_25900 (<i>fabV</i>)	trans-2-enoyl-CoA reductase	5.24	0.76	0.14
PA14_43690 (<i>fabB</i>)	3-oxoacyl -(acyl carrier protein) synthase I	1.69	1.95	1.15
PA14_46490 (<i>fabF2</i>)	3-oxoacyl-(acyl carrier protein) synthase II	5.12	1.86	0.36
Proteínas relacionadas a compostos lipídicos				
PA14_17310 (<i>kdsA</i>)	2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase (LPS synthesis)	6.14	2.08	0.34
PA14_12130 (<i>lis</i>)	lipoyl synthase	2.09	0.42	0.2
PA14_63250 (<i>ycfY</i>)	acetyl-CoA acetyltransferase (FA and phospholipid metabolism)	1.18	3.46	2.93
PA14_62130 (<i>ilvC</i>)	ketol-acid reductoisomerase (CoA biosynthesis)	1.11	1.44	1.30
Proteínas envolvidas em outras vias metabólicas				
PA14_29110 (<i>cysK</i>)	cysteine synthase A	19.50	4.43	0.23
PA14_23500 (<i>tyrB</i>)	aromatic amino acid aminotransferase	2.09	1.06	0.51
PA14_43970 (<i>lpdG</i>)	dihydrolipoamide dehydrogenase (operon <i>sucAB-lpdG</i>)	2.05	1.35	0.66
PA14_44010 (<i>sucA</i>)	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component (operon <i>sucAB-lpdG</i>)	1.84	0.40	0.22
PA14_43940 (<i>sucD</i>)	succinyl-CoA synthetase subunit alpha (Krebs cycle)	1.47	0.90	0.61
PA14_43950 (<i>sucC</i>)	succinyl-CoA synthetase subunit beta (Krebs cycle)	1.38	0.93	0.67
PA14_09420 (<i>phzF1</i>) or PA14_39890 (<i>phzF2</i>)	phenazine biosynthesis protein PhzF	0.64	1.68	2.62
PA14_09450 (<i>phzD1</i>) or PA14_39925 (<i>phzD2</i>)	phenazine biosynthesis protein PhzD	0.61	1.54	2.52
Proteínas regulatórias				
PA14_41575 (<i>sigX</i>)	RNA polymerase sigma factor SigX	22.72	1.88	0.08
PA14_08710 (<i>nusG</i>)	transcription antitermination protein NusG	1.42	0.17	0.12
PA14_22470	LysR family transcriptional regulator	0.67	2.04	3.04

Locus ^a	Função ou classe ^b	ALB04 3h x ALB01 3h ^c	ALB04 28h x ALB01 3h ^d	ALB04 28h x ALB04 3h ^d
Tradução e metabolismo proteico				
PA14_46950	putative ATP-binding component of ABC transporter	6.50	1.84	0.28
PA14_41240 (<i>clpP</i>)	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	4.26	0.60	0.14
PA14_27210 (<i>efp</i>)	elongation factor P	2.15	1.21	0.56
PA14_05450	16S ribosomal RNA methyltransferase RsmE	1.63	4.29	2.63
PA14_08830 (<i>tufA</i>) or PA14_08680 (<i>tufB</i>)	elongation factor Tu	1.29	2.22	1.72
PA14_57010 (<i>groEL</i>)	chaperonin GroEL	1.21	4.02	3.32
PA14_16250 (<i>lasB</i>)	elastase LasB	0.90	3.68	4.09
PA14_41570 (<i>oprF</i>)	major porin and structural outer membrane porin OprF precursor	0.77	4.40	5.71
PA14_28650 (<i>thrS</i>)	threonyl-tRNA synthetase	0.72	3.18	4.42
PA14_01710 (<i>ahpC</i>)	alkyl hydroperoxide reductase	0.72	1.95	2.71
PA14_53070 (<i>hpd</i>)	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	0.72	1.82	2.53
PA14_08970 (<i>rplE</i>)	50S ribosomal protein L5	0.67	2.53	3.76
PA14_53250 (<i>cbpD</i>)	chitin-binding protein CbpD	0.61	4.38	7.18
Outras				
PA14_11890	hypothetical protein (Rossmann fold: NAD(P) binding)	3.22	5.63	1.75
PA14_41730	hypothetical protein	0.50	1.99	4.00
PA14_01760 (<i>nuh</i>)	nonspecific ribonucleoside hydrolase (gene close to <i>ahpC</i>)	0.28	3.15	11.25

^aNúmero atribuído no projeto de anotação do genoma de *P. aeruginosa* PA14 (Lee *et al.*, 2006).

^bFunções das proteínas codificadas por essas ORFs são indicadas segundo anotação do genoma de PA14 (Winsor *et al.*, 2011).

^cOs genes cujos produtos foram induzidos na superexpressão de *sigX* em comparação com as células selvagens são mostrados em negrito.

^dND = Não determinado, por se tratar de resultado da análise com o primeiro conjunto de géis, onde não foram consideradas culturas recuperadas.

Pelo menos oito enzimas da via de biossíntese de ácidos graxos (FabD, FabH3, FabY, FabG, FabG2, FabV, FabB e FabF2) foram detectadas como induzidas em ALB04 em comparação com ALB01, além de três das quatro subunidades da acetil-coA carboxilase (ACC), mostrando claramente o envolvimento de σ^x na regulação da biossíntese de ácidos graxos (tabela 6 e figura 1). Também foram induzidas as enzimas adenosilmetionina-8-amino-7-oxononanoato transaminase, da via de síntese de biotina, cofator da ACC, e a anidrase carbônica, que converte água e CO₂ em bicarbonato, substrato da ACC. A ACC é a enzima que catalisa a primeira reação da via de síntese de ácidos graxos, controlando assim a taxa de

produção dessas moléculas em *E. coli*, sendo este o primeiro ponto de regulação da via (Davis *et al.*, 2000). Em *B. subtilis* e *S. aureus*, malonil-CoA ou malonil-ACP se ligam ao repressor FapR, desligando-o de seus operadores e assim induzindo a transcrição de genes envolvidos na biossíntese de ácidos graxos e em alguns dos passos iniciais da síntese dos fosfolipídeos de membrana (Albanesi *et al.*, 2013; Martinez *et al.*, 2010; Zhang e Rock, 2009). Apesar de *P. aeruginosa* não possuir em seu genoma ortólogos de FapR, o efeito observado na alteração da concentração das enzimas que atuam nas reações subsequentes da via poderiam ocorrer indiretamente via malonil-CoA e não diretamente devido à superexpressão de σ^x , por um mecanismo análogo ao de *B. subtilis*.

Uma análise preliminar de sequências 500 pb a montante das regiões regulatórias de cada uma das 21 unidades transcricionais, cujos produtos apareceram induzidos na superexpressão de σ^x foi realizada com a ferramenta *Consensus* (Hertz e Stormo, 1999), disponível em [HTTP://rsat.ulb.ac.be/rsat/](http://rsat.ulb.ac.be/rsat/). Foi encontrado um motivo conservado (figura 24) que não é similar a nenhum consenso descrito para qualquer subfamília de fator sigma ECF (Staron *et al.*, 2009) e sua relevância como o consenso de ligação de σ^x precisa ser confirmada experimentalmente. Alternativamente, esse consenso poderia representar o sítio de ligação de um fator de transcrição ainda não descrito, regulado direta ou indiretamente por σ^x .

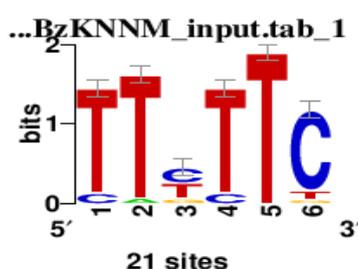


Figura 24. Weblogo do consenso encontrado nas regiões a montante das unidades transcricionais, cujos produtos foram induzidos na superexpressão de σ^x . A matriz para a geração desse gráfico foi derivada de sequências 500 bp a montante do primeiro códon de 21 unidades transcricionais. O tamanho das letras corresponde à frequência com que aparecem nas posições consideradas. Essa análise foi feita com o *software* *Consensus* (Hertz e Stormo, 1999), disponível em [HTTP://rsat.ulb.ac.be/rsat/](http://rsat.ulb.ac.be/rsat/).

4.12. Validação da análise proteômica e descrição dos alvos da superexpressão de *sigX*

Para verificar se a expressão diferencial das proteínas induzidas na superexpressão de *sigX* seria resultado de ativação transcricional, alguns alvos foram selecionados para análise da atividade do promotor e determinação do nível relativo de mRNA, por ensaios de β -galactosidase e qRT-PCR, respectivamente.

4.12.1. FabD e FabG

fabD (PA14_25650) codifica uma malonil-CoA-(ACP) transacilase e é o primeiro gene em um operon com um dos cinco parálogos de *fabG* (PA14_25660) (Kutchma *et al.*, 1999), que também se apresentou induzido na superexpressão de *sigX* (tabela 6). No genoma de PA14 existe outro gene para uma malonil-CoA-(ACP) transacilase, anotado como *mdcH* (PA14_02620) e que apresenta 37,41% de identidade de aminoácidos com o produto de *fabD*. *mdcH* parece ser essencial, por não existir um mutante de transposon disponível na biblioteca PA14NR, enquanto existe uma inserção de transposon em *fabD* (Liberati *et al.*, 2006), sugerindo que este gene é dispensável para o crescimento. A ausência de inserções de transposon em *fabG* (PA14_25660) sugere que esse parálogo poderia ser essencial e, assim, seu produto atuaria como a redutase constitutiva, já que existem mutantes disponíveis para os outros quatro parálogos de *fabG* (Liberati *et al.*, 2006). Uma isoforma de FabG, codificada por PA14_57050 e aqui denominada FabG2, também foi induzida em ALB04 e pode representar uma enzima alternativa com diferente regulação e/ou especificidade. A indução em nível de transcrição do operon *fabD-fabG* (PA14_25660) na superexpressão de *sigX* foi confirmada tanto por ensaios de β -gal com o promotor de *fabD* quanto por qRT-PCR de *fabD* e *fabG* (figura 25 A, B).

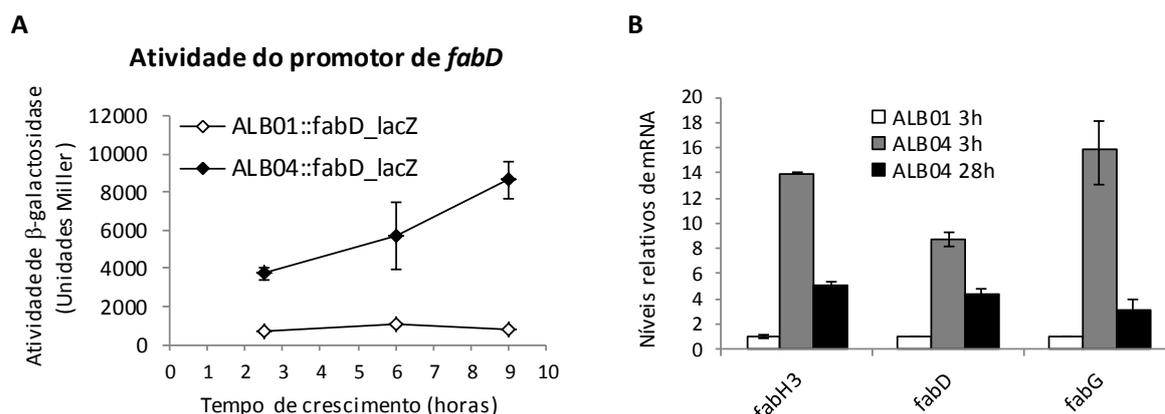


Figura 25. *fabD*, *fabH3* e *fabG* são regulados em nível de transcrição na superexpressão de *sigX*. **A.** Ensaio de atividade de β -galactosidase do promotor de *fabD* na linhagem superexpressando σ^x (ALB04::*fabD_lacZ*) e na linhagem controle (ALB01::*fabD_lacZ*). **B.** Resultado de qRT-PCR com cDNA sintetizado a partir de RNA extraído das mesmas culturas usadas na análise proteômica. Os valores mostrados no gráfico são médias de triplicatas técnicas e as barras de erro representam desvio padrão.

4.12.2. FabH3 e o operon *fabH3*-PA14_21550-PA14_21560

Ao contrário de *E. coli*, que apresenta uma única enzima condensadora do módulo de iniciação da síntese de ácidos graxos, FabH, codificada por um gene essencial (Lai e Cronan, 2003), *P. aeruginosa* apresenta pelo menos três isoformas ativas dessa enzima, codificadas pelos genes *pqsD* (PA14_51390), *fabH2* (PA14_20950) e *fabH3* (PA14_21540). PqsD catalisa uma reação de condensação na síntese de dihidroxi- e alquil-quinolinas importantes em um dos sistemas de *quorum sensing* (Pistorius *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2008). FabH2 não tem função conhecida e seu gene está localizado em um operon com um gene de proteína carreadora de acil (ACP), que é induzido em fase estacionária (Schuster *et al.*, 2003). FabH3 é responsável por iniciar a biossíntese de ácidos graxos a partir de octanoil-CoA da β -oxidação, fazendo uma ligação entre essas duas vias e permitindo a síntese de ácidos graxos de cadeia longa a partir de compostos adquiridos do ambiente (Yuan *et al.*, 2012a). Apenas essa última isoforma, FabH3, apareceu induzida na superexpressão de *sigX* e ela é codificada pelo primeiro gene em um operon contendo genes para os supostos sigma ECF PA14_21550 e

anti-sigma PA14_21560 (figura 26 A). Tanto *fabH3* quanto PA14_21550 são induzidos na superexpressão de *sigX* (figuras 25 B e 26 B, C).

Com a indução de PA14_21550, este segundo fator sigma ECF poderia estar envolvido também na expressão diferencial das proteínas detectadas na análise proteômica. Para verificar essa hipótese, a expressão de *fabH3* e outros possíveis alvos (*fabD*, *fabG* e *accD*) foi analisada na linhagem ALB02, que superexpressa o gene PA14_21550. Nenhum dos genes analisados se mostrou diferencialmente expresso em ALB02 em relação a ALB01 (figura 26 B e D). Vale lembrar que a superexpressão de PA14_21550 não causou nenhuma alteração no crescimento (figura 2) ou na morfologia celular de PA14, ao contrário de *sigX*.

As conexões entre esses dois fatores sigma ainda será alvo de investigação de nosso grupo, pois estabelece uma relação nunca descrita para fatores sigma ECF em *P. aeruginosa*, apesar de não ser possível afirmar com os dados disponíveis se σ^x atuaria diretamente na regulação do promotor do operon do qual PA14_21550 faz parte.

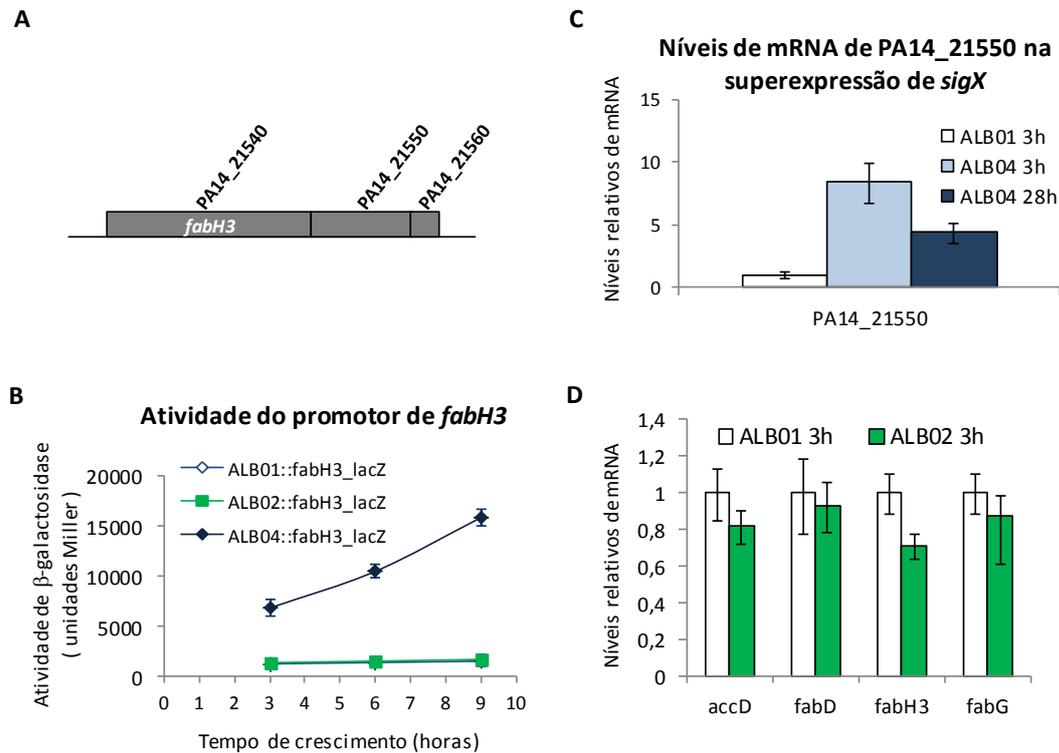


Figura 26. PA14_21550 é regulado por σ^x e não é responsável pela expressão diferencial das enzimas da via biossintética de ácidos graxos observada na análise proteômica. **A.** Contexto genômico de *fabH3*. **B.** Ensaio de atividade de β -galactosidase do promotor de *fabH3* fusionado a *lacZ* nas linhagens superexpressando PA14_21550 (ALB02::*fabH3_lacZ*) e *sigX* (ALB04::*fabH3_lacZ*). Os valores neste gráfico são médias de triplicatas biológicas e as barras de erro representam o desvio padrão. **C.** qRT-PCR de PA14_21550 na linhagem superexpressando *sigX* (ALB04). **D.** qRT-PCR dos alvos da superexpressão de *sigX* na linhagem superexpressando PA14_21550 (ALB02). Os valores mostrados em C e D são médias de triplicatas técnicas de pelo menos dois ensaios independentes e as barras de erro correspondem ao desvio padrão.

4.12.3. FabY, FabB e FabF2

Diferentemente do protótipo de *E. coli*, a reação de condensação de acetil-CoA com malonil-ACP no módulo de iniciação da síntese de ácidos graxos em *P. aeruginosa* não é catalisada por nenhuma das isoformas de FabH, mas sim por FabY, que também foi induzida na superexpressão de *sigX*. FabY apresenta no sítio catalítico a mesma tríade de aminoácidos encontrada no sítio catalítico das enzimas condensadoras do módulo de alongação, FabB e FabF (Yuan *et al.*, 2012b). FabB, induzida em 3h e 28h em ALB04, é requerida para a biossíntese de ácidos graxos insaturados (Hoang e Schweizer, 1997) e *P. aeruginosa* mutante

para FabF1 é deficiente na síntese do ácido cis-vacênico (C18:1) (Kutchma *et al.*, 1999). Apesar de FabF1 não ter sido detectada na análise proteômica, o produto de outro gene, anotado como *fabF2* no genoma de PA14, que pode codificar uma 3-oxoacil-(ACP)-sintase II alternativa, sem função caracterizada, também aparece induzido na superexpressão de *sigX*.

Uma vez que isoformas de FabG, FabH e FabF induzidas neste trabalho não parecem ser as enzimas principais da síntese constitutiva de ácidos graxos, foi levantada a hipótese de que σ^x regularia uma rota alternativa na via de síntese de ácidos graxos, ajustando sua composição em resposta a um sinal ainda não elucidado. Entretanto, não podemos descartar a hipótese de que os genes codificando as supostas enzimas constitutivas da via também não foram induzidos, mas não detectados na análise proteômica por limitações da técnica.

4.12.4. Outras proteínas induzidas na superexpressão de *sigX*

Continuando a via de biossíntese de ácidos graxos, a NADH enoil-(ACP) redutase FabV também apareceu induzida na superexpressão de *sigX*. Essa enzima é estruturalmente distinta da isoforma bem caracterizada FabI (Heath e Rock, 1995), sendo 60% maior que esta última e foi descoberta em *Vibrio cholerae*, *P. aeruginosa* e *Burkholderia mallei* durante estudos com mutantes resistentes a um inibidor de FabI (Lu e Tonge, 2010; Massengo-Tiasse e Cronan, 2008; Zhu *et al.*, 2010). *fabV* não apresenta nenhuma inserção de transposon na biblioteca de mutantes PA14NR (Liberati *et al.*, 2006).

Outras duas proteínas induzidas na superexpressão de σ^x atuam no metabolismo de ácidos graxos ou em outras vias nas quais lipídeos estão envolvidos. A lipoil sintase, codificada pelo gene *lis* (PA14_12130), catalisa a inserção de dois átomos de enxofre em uma proteína carreadora de acil (ACP) ligada a um grupo octanoil para gerar um grupo lipoil, que participa do metabolismo de ácido lipóico e de várias outras vias metabólicas (Hayden *et al.*, 1992; Vanden Boom *et al.*, 1991). Outra proteína induzida foi KdsA, codificada por um

operon responsável pela biossíntese do 3-desoxi-D-manose ácido octulosônico (Kdo) (Walsh *et al.*, 1999), o primeiro açúcar da região interna do cerne do lipopolissacarídeo, a qual é de extrema importância para a integridade da membrana externa (Hancock, 1998; Rick e Osborn, 1977; Schnaitman e Klena, 1993).

Chamou ainda à atenção em ALB04 3h, a indução de 19,5 vezes de uma cisteína sintase, codificada por PA14_29110. O conteúdo de cisteína das demais proteínas induzidas na superexpressão de *sigX* não é grande o suficiente para justificar esse grande aumento da cisteína sintase e o que se encontra na literatura a respeito dessa enzima em *E. coli* não pode ser relacionado com os fenótipos observados na superexpressão de *sigX* ou com a indução das demais proteínas da nossa análise (Levy e Danchin, 1988; Quadroni *et al.*, 1996).

4.13. Proteínas induzidas nas células recuperadas

A maioria das proteínas induzidas no conjunto das células recuperadas (ALB04 após 28 horas de indução), onde poderia conter um possível regulador negativo para σ^x , trata-se de proteínas constitutivas, necessárias para o crescimento celular, comuns de fase exponencial de crescimento (Tabela 6). A repressão das proteínas de biossíntese de piocianina PhzF e PhzD na superexpressão de *sigX* e sua indução nas células recuperadas concordam com o fenótipo observado durante o crescimento de ALB04, que só adquire a coloração verde-azulada atribuída à piocianina durante a recuperação do crescimento (não mostrado). O produto de *lasB*, que assim como os genes *phz*, é regulado por *quorum sensing* (revisado por Jimenez *et al.*, 2012), também foi induzido nas células recuperadas.

Embora já tenha sido relatado em *P. aeruginosa* PAO1 o envolvimento de σ^x com a expressão de *oprF* (Brinkman *et al.*, 1999; Bouffartigues *et al.*, 2012), surpreendentemente, na nossa análise proteômica, OprF não apareceu induzida nas células superexpressando σ^x , o que exclui a superexpressão de OprF como causa dos fenótipos alterados observados em

ALB04. Pelo contrário, OprF apareceu induzida nas células de ALB04 recuperadas, quando mal se pode detectar σ^x , sugerindo juntamente com os dados de expressão de *oprF* (figuras 12, 16 e 17), um papel negativo da superexpressão de σ^x em OprF nos níveis de RNA e proteína em PA14.

4.14. Composição de ácidos graxos e fluidez da membrana de ALB01 e ALB04

A análise dos ácidos graxos totais de culturas com quatro horas de crescimento e indução, na forma de seus metil ésteres (FAME), representada na figura 27 A, mostrou que os ácidos hexadecanoico (C16) e octadecenoico (C18:1) foram os dois compostos de maior abundância tanto em ALB01, quanto em ALB04. A quantidade relativa de ácido hexadecanoico mostrou-se maior em ALB04 que em ALB01. Quantidades menores de ácido hexadecenoico (C16:1) também foram detectadas em ambas as culturas, em uma proporção maior em ALB04 que em ALB01. Assim, pode-se notar que ALB04 apresenta uma maior proporção de ácidos graxos de cadeia curta, quando comparado a ALB01, o que concorda com o resultado da análise de anisotropia, que mostra um aumento na fluidez da membrana de ALB04 (figura 26 B). A quantidade de ácido octadecenoico mostrou-se levemente diminuída, coerente com o leve aumento de ácido hexadecenoico, já que em *E.coli* esta última espécie é convertida na primeira em uma reação dependente de FabF1 (Garwin *et al.*, 1980), que não apareceu induzida na nossa análise proteômica.

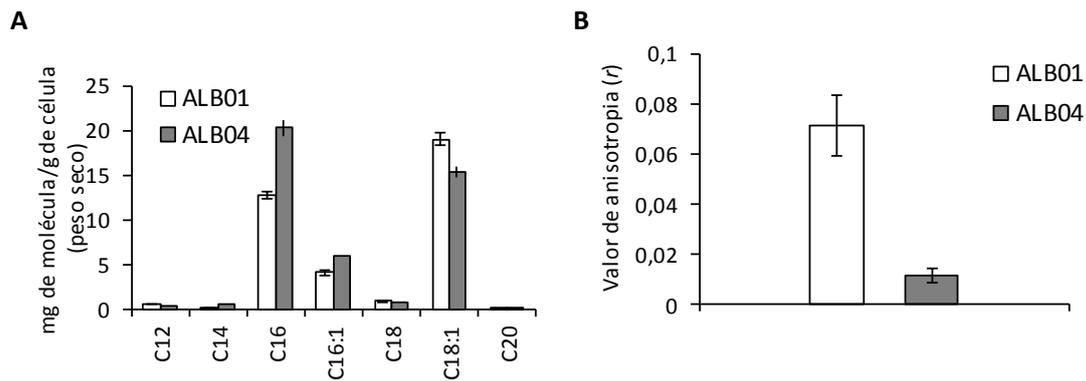


Figura 27. ALB04 apresenta uma maior proporção de ácidos graxos de cadeia mais curta e sua membrana é mais fluida, comparada a ALB01. A. Análise dos metil ésteres de ácidos graxos derivados de células inteiras de ALB01 e ALB04. **B.** Ensaio de anisotropia, onde o menor valor corresponde a uma menor organização da membrana, portanto maior fluidez.

O ajuste da composição lipídica de membranas é um mecanismo comum de adaptação celular ao ambiente em modificação. Em *P. aeruginosa*, a inativação de *lptA* (codificando uma aciltransferase de ácido lisofosfatídico) leva ao aumento da proporção de ácidos graxos de cadeia longa (C18) nos fosfolípidos de membrana, diminuindo a fluidez da mesma. Tal alteração é suficiente para ativar a expressão de um grande número de genes, entre eles *relA* e aqueles envolvidos em *quorum sensing*, resultando na produção das moléculas de sinalização acil homoserina lactonas (AHL) independentemente da densidade celular, estresse ambiental ou privação de nutrientes (Baysse *et al.*, 2005). Já é bem estabelecido que *P. aeruginosa* e outras bactérias Gram-negativas podem modular a razão de ácidos graxos saturados/insaturados em resposta a variações de temperatura durante o crescimento (de Mendoza *et al.*, 1982; Dubois-Brissonnet *et al.*, 2000; Garwin *et al.*, 1980). Em *E. coli*, a expressão de muitos genes regulatórios, como o operon principal de síntese de flagelo e o RNA antisenso *micF*, que regula a expressão da porina OmpF, é afetada por mudanças na composição da membrana fosfolipídica (Inoue *et al.*, 1997). Em *Bacillus subtilis*, a superexpressão de σ^w reduz a fluidez de membrana por regular inversamente FabHa e FabF, as enzimas condensadoras responsáveis, respectivamente, pela iniciação e alongação na biossíntese de ácidos graxos. Nessa bactéria Gram-positiva, tanto FabHa quanto FabHb, ao

contrário de FabH de *E.coli*, utilizam como substrato acil-CoA de cadeia ramificada proveniente de aminoácidos. Entretanto, FabHb tem, comparado a FabHa, uma maior afinidade por acetil-CoA, que origina cadeias não ramificadas de ácidos graxos. A repressão de FabHa resulta em uma atividade compensatória da isoforma FabHb, levando ao aumento na proporção de ácidos graxos não ramificados na membrana de *B. subtilis*, enquanto a indução de FabF aumenta o tamanho da cadeia, ambos os efeitos levando à redução da fluidez da membrana e uma maior resistência a agentes antimicrobianos produzidos por outras espécies de *Bacillus* e detergentes (Kingston *et al.*, 2011).

5. Conclusões

A transcrição dos genes que codificam os sistemas de dois componentes PvrSR e RcsCB não é ativada pela superexpressão de nenhum dos seis fatores sigma ECF analisados neste trabalho.

A superexpressão do fator sigma ECF σ^x leva a alterações na viabilidade e morfologia celulares.

O retorno das células superexpressando *sigX* ao fenótipo selvagem coincide com o desaparecimento da proteína σ^x ao longo do crescimento e com a indução de proteínas relacionadas ao crescimento.

A transcrição de *sigX* e de *oprF* é induzida em baixas concentrações de NaCl no meio.

Em PA14, a transcrição de *oprF* não é induzida por σ^x , logo o efeito da superexpressão de *sigX* na célula não pode ser atribuído à superexpressão da porina OprF.

A transcrição de *oprF*, *cmaX* e *sigX* são parcialmente dependentes do fator sigma RpoS.

A superexpressão de σ^x induz a expressão de pelo menos onze enzimas diretamente relacionadas com a biossíntese de ácidos graxos e outras quatro relacionadas com a biossíntese de coenzimas ou outras proteínas envolvidas no metabolismo de lipídeos em *P. aeruginosa*.

Pelo menos três das enzimas induzidas pela superexpressão de *sigX* (FabH3, FabG2 e FabF2) parecem ser enzimas alternativas da via de biossíntese de ácidos graxos, sugerindo que esse fator sigma ECF ativa direta ou indiretamente uma via adaptativa, que pode resultar na habilidade da bactéria a resistir a estresses que podem perturbar sua integridade e interferir na sua sobrevivência.

A superexpressão de *sigX* leva à alteração na composição de ácidos graxos e a um aumento na fluidez da membrana, provavelmente consequência da indução das enzimas consideradas “alternativas” na biossíntese de ácidos graxos.

σ^x regula positivamente a transcrição de PA14_21550, outro provável fator sigma ECF, sugerindo uma cascata de regulação de fatores sigma, de acordo com a hierarquia RpoS- σ^x -PA14_21550.

Todos os efeitos observados nas células superexpressando *sigX* não são consequência da superexpressão de PA14_21550, pois esta sozinha na linhagem ALB02 não leva aos fenótipos observados em ALB04, nem à indução da transcrição de *accD*, *fabD*, *fabH3* e *fabG* induzidos na superexpressão de *sigX*.

O conjunto de dados aqui apresentados descreve pela primeira vez o papel de um fator sigma ECF na regulação da biossíntese de ácidos graxos em *P. aeruginosa*.

6. Referências

- Ades, S.E. (2004). Control of the alternative sigma factor sigmaE in *Escherichia coli*. *Curr Opin Microbiol* 7, 157-162.
- Ades, S.E. (2008). Regulation by destruction: design of the σ^E envelope stress response. *Current Opinion in Microbiology* 11, 535-540.
- Alba, B.M., and Gross, C.A. (2004). Regulation of the *Escherichia coli* sigma-dependent envelope stress response. *Molecular microbiology* 52, 613-619.
- Albanesi, D., Reh, G., Guerin, M.E., Schaeffer, F., Debarbouille, M., Buschiazzi, A., Schujman, G.E., de Mendoza, D., and Alzari, P.M. (2013). Structural basis for feed-forward transcriptional regulation of membrane lipid homeostasis in *Staphylococcus aureus*. *PLoS pathogens* 9, e1003108.
- An, D., Apidianakis, Y., Boechat, A.L., Baldini, R.L., Goumnerov, B.C., and Rahme, L.G. (2009). The Pathogenic Properties of a Novel and Conserved Gene Product, KerV, in Proteobacteria. *PloS one* 4, e7167.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K., eds. (1996). *Current Protocols in Molecular Biology* (New York: John Wiley and Sons).
- Azghani, A.O., Idell, S., Bains, M., and Hancock, R.E. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F is an adhesin in bacterial binding to lung epithelial cells in culture. *Microbial pathogenesis* 33, 109-114.
- Badaoui Najjar, M., Chikindas, M., and Montville, T.J. (2007). Changes in *Listeria monocytogenes* membrane fluidity in response to temperature stress. *Applied and environmental microbiology* 73, 6429-6435.
- Banin, E., Vasil, M.L., and Greenberg, E.P. (2005). Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 11076-11081.
- Battesti, A., Majdalani, N., and Gottesman, S. (2011). The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol* 65, 189-213.
- Baysse, C., Cullinane, M., Denervaud, V., Burrowes, E., Dow, J.M., Morrissey, J.P., Tam, L., Trevors, J.T., and O'Gara, F. (2005). Modulation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* through alteration of membrane properties. *Microbiology* 151, 2529-2542.
- Beare, P.A., For, R.J., Martin, L.W., and Lamont, I.L. (2003). Siderophore-mediated cell signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: divergent pathways regulate virulence factor production and siderophore receptor synthesis. *Molecular microbiology* 47, 195-207.
- Bi, H., Christensen, Q.H., Feng, Y., Wang, H., and Cronan, J.E. (2012). The *Burkholderia cenocepacia* BDSF quorum sensing fatty acid is synthesized by a bifunctional crotonase homologue having both dehydratase and thioesterase activities. *Molecular microbiology* 83, 840-855.

Boechat, A.L. (2008). Regulação da expressão da fímbria CupD por sistemas de dois componentes de *Pseudomonas aeruginosa* PA14 e ensaios de virulência no hospedeiro-modelo *Dictyostelium discoideum*

In Departamento de Bioquímica (São Paulo, Universidade de São Paulo), p. 59.

Bouffartigues, E., Gicquel, G., Bazire, A., Bains, M., Maillot, O., Vieillard, J., Feuilloley, M.G., Orange, N., Hancock, R.E., Dufour, A., *et al.* (2012). The transcription for the OprF porin of *Pseudomonas aeruginosa* is mainly dependent on the SigX sigma factor and is sucrose-induced. *Journal of bacteriology*.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254.

Braun, V., and Mahren, S. (2005). Transmembrane transcriptional control (surface signalling) of the *Escherichia coli* Fec type. *FEMS microbiology reviews* 29, 673-684.

Braun, V., Mahren, S., and Sauter, A. (2006). Gene regulation by transmembrane signaling. *Biometals* 19, 103-113.

Bredenbruch, F., Nimtz, M., Wray, V., Morr, M., Muller, R., and Haussler, S. (2005). Biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines. *Journal of bacteriology* 187, 3630-3635.

Brinkman, F.S., Schoofs, G., Hancock, R.E., and De Mot, R. (1999). Influence of a putative ECF sigma factor on expression of the major outer membrane protein, OprF, in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of bacteriology* 181, 4746-4754.

Brooks, B.E., and Buchanan, S.K. (2008). Signaling mechanisms for activation of extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Biochimica et biophysica acta* 1778, 1930-1945.

Campbell, E.A., Westblade, L.F., and Darst, S.A. (2008). Regulation of bacterial RNA polymerase sigma factor activity: a structural perspective. *Curr Opin Microbiol* 11, 121-127.

Cao, H., Krishnan, G., Goumnerov, B., Tsongalis, J., Tompkins, R., and Rahme, L.G. (2001). A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 14613-14618.

Chan, D.I., and Vogel, H.J. (2010). Current understanding of fatty acid biosynthesis and the acyl carrier protein. *The Biochemical journal* 430, 1-19.

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

Choi, K.H., Gaynor, J.B., White, K.G., Lopez, C., Bosio, C.M., Karkhoff-Schweizer, R.R., and Schweizer, H.P. (2005). A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system. *Nat Methods* 2, 443-448.

Choi, K.H., Heath, R.J., and Rock, C.O. (2000). beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) is a determining factor in branched-chain fatty acid biosynthesis. *Journal of bacteriology* 182, 365-370.

- Choi, K.H., Kumar, A., and Schweizer, H.P. (2006). A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *J Microbiol Methods* 64, 391-397.
- Choi, K.H., and Schweizer, H.P. (2006). mini-Tn7 insertion in bacteria with single *attTn7* sites: example *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Protoc* 1, 153-161.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., and Greenberg, E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318-1322.
- Cronan, J.E. (1996). Biosynthesis of membrane lipids. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, F.C.N. (ed.), ed. (Washington, DC.), pp. 612-636.
- Davis, M.S., Solbiati, J., and Cronan, J.E., Jr. (2000). Overproduction of acetyl-CoA carboxylase activity increases the rate of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* 275, 28593-28598.
- de Mendoza, D., Garwin, J.L., and Cronan, J.E., Jr. (1982). Overproduction of cis-vaccenic acid and altered temperature control of fatty acid synthesis in a mutant of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 151, 1608-1611.
- Deretic, V., Martin, D.W., Schurr, M.J., Mudd, M.H., Hibler, N.S., Curcic, R., and Boucher, J.C. (1993). Conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechnology (N Y)* 11, 1133-1136.
- Déziel, E., Gopalan, S., Tampakaki, A.P., Lepine, F., Padfield, K.E., Saucier, M., Xiao, G., and Rahme, L.G. (2005). The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting *lasRI*, *rhlRI* or the production of N-acyl-L-homoserine lactones. *Molecular microbiology* 55, 998-1014.
- Dubois-Brissonnet, F., Malgrange, C., Guerin-Mechin, L., Heyd, B., and Leveau, J.Y. (2000). Effect of temperature and physiological state on the fatty acid composition of *Pseudomonas aeruginosa*. *International journal of food microbiology* 55, 79-81.
- Dufour, Y.S., Landick, R., and Donohue, T.J. (2008). Organization and evolution of the biological response to singlet oxygen stress. *Journal of molecular biology* 383, 713-730.
- Firoved, A.M., and Deretic, V. (2003). Microarray analysis of global gene expression in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 185, 1071-1081.
- Fito-Boncompagni, L., Chapalain, A., Bouffartigues, E., Chaker, H., Lesouhaitier, O., Gicquel, G., Bazire, A., Madi, A., Connil, N., Veron, W., *et al.* (2010). Full virulence of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprF. *Infection and immunity* 79, 1176-1186.
- Fujita, M., Tanaka, K., Takahashi, H., and Amemura, A. (1994). Transcription of the principal sigma-factor genes, *rpoD* and *rpoS*, in *Pseudomonas aeruginosa* is controlled according to the growth phase. *Molecular microbiology* 13, 1071-1077.
- Gago, G., Diacovich, L., Arabolaza, A., Tsai, S.C., and Gramajo, H. (2011). Fatty acid biosynthesis in actinomycetes. *FEMS microbiology reviews* 35, 475-497.

- Garwin, J.L., Klages, A.L., and Cronan, J.E., Jr. (1980). Beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase II of *Escherichia coli*. Evidence for function in the thermal regulation of fatty acid synthesis. *The Journal of biological chemistry* 255, 3263-3265.
- Gotoh, N., Wakebe, H., Yoshihara, E., Nakae, T., and Nishino, T. (1989). Role of protein F in maintaining structural integrity of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane. *Journal of bacteriology* 171, 983-990.
- Govan, J.R., and Deretic, V. (1996). Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiological reviews* 60, 539-574.
- Hancock, R.E. (1998). Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 27 Suppl 1, S93-99.
- Hancock, R.E., Irvin, R.T., Costerton, J.W., and Carey, A.M. (1981). *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane: peptidoglycan-associated proteins. *Journal of bacteriology* 145, 628-631.
- Hassett, D.J., Cuppoletti, J., Trapnell, B., Lyman, S.V., Rowe, J.J., Yoon, S.S., Hilliard, G.M., Parvatiyar, K., Kamani, M.C., Wozniak, D.J., et al. (2002). Anaerobic metabolism and quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways: rethinking antibiotic treatment strategies and drug targets. *Advanced drug delivery reviews* 54, 1425-1443.
- Hayden, M.A., Huang, I., Bussiere, D.E., and Ashley, G.W. (1992). The biosynthesis of lipoic acid. Cloning of *lip*, a lipoate biosynthetic locus of *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* 267, 9512-9515.
- He, J., Baldini, R.L., Deziel, E., Saucier, M., Zhang, Q., Liberati, N.T., Lee, D., Urbach, J., Goodman, H.M., and Rahme, L.G. (2004). The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 2530-2535.
- Heath, R.J., and Rock, C.O. (1995). Enoyl-acyl carrier protein reductase (*fabI*) plays a determinant role in completing cycles of fatty acid elongation in *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* 270, 26538-26542.
- Heath, R.J., and Rock, C.O. (1996). Roles of the FabA and FabZ beta-hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratases in *Escherichia coli* fatty acid biosynthesis. *The Journal of biological chemistry* 271, 27795-27801.
- Heath, R.J., White, S.W., and Rock, C.O. (2001). Lipid biosynthesis as a target for antibacterial agents. *Progress in lipid research* 40, 467-497.
- Heath, R.J., White, S.W., and Rock, C.O. (2002). Inhibitors of fatty acid synthesis as antimicrobial chemotherapeutics. *Applied microbiology and biotechnology* 58, 695-703.
- Helmann, J.D. (2002). The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. In *Advances in Microbial Physiology* (Academic Press), pp. 47-110.

- Hengge-Aronis, R. (2002). Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 66, 373-395, table of contents.
- Hernandez, M.E., and Newman, D.K. (2001). Extracellular electron transfer. *Cellular and molecular life sciences* : CMLS 58, 1562-1571.
- Hertz, G.Z., and Stormo, G.D. (1999). Identifying DNA and protein patterns with statistically significant alignments of multiple sequences. *Bioinformatics* 15, 563-577.
- Hoang, T.T., Karkhoff-Schweizer, R.R., Kutchma, A.J., and Schweizer, H.P. (1998). A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* 212, 77-86.
- Hoang, T.T., and Schweizer, H.P. (1997). Fatty acid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: cloning and characterization of the *fabAB* operon encoding beta-hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratase (FabA) and beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase I (FabB). *Journal of bacteriology* 179, 5326-5332.
- Hoang, T.T., and Schweizer, H.P. (1999). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* enoyl-acyl carrier protein reductase (FabI): a target for the antimicrobial triclosan and its role in acylated homoserine lactone synthesis. *Journal of bacteriology* 181, 5489-5497.
- Hoiby, N. (1993). Antibiotic therapy for chronic infection of *Pseudomonas* in the lung. *Annu Rev Med* 44, 1-10.
- Ikeno, T., Fukuda, K., Ogawa, M., Honda, M., Tanabe, T., and Taniguchi, H. (2007). Small and rough colony *Pseudomonas aeruginosa* with elevated biofilm formation ability isolated in hospitalized patients. *Microbiol Immunol* 51, 929-938.
- Inoue, K., Matsuzaki, H., Matsumoto, K., and Shibuya, I. (1997). Unbalanced membrane phospholipid compositions affect transcriptional expression of certain regulatory genes in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 179, 2872-2878.
- Ishihama, A. (2000). Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Annu Rev Microbiol* 54, 499-518.
- Jimenez, P.N., Koch, G., Thompson, J.A., Xavier, K.B., Cool, R.H., and Quax, W.J. (2012). The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 76, 46-65.
- Jordan, S.W., and Cronan, J.E., Jr. (1997). A new metabolic link. The acyl carrier protein of lipid synthesis donates lipoic acid to the pyruvate dehydrogenase complex in *Escherichia coli* and mitochondria. *The Journal of biological chemistry* 272, 17903-17906.
- Khandekar, S.S., Gentry, D.R., Van Aller, G.S., Warren, P., Xiang, H., Silverman, C., Doyle, M.L., Chambers, P.A., Konstantinidis, A.K., Brandt, M., *et al.* (2001). Identification, substrate specificity, and inhibition of the *Streptococcus pneumoniae* beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH). *The Journal of biological chemistry* 276, 30024-30030.
- Kingston, A.W., Subramanian, C., Rock, C.O., and Helmann, J.D. (2011). A sigmaW-dependent stress response in *Bacillus subtilis* that reduces membrane fluidity. *Molecular microbiology* 81, 69-79.

- Kutchma, A.J., Hoang, T.T., and Schweizer, H.P. (1999). Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* fatty acid biosynthetic gene cluster: purification of acyl carrier protein (ACP) and malonyl-coenzyme A:ACP transacylase (FabD). *Journal of bacteriology* 181, 5498-5504.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lai, C.Y., and Cronan, J.E. (2003). Beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) is essential for bacterial fatty acid synthesis. *The Journal of biological chemistry* 278, 51494-51503.
- Lamont, I.L., Beare, P.A., Ochsner, U., Vasil, A.I., and Vasil, M.L. (2002). Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 7072-7077.
- Lee, D.G., Urbach, J.M., Wu, G., Liberati, N.T., Feinbaum, R.L., Miyata, S., Diggins, L.T., He, J., Saucier, M., Deziel, E., *et al.* (2006). Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biol* 7, R90.
- Leoni, L., Orsi, N., de Lorenzo, V., and Visca, P. (2000). Functional analysis of PvdS, an iron starvation sigma factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 182, 1481-1491.
- Levy, S., and Danchin, A. (1988). Phylogeny of metabolic pathways: O-acetylserine sulphydrylase A is homologous to the tryptophan synthase beta subunit. *Molecular microbiology* 2, 777-783.
- Li, W., Stevenson, C.E., Burton, N., Jakimowicz, P., Paget, M.S., Buttner, M.J., Lawson, D.M., and Kleanthous, C. (2002). Identification and structure of the anti-sigma factor-binding domain of the disulphide-stress regulated sigma factor sigma(R) from *Streptomyces coelicolor*. *Journal of molecular biology* 323, 225-236.
- Liberati, N.T., Urbach, J.M., Miyata, S., Lee, D.G., Drenkard, E., Wu, G., Villanueva, J., Wei, T., and Ausubel, F.M. (2006). An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 2833-2838.
- Lin, S., Hanson, R.E., and Cronan, J.E. (2010). Biotin synthesis begins by hijacking the fatty acid synthetic pathway. *Nature chemical biology* 6, 682-688.
- Litman, B.J., and Barenholz, Y. (1982). Fluorescent probe: diphenylhexatriene. *Methods in enzymology* 81, 678-685.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $-2^{\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods* 25, 402-408.
- Llamas, M.A., Mooij, M.J., Sparrius, M., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Ratledge, C., and Bitter, W. (2008). Characterization of five novel *Pseudomonas aeruginosa* cell-surface signalling systems. *Molecular microbiology* 67, 458-472.
- Llamas, M.A., Sparrius, M., Kloet, R., Jimenez, C.R., Vandenbroucke-Grauls, C., and Bitter, W. (2006). The heterologous siderophores ferrioxamine B and ferrichrome activate signaling pathways in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 188, 1882-1891.

- Llamas, M.A., van der Sar, A., Chu, B.C., Sparrius, M., Vogel, H.J., and Bitter, W. (2009). A novel extracytoplasmic function (ECF) sigma factor regulates virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS pathogens* 5, e1000572.
- Lonetto, M., Gribskov, M., and Gross, C.A. (1992). The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships. *Journal of bacteriology* 174, 3843-3849.
- Lourenço, R.F., Kohler, C., and Gomes, S.L. (2011). A two-component system, an anti-sigma factor and two paralogous ECF sigma factors are involved in the control of general stress response in *Caulobacter crescentus*. *Molecular microbiology* 80, 1598-1612.
- Lu, H., and Tonge, P.J. (2010). Mechanism and inhibition of the FabV enoyl-ACP reductase from *Burkholderia mallei*. *Biochemistry* 49, 1281-1289.
- Lu, Y.J., Zhang, Y.M., and Rock, C.O. (2004). Product diversity and regulation of type II fatty acid synthases. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 82, 145-155.
- Lyczak, J.B., Cannon, C.L., and Pier, G.B. (2002). Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 15, 194-222.
- Mahajan-Miklos, S., Rahme, L.G., and Ausubel, F.M. (2000). Elucidating the molecular mechanisms of bacterial virulence using non-mammalian hosts. *Molecular microbiology* 37, 981-988.
- Martinez, M.A., Zaballa, M.E., Schaeffer, F., Bellinzoni, M., Albanesi, D., Schujman, G.E., Vila, A.J., Alzari, P.M., and de Mendoza, D. (2010). A novel role of malonyl-ACP in lipid homeostasis. *Biochemistry* 49, 3161-3167.
- Massengo-Tiasse, R.P., and Cronan, J.E. (2008). *Vibrio cholerae* FabV defines a new class of enoyl-acyl carrier protein reductase. *The Journal of biological chemistry* 283, 1308-1316.
- Mathee, K., McPherson, C.J., and Ohman, D.E. (1997). Posttranslational control of the *algT* (*algU*)-encoded sigma22 for expression of the alginate regulon in *Pseudomonas aeruginosa* and localization of its antagonist proteins MucA and MucB (AlgN). *Journal of bacteriology* 179, 3711-3720.
- Mathee, K., Narasimhan, G., Valdes, C., Qiu, X., Matewish, J.M., Koehrsen, M., Rokas, A., Yandava, C.N., Engels, R., Zeng, E., *et al.* (2008). Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 3100-3105.
- Mikkelsen, H., Ball, G., Giraud, C., and Filloux, A. (2009). Expression of *Pseudomonas aeruginosa* CupD fimbrial genes is antagonistically controlled by RcsB and the EAL-containing PvrR response regulators. *PLoS one* 4, e6018.
- Miller, J.H. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*, 2 edn (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory).
- Missiakas, D., and Raina, S. (1998). The extracytoplasmic function sigma factors: role and regulation. *Molecular microbiology* 28, 1059-1066.
- Mohd-Zain, Z., Turner, S.L., Cerdeno-Tarraga, A.M., Lilley, A.K., Inzana, T.J., Duncan, A.J., Harding, R.M., Hood, D.W., Peto, T.E., and Crook, D.W. (2004). Transferable antibiotic

resistance elements in *Haemophilus influenzae* share a common evolutionary origin with a diverse family of syntenic genomic islands. *Journal of bacteriology* *186*, 8114-8122.

More, M.I., Finger, L.D., Stryker, J.L., Fuqua, C., Eberhard, A., and Winans, S.C. (1996). Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates. *Science* *272*, 1655-1658.

Muller, M. (2002). Pyocyanin induces oxidative stress in human endothelial cells and modulates the glutathione redox cycle. *Free Radic Biol Med* *33*, 1527-1533.

Nestorovich, E.M., Sugawara, E., Nikaido, H., and Bezrukov, S.M. (2006). *Pseudomonas aeruginosa* porin OprF: properties of the channel. *The Journal of biological chemistry* *281*, 16230-16237.

Newman, J.R., and Fuqua, C. (1999). Broad-host-range expression vectors that carry the L-arabinose-inducible *Escherichia coli* *araBAD* promoter and the *araC* regulator. *Gene* *227*, 197-203.

Nicas, T.I., and Hancock, R.E. (1983). *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane permeability: isolation of a porin protein F-deficient mutant. *Journal of bacteriology* *153*, 281-285.

Nicastro, G.G. (2008). Caracterização da função e expressão de genes envolvidos com a patogenicidade de *Pseudomonas aeruginosa* PA14. In Departamento de Bioquímica (São Paulo, Universidade de São Paulo).

Nicastro, G.G., Boechat, A.L., Abe, C.M., Kaihama, G.H., and Baldini, R.L. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* PA14 *cupD* transcription is activated by the RcsB response regulator, but repressed by its putative cognate sensor RcsC. *FEMS Microbiol Letters* *301*, 115-123.

Ochsner, U.A., Johnson, Z., and Vasil, M.L. (2000). Genetics and regulation of two distinct haem-uptake systems, *phu* and *has*, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* *146* (Pt 1), 185-198.

Paget, M.S., and Helmann, J.D. (2003). The σ^{70} family of sigma factors. *Genome Biol* *4*.

Parsons, J.B., and Rock, C.O. (2013). Bacterial lipids: Metabolism and membrane homeostasis. *Progress in lipid research* *52*, 249-276.

Payne, D.J., Warren, P.V., Holmes, D.J., Ji, Y., and Lonsdale, J.T. (2001). Bacterial fatty-acid biosynthesis: a genomics-driven target for antibacterial drug discovery. *Drug discovery today* *6*, 537-544.

Pistorius, D., Ullrich, A., Lucas, S., Hartmann, R.W., Kazmaier, U., and Muller, R. (2011). Biosynthesis of 2-Alkyl-4(1H)-quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*: potential for therapeutic interference with pathogenicity. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* *12*, 850-853.

Quadroni, M., Staudenmann, W., Kertesz, M., and James, P. (1996). Analysis of global responses by protein and peptide fingerprinting of proteins isolated by two-dimensional gel electrophoresis. Application to the sulfate-starvation response of *Escherichia coli*. *European journal of biochemistry / FEBS* *239*, 773-781.

- Raetz, C.R., Reynolds, C.M., Trent, M.S., and Bishop, R.E. (2007). Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. *Annual review of biochemistry* 76, 295-329.
- Rahme, L.G., Stevens, E.J., Wolfort, S.F., Shao, J., Tompkins, R.G., and Ausubel, F.M. (1995). Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* 268, 1899-1902.
- Rick, P.D., and Osborn, M.J. (1977). Lipid A mutants of *Salmonella typhimurium*. Characterization of a conditional lethal mutant in 3-deoxy-D-mannooctulosonate-8-phosphate synthetase. *The Journal of biological chemistry* 252, 4895-4903.
- Rock, C.O., and Jackowski, S. (2002). Forty years of bacterial fatty acid synthesis. *Biochemical and biophysical research communications* 292, 1155-1166.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., eds. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory).
- Schnaitman, C.A., and Klena, J.D. (1993). Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiological reviews* 57, 655-682.
- Schuster, M., Hawkins, A.C., Harwood, C.S., and Greenberg, E.P. (2004). The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing. *Molecular microbiology* 51, 973-985.
- Schuster, M., Lostroh, C.P., Ogi, T., and Greenberg, E.P. (2003). Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *Journal of bacteriology* 185, 2066-2079.
- Schweizer, E., and Hofmann, J. (2004). Microbial type I fatty acid synthases (FAS): major players in a network of cellular FAS systems. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 68, 501-517.
- Shinitzky, M., and Barenholz, Y. (1978). Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization. *Biochimica et biophysica acta* 515, 367-394.
- Simon, R., Priefer, U., and Puhler, A. (1983). A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Biotechnology (N Y)* 1, 784-790.
- Singh, P.K., Schaefer, A.L., Parsek, M.R., Moninger, T.O., Welsh, M.J., and Greenberg, E.P. (2000). Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* 407, 762-764.
- Smith, S. (1994). The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. *FASEB journal* : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 8, 1248-1259.
- Smith, S., Witkowski, A., and Joshi, A.K. (2003). Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. *Progress in lipid research* 42, 289-317.
- Staron, A., Sofia, H.J., Dietrich, S., Ulrich, L.E., Liesegang, H., and Mascher, T. (2009). The third pillar of bacterial signal transduction: classification of the extracytoplasmic function (ECF) sigma factor protein family. *Molecular microbiology* 74, 557-581.

- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warren, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., *et al.* (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* *406*, 959-964.
- Straatsma, T.P., and Soares, T.A. (2009). Characterization of the outer membrane protein OprF of *Pseudomonas aeruginosa* in a lipopolysaccharide membrane by computer simulation. *Proteins* *74*, 475-488.
- Tehlivets, O., Scheuringer, K., and Kohlwein, S.D. (2007). Fatty acid synthesis and elongation in yeast. *Biochimica et biophysica acta* *1771*, 255-270.
- Val, D.L., and Cronan, J.E., Jr. (1998). In vivo evidence that S-adenosylmethionine and fatty acid synthesis intermediates are the substrates for the LuxI family of autoinducer synthases. *Journal of bacteriology* *180*, 2644-2651.
- Vanden Boom, T.J., Reed, K.E., and Cronan, J.E., Jr. (1991). Lipoic acid metabolism in *Escherichia coli*: isolation of null mutants defective in lipoic acid biosynthesis, molecular cloning and characterization of the *E. coli lip* locus, and identification of the lipoylated protein of the glycine cleavage system. *Journal of bacteriology* *173*, 6411-6420.
- Visca, P., Leoni, L., Wilson, M.J., and Lamont, I.L. (2002). Iron transport and regulation, cell signalling and genomics: lessons from *Escherichia coli* and *Pseudomonas*. *Molecular microbiology* *45*, 1177-1190.
- Wagner, V.E., Frelinger, J.G., Barth, R.K., and Iglewski, B.H. (2006). Quorum sensing: dynamic response of *Pseudomonas aeruginosa* to external signals. *Trends Microbiol* *14*, 55-58.
- Walsh, A.G., Burrows, L.L., and Lam, J.S. (1999). Genetic and biochemical characterization of an operon involved in the biosynthesis of 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS microbiology letters* *173*, 27-33.
- White, S.W., Zheng, J., Zhang, Y.M., and Rock (2005). The structural biology of type II fatty acid biosynthesis. *Annual review of biochemistry* *74*, 791-831.
- Winsor, G.L., Lam, D.K., Fleming, L., Lo, R., Whiteside, M.D., Yu, N.Y., Hancock, R.E., and Brinkman, F.S. (2011). *Pseudomonas* Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes. *Nucleic Acids Res* *39*, D596-600.
- Wosten, M.M. (1998). Eubacterial sigma-factors. *FEMS microbiology reviews* *22*, 127-150.
- Wu, L., Estrada, O., Zaborina, O., Bains, M., Shen, L., Kohler, J.E., Patel, N., Musch, M.W., Chang, E.B., Fu, Y.-X., *et al.* (2005). Recognition of host immune activation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* *309*, 774-777.
- Yao, J., and Rock, C.O. (2013). Phosphatidic acid synthesis in bacteria. *Biochimica et biophysica acta* *1831*, 495-502.
- Yoon, S.S., Hennigan, R.F., Hilliard, G.M., Ochsner, U.A., Parvatiyar, K., Kamani, M.C., Allen, H.L., DeKievit, T.R., Gardner, P.R., Schwab, U., *et al.* (2002). *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis. *Developmental cell* *3*, 593-603.

- Yuan, Y., Leeds, J.A., and Meredith, T.C. (2012a). *Pseudomonas aeruginosa* directly shunts beta-oxidation degradation intermediates into de novo fatty acid biosynthesis. *Journal of bacteriology* *194*, 5185-5196.
- Yuan, Y., Sachdeva, M., Leeds, J.A., and Meredith, T.C. (2012b). Fatty acid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is initiated by the FabY class of beta-ketoacyl acyl carrier protein synthases. *Journal of bacteriology* *194*, 5171-5184.
- Zhang, Y.M., Frank, M.W., Zhu, K., Mayasundari, A., and Rock, C.O. (2008). PqsD is responsible for the synthesis of 2,4-dihydroxyquinoline, an extracellular metabolite produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of biological chemistry* *283*, 28788-28794.
- Zhang, Y.M., and Rock, C.O. (2009). Transcriptional regulation in bacterial membrane lipid synthesis. *Journal of lipid research* *50 Suppl*, S115-119.
- Zhang, Y.M., White, S.W., and Rock, C.O. (2006). Inhibiting bacterial fatty acid synthesis. *The Journal of biological chemistry* *281*, 17541-17544.
- Zhu, K., Choi, K.H., Schweizer, H.P., Rock, C.O., and Zhang, Y.M. (2006). Two aerobic pathways for the formation of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular microbiology* *60*, 260-273.
- Zhu, K., and Rock, C.O. (2008). RhlA converts beta-hydroxyacyl-acyl carrier protein intermediates in fatty acid synthesis to the beta-hydroxydecanoyl-beta-hydroxydecanoate component of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* *190*, 3147-3154.
- Zhu, L., Lin, J., Ma, J., Cronan, J.E., and Wang, H. (2010). Triclosan resistance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 is due to FabV, a triclosan-resistant enoyl-acyl carrier protein reductase. *Antimicrob Agents Chemother* *54*, 689-698.

SÚMULA CURRICULAR

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Ana Laura Boechat Borges

Local e data de nascimento: Belo Horizonte – MG, 22 de setembro de 1984

Endereço eletrônico: analaura@iq.usp.br; nalaboechat@gmail.com

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

2.1. Graduação

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes – RJ, 2006. **Graduação em Ciências Biológicas (Bacharelado).**

2.1.1. Estágios de iniciação científica

Inibidores de crescimento de cianobactérias tóxicas. Realizado no Laboratório de Biotecnologia (LBT), Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes – RJ. Abril de 2002 a março de 2005. Orientadora: professora Dr^a Denise Saraiva Dagnino.

Análise parcial do acúmulo de H₂O₂ e da atividade de enzimas antioxidantes em resposta ao fermento mecânico em folhas de maracujá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*). Trabalho de conclusão de curso. Realizado no Laboratório de Biotecnologia (LBT), Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes – RJ. Março de 2005 a março de 2006. Orientadora: professora Dr^a Tania Jacinto Freitas da Silva. **Trabalho de conclusão de curso.**

2.2. Pós-graduação

Mestrado em Ciências (Bioquímica)

Regulação da expressão da fímbria CupD por sistemas de dois componentes de *Pseudomonas aeruginosa* PA14 e ensaios de virulência no hospedeiro-modelo *Dictyostelium discoideum*. Realizado no Departamento de Bioquímica, Instituto de Química,

Universidade de São Paulo, São Paulo – SP. Agosto de 2006 a outubro de 2008, sob orientação da professora Dr^a Regina Lúcia Baldini. Bolsa FAPESP.

2.2.1. Monitoria

Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE), Departamento de Bioquímica, USP, de março a julho de 2008. Disciplina QBQ0215- Bioquímica: Estrutura de Biomoléculas e Metabolismo, sob a supervisão da Profa. Dra. Clélia Ferreira Terra.

3. OCUPAÇÃO

Bolsista de doutorado:

- CAPES, de novembro de 2008 a maio de 2009.
- FAPESP, de junho de 2009 a outubro de 2012.

4. PUBLICAÇÕES

4.1. Artigos completos em periódicos

Nicastro, G.G.*, **Boechat, A.L.***, Abe, C.M., Kaihami, G.H., and Baldini, R.L. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* PA14 *cupD* transcription is activated by the RcsB response regulator, but repressed by its putative cognate sensor RcsC. FEMS Microbiol Letters 301, 115-123.

An, D., Apidianakis, Y., **Boechat, A.L.**, Baldini, R.L., Goumnerov, B.C., and Rahme, L.G. (2009). The Pathogenic Properties of a Novel and Conserved Gene Product, KerV, in Proteobacteria. PloS one 4, e7167.

Zimmer, K.R., Macedo, A.J., Giordani, R.B., Conceicao, J.M., Nicastro, G.G., **Boechat, A.L.**, Baldini, R.L., Abraham, W.R., and Termignoni, C. (2013). A steroidal molecule present in the egg wax of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* inhibits bacterial biofilms. Environ Microbiol (Print) 15, p. n/a-n/a; Meio de divulgação: Digital. Homepage; Série: 1; ISSN/ISBN: 14622912.

4.2. Manuscrito em preparação

Boechat, A.L.; Kaihami, G.H.; Politi, M.J.; Lépine, F.; Baldini, R.L. (2013). A novel role for an ECF sigma factor in fatty acid biosynthesis and membrane fluidity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Em preparação*.

4.3. Resumos em congressos

Boechat, A.L.; Baldini, R.L. Regulation of OprF expression in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *In: 4th ASM Conference on Prokaryotic Cell Biology and Development, 2012, Montreal.*

Boechat, A.L.; Baldini, R.L. O fator sigma extracitoplasmático SigX regula a biossíntese de ácidos graxos em *Pseudomonas aeruginosa* *In: II Congresso Institucional do Instituto de Química, 2012, Guarujá.*

Boechat, A.L.; Baldini, R.L. Overexpression of an ECF sigma factor results in biphasic growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *In: 4th Congress of European Microbiologists, 2011, Genebra.*

Zimmer, K.R.; Macedo, A.J.; Giordani, R.B.; Conceição, J.M.; Nicastro, G.G.; **Boechat, A.L.;** Baldini, R.L.; Abraham, W.R.; Termignoni, C. Anti-biofilm effect of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* egg wax against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. *In: XXI ALAM Congresso Latino-Americano de Microbiologia, 2011, Santos.*
Menção honrosa durante o XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia (XXI ALAM).

Zimmer, K.R.; Giordani, R.B.; Nicastro, G.G.; **Boechat, A.L.;** Baldini, R.L.; Macedo, A.J.; Termignoni, C. Modulation of bacterial biofilms by compounds obtained from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* eggs. *In: 3rd Brazilian Conference on Natural Products (3rd BCNP), 2011, Ouro Preto.*

Boechat, A.L.; Baldini, R. L. Busca por sinais para a indução da expressão da fímbria CupD de *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *In: 56º Congresso Brasileiro de Genética e 27ª Reunião de*

Genética de Microrganismos, 2010, Guarujá. **Trabalho premiado com menção honrosa (categoria Painel Pós-graduação, Genética de Microrganismos)**

Nicastro, G.G.; **Boechat, A.L.**; Baldini, R.L. *Pseudomonas aeruginosa cupD* fimbrial genes in PAPI-1 are regulated by the RcsCB phosphorelay system. In: XXXVIII Annual Meeting of SBBq, 2009, Águas de Lindóia.

Boechat, A.L.; Nicastro, G. G.; Baldini, R. L. Regulação da expressão da fímbria CupD por sistemas de dois componentes localizados na ilha de patogenicidade PAPI-1 de *Pseudomonas aeruginosa* PA14. In: 54º Congresso Brasileiro de Genética, e 26ª Reunião de Genética de Microrganismos, 2008, Salvador, BA.

Nicastro, G.G.; **Boechat, A.L.**; Baldini, R.L. Expressão dos genes cupD presentes na ilha de patogenicidade PAPI-1 de *Pseudomonas aeruginosa* PA14. 2007. In: 53º Congresso Brasileiro de Genética, 2007, Águas de Lindóia. **Trabalho escolhido para apresentação oral e premiado com menção honrosa (categoria Pós-graduação, Genética de Microrganismos)**

Boechat, A.L.; Baldini, R. L. Relationship among the genes in the pathogenicity island PAPI-1 of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 and determination of their role in virulence against *Dictyostelium discoideum*. In: XXXVI Annual meeting of the SBBq and 10th IUMB Conference, 2007, Salvador.

Boechat, A.L.; Nicastro, G. G.; Baldini, R. L. Expression of the putative fimbrial gene cluster *cupD* from *Pseudomonas aeruginosa* PA14 is regulated by genes present in the same pathogenicity island. In: American Society for Microbiology Conference on Pseudomonas, 2007, Seattle.

Boechat, A.L.; Botelho-Júnior, S.; Jacinto, T. Analysis of H₂O₂ accumulation and antioxidant enzymes activities in passion fruit leaves (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) in response to mechanical wound. In: XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2006, Águas de Lindóia.

Boechat, A.L.; Jacinto, T.; Machado, O.L.T. Acúmulo de H₂O₂ e alterações na atividade de enzimas antioxidantes induzidos por ferimentos mecânicos em plantas de maracujá

(*Passiflora edulis f. flavicarpa*). In: IV Reunião Técnica de Pesquisas em Maracujazeiro, 2005, Brasília.

Boechat, A.L.; Machado, OLT; Jacinto, T. Indução de H₂O₂ e da atividade peroxidásica em folhas de maracujá (*Passiflora flavicarpa*) em resposta à injúria mecânica. In: X Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal e XII Congresso Latino Americano de Fisiologia Vegetal, 2005, Recife.

Fragoso G.M.; **Boechat A.L.**; Fraga E.; Meireles D.; Dagnino D., Jacinto T. Investigation of self-inhibition in *Synechococcus* PCC 7942 and *Synechocystis* PCC 6803 cells as a mechanism of toxic bloom control. In: XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2005, Águas de Lindóia.

Fragoso, G.M.; **Boechat, A.L.**; Fraga, E.; Meireles, D.A.; Dagnino, D. Auto-regulação de crescimento em cianobactérias – alternativa para o controle de florações? In: X Reunião da Sociedade Brasileira de Ficologia, 2004, Salvador.

Boechat, A.L.; Siqueira, E.S.; Fragoso, G.M.; Fraga, E.; Porto, M. B.; Schripsema, J.; Jacinto, T.; Dagnino, D. Investigation of the occurrence of toxic strains of cyanobacteria in lagoons in the state of Rio de Janeiro. In: XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, 2003, Caxambu.

5. PRÊMIOS RECEBIDOS

2012 - Menção honrosa no XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia, Associação Latinoamericana de Microbiologia.

2010 - Menção honrosa no 56º Congresso Brasileiro de Genética, Sociedade Brasileira de Genética. Prêmio Pós-Graduação, genética de microorganismos - Painel.

2007 - Menção honrosa no 53º Congresso Brasileiro de Genética, Sociedade Brasileira de Genética. Prêmio Pós Graduação, genética de microorganismos – Oral.