

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

GILBERTO HIDEO KAIHAMI

**Novos reguladores de resposta envolvidos na
virulência de *Pseudomonas aeruginosa***

**Versão corrigida da Dissertação/Tese conforme Resolução CoPGr 5890 O
original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-US**

São Paulo
Data do Depósito na SPG:
31/01/2018

GILBERTO HIDEO KAIHAMI

**Novos reguladores de resposta envolvidos na
virulência de *Pseudomonas aeruginosa***

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

Orientadora: Profa. Dra Regina Lúcia Baldini

São Paulo
2018

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

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

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

K13n	Kaihami, Gilberto Hideo Novos reguladores de resposta envolvidos na virulência de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> / Gilberto Hideo Kaihami. - São Paulo, 2018. 129 p.
	Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica. Orientador: Baldini, Regina Lúcia
	1. PSEUDOMONAS. 2. MACRÓFAGOS. 3. VIRULÊNCIA. 4. REGULAÇÃO GÊNICA. 5. MICROBIOLOGIA. I. T. II. Baldini, Regina Lúcia, orientador.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo FAPESP nº: 2013/10385-7, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Agradeço aos meus pais Mario e Harumi por sempre me estimularem e priorizarem a minha educação. Obrigado, por me permitir estudar e perseguir os meus sonhos, sou eternamente grato por esta oportunidade.

Aos meus irmãos Ricardo e Fabio, por fazerem parte da minha vida.

À Dra. Regina Baldini, com certeza todo o período em que trabalhei com a senhora, desde a IC até o doutorado, permitiu que eu amadurecesse cientificamente e pessoalmente. Sou grato por todas as oportunidades oferecidas, e se em algum momento alguém fizer algum elogio a minha pessoa ou ao trabalho aqui realizado, com certeza o maior mérito é seu e do seu grupo, que você formou nesses últimos 13 anos, em que nove deles, com muita alegria, fiz parte.

Ao Dr. Sandro de Almeida, que desde o meu mestrado me orientou sobre ciência, permitindo que eu evoluísse na ciência. Com certeza você fez parte fundamental da minha formação.

Agradeço a todos do grupo da Dra. Regina Baldini e Dr. Sandro de Almeida: Ana Paula, Ana Laura, Diogo, Eliezer, Gian, Thayz, Duílio, Miriam, Polly, Grasi, Leandro, Zé Roberto, Suelen, Karla, Lucas, Lavinia, Daniel, Luana, Caio, Talita, Ana Luiza e Rinaldo por todos os períodos de discussão científica, trabalho e descontração são momentos que lembrarei com muito carinho, e muito além de colegas de trabalho tenho orgulho de chamá-los de amigos.

À Dr^a Suely Lopes Gomes pelo apoio e disponibilidade do espaço físico, e pelos grandes conselhos e ensinamentos.

Aos docentes que participaram da minha banca de qualificação, Dr. Shaker Chuck Farah Dr^a Deborah Schechtman e Dr^a Alexandre Bruni Cardoso, pelas críticas e sugestões.

A todos os professores que contribuíram direta ou indiretamente, porém de forma fundamental, para minha formação pessoal e acadêmica, em especial, à Dra. Iolanda Cuccovia, ao Dr. Bayardo Torres, ao Dr. Luis Eduardo Netto, à Dra. Karen Spadari Ferreira, Dra. Marilis do Valle Marques, Dra. Aline Maria da Silva, Dra. Alicia Kowaltowski, Dra. Nadja de Souza Pinto, Dra. Flavia Meotti, e o Dr. Robson Francisco de Souza.

Agradeço a todos os meus amigos da Bioquímica e da Farmácia, que me acompanharam durante essa jornada, que está somente no começo. Em especial aos Drs. Alexandre Bisson, Diorge Souza, Gianluca Nicastro, Thiberio Rangel, José Roberto de Almeida, e o M.Sc. Leandro Breda, que em muitas discussões confusas resultaram em diversos momentos de muita alegria e risadas.

Agradeço ao Dr. Lucas Ferreira da Silva e a Dra. Maira Nagai, que no meio de tantas conversas científicas ou não me ajudaram em diversos momentos durante esse trabalho. Em especial agradeço ao Lucas, por me ensinar e sempre estar disposto a ajudar e discutir sobre bioinformática, além de me apoiar e sempre incentivar a explorar um pouco mais sobre essa fascinante área.

Aos amigos Alemão, Mario (Moxila), Mauro (Boteco), Marião, Rapha, Thiago (Menudo), Luizinho, por acreditarem e apoiarem hoje e sempre.

À Sayuri por sempre estar ao meu lado em todas as minhas decisões, pelo apoio quando foi preciso, e por sempre me animar quando eu mais precisava. Não há palavras que possam descrever o carinho que sinto por você.

Por fim, a Deus.

RESUMO

Kaihami, G.H.. 2018. Novos reguladores de resposta envolvidos na virulência de *Pseudomonas aeruginosa* 129p. Tese – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Os sistemas de sinalização de dois componentes são sistemas prevalentes em bactérias, permitindo a adaptação a diferentes condições ambientais. O sistema de dois componentes classicamente possui uma proteína histidina quinase, o primeiro componente, capaz de reconhecer o estímulo ambiental e fosforilar o regulador de resposta, o segundo componente. *Pseudomonas aeruginosa* é uma proteobactéria ubíqua, capaz de infectar hospedeiros filogeneticamente distintos. Esse patógeno oportunista apresenta um dos maiores conjuntos de sistemas de dois componentes em bactérias, que permite que ela sobreviva numa grande gama de ambientes, incluindo humanos. *P. aeruginosa* UCBPP-PA14 apresenta pelo menos 64 histidina quinases e 76 reguladores de resposta codificados em seu genoma. Diversos sistemas de dois componentes já foram correlacionados com a virulência, sendo o sistema GacSA o exemplo melhor caracterizado. Há poucos estudos sistemáticos sobre o envolvimento dos reguladores de resposta na virulência de *P. aeruginosa* e os sinais que induzem a ativação dos reguladores de resposta precisam ser encontrados. Para identificar novos reguladores de resposta envolvidos na patogenicidade, infecções *in vitro* em macrófagos e *in vivo* em *Drosophila melanogaster* foram realizadas neste trabalho. Os macrófagos foram infectados com cada mutante dos reguladores de resposta ou com a linhagem selvagem, e a produção da citocina pró-inflamatória TNF- α e o *clearance* bacteriano foram determinados. Alternativamente, as moscas foram infectadas utilizando-se a estratégia de *feeding* e a sobrevivência foi verificada. Utilizando-se essas abordagens, a identificação de diversos reguladores de resposta com papel na virulência foi alcançada, além de se confirmar o papel de reguladores de resposta já estudados. Um dos novos genes envolvidos em virulência, *PA14_26570* (nomeado neste trabalho de *atvR*), codifica um regulador de resposta atípico com substituição no aspartato fosforilável para glutamato, o que usualmente induz um estado sempre ativo. Um mutante não polar em *atvR* foi construído e macrófagos infectados com a linhagem Δ *atvR* confirmaram um maior *clearance* bacteriano e maior produção de TNF- α em comparação aos macrófagos infectados com a linhagem selvagem. Para comprovar a participação de *AtvR* durante a patogênese, um modelo de pneumonia aguda em camundongos foi utilizado. Camundongos infectados com a linhagem Δ *atvR* apresentaram uma maior sobrevivência em comparação aos camundongos infectados com a linhagem selvagem. Além disso, os camundongos infectados com Δ *atvR* apresentaram menor carga bacteriana, aumento no recrutamento de neutrófilos ativados e aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IFN- γ). Utilizando-se uma abordagem transcritômica (RNA-Seq), foi determinando diversos genes são regulados positivamente na linhagem superexpressando *AtvR* em relação à linhagem controle. Dentre esses, os *clusters* de respiração anaeróbia *nar*, *nir*, *nor* e *nos* estão incluídos. Esse resultado foi confirmado por qRT-PCR e análises fenotípicas, em que a linhagem Δ *atvR* apresentou menor crescimento e expressão da nitrato redutase durante condições de hipóxia em comparação à linhagem selvagem. Em suma, neste trabalho foi demonstrado que diversos reguladores de resposta são importantes para a virulência de *P. aeruginosa* em macrófagos *in vitro* e *in vivo* em *Drosophila*, além de caracterizar o regulador de resposta atípico *AtvR*, que regula a respiração anaeróbica

por desnitrificação, permitindo que *P. aeruginosa* possa infectar e colonizar o hospedeiro com maior eficiência.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*, sistema de dois componentes, regulador de resposta, virulência, hipóxia, desnitrificação.

ABSTRACT

Kaihami, G.H.. New response regulators involved in *Pseudomonas aeruginosa* virulence, 129p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Two-component systems are widespread in bacteria, allowing the adaptation to environmental changes. A two-component system is classically composed by a sensor kinase that phosphorylates a cognate response regulator. *Pseudomonas aeruginosa* is a ubiquitous proteobacterium able to cause disease in several hosts. This opportunistic pathogen presents one of the largest sets of two-component systems known in bacteria, which certainly contributes to its ability to thrive in a wide range of environmental settings, including humans. *P. aeruginosa* UCBPP-PA14 genome codes for at least 64 sensor kinases and 76 response regulators. Some response regulators are already known to be related to virulence, with the GacSA system as the best characterized. There are no systematic studies about the involvement of *P. aeruginosa* response regulators in virulence. Moreover, the input signal that triggers the response regulator activation is yet to be uncovered for most systems. To find new response regulators involved in virulence, *in vitro* infections were carried out using macrophages. Briefly, the macrophages were infected with each response regulator mutant or the wild-type strain, the pro-inflammatory cytokine production (TNF- α) and the bacterial clearance were evaluated. Using this approach, we identified several response regulators involved in virulence, and we also confirmed the involvement of known response regulators in this process. One of the novel virulence-related response regulators, PA14_26570 (named here as AtvR), is an atypical response regulator with a substitution in the phosphorylatable aspartate to glutamate, that usually leads to an always-on state. A non-polar mutant was constructed, and macrophage infection with $\Delta atvR$ confirmed an increased bacterial clearance as well as a higher TNF- α production as compared to the wild-type strain. To ascertain the role of AtvR during the pathogenic process, an acute pneumonia model was used. Mice infected with $\Delta atvR$ showed an increased survival as compared to mice infected with the wild-type strain. In addition, $\Delta atvR$ infected mice showed reduced bacterial burden, increased neutrophil recruitment and activation, as well as increased pro-inflammatory cytokine production (TNF- α and IFN- γ). Also, using a transcriptomic approach (RNA-Seq), we showed that several genes were upregulated in the strain overexpressing AtvR. These genes include the anaerobic respiration clusters *nar*, *nir*, *nor* and *nos*. This result was confirmed by qRT-PCR and phenotypic analysis, in which $\Delta atvR$ showed reduced growth and nitrate reductase expression during hypoxic conditions as compared to the wild-type strain. In conclusion, we have demonstrated that several response regulators are important for *P. aeruginosa* virulence *in vitro*. In addition, we further characterized the atypical response regulator AtvR, which regulates anaerobic respiration via denitrification, allowing this bacterium to infect and colonize the host more efficiently.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, two component system, response regulator, virulence, hypoxia, denitrification.

SUMÁRIO

1. Introdução	11
1.1 Sistemas de dois componentes	11
1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
1.3. Modelos alternativos para o estudo de virulência	14
1.4. Sistemas de dois componentes em <i>P. aeruginosa</i>	17
2. Objetivos	28
3. Materiais e Métodos	29
3.1. Linhagens, plasmídeos e condições de cultivo.....	29
3.2. Técnicas básicas de Biologia Molecular.	29
3.3. Construção dos mutantes não polares	40
3.4. Ensaio de infecção <i>in vitro</i>	41
3.4.1. Cultura dos macrófagos.....	41
3.4.2. Ensaio de <i>clearance</i> bacteriano	41
3.4.3. Ensaio de citotoxicidade	42
3.4.4. Avaliação da secreção de TNF- α	42
3.5. Ensaio de infecção <i>in vivo</i>	43
3.5.1. Animais.....	43
3.5.2. Infecção intra-traqueal	43
3.5.3. Sobrevivência.....	44
3.5.4. Determinação do número de unidades formadoras de colônia nos órgãos após infecção	44
3.5.5. Quantificação das citocinas do pulmão	44
3.5.6. Imunofenotipagem pulmonar	45
3.6. Curva de crescimento.....	46
3.7. Análise de RNA-Seq.....	47
3.8. Quantificação da expressão gênica.	47
3.9. Hipóxia	48
3.10 qRT-PCR	48
4. Resultados e Discussão	49
4.1. Triagem de RR envolvidos na virulência de <i>P. aeruginosa</i>	49
4.2. PA14_26570, um RR atípico envolvido em virulência	59
4.2.1 Subfamília ALR (<i>aspartate-less receiver</i>) dos RR	59
4.2.2 AtvR é importante para a virulência contra macrófagos <i>in vitro</i>	63

4.2.3 AtvR é importante <i>in vivo</i>	67
4.2.4 AtvR afeta a expressão de genes relacionados a adaptação a baixa tensão de oxigênio e virulência.....	71
4.2.5 A expressão de AtvR é induzida em baixas concentrações de oxigênio e presença de nitrato.....	77
4.2.6 AtvR atua em paralelo com a via de Anr-NarXL-Dnr	79
4.2.7. Considerações	82
5. Conclusões	87
6. Referências Bibliográficas	89
7. Anexo	103
Anexo IV RNA-Seq	119
8. SÚMULA CURRICULAR	127

1. Introdução

1.1 Sistemas de dois componentes

Sistemas de dois componentes são cascatas de sinalização prevalentes em bactérias, constituindo uma forma de transdução de sinal eficiente para a percepção e a resposta adequada a alterações no ambiente. Além das bactérias, esses sistemas estão presentes também em plantas e microrganismos dos domínios Archaea e Eukarya, porém não há descrições desses sistemas em animais (Bourret, 2006), o que os torna um possível alvo para o desenvolvimento de novas drogas anti-infectivas.

A via canônica dos sistemas de dois componentes é composta por uma histidina quinase que é autofosforilada em resposta a um estímulo e transfere este grupo fosforila para um regulador de resposta (RR) cognato (**Figura 1**). Reguladores de resposta apresentam um domínio REC com a estrutura secundária $(\beta\alpha)_5$ conservada, importante para a sua atividade. O domínio REC classicamente possui resíduos críticos para a ativação do RR, que incluem um aspartato no final da terceira fita beta, que pode ser fosforilado pela histidina quinase (Bourret, 2010). Uma vez fosforilado, ocorre uma mudança conformacional no RR, geralmente tornando-o ativo e montando uma resposta celular apropriada frente ao estímulo inicial, geralmente modulando a expressão gênica (Stock *et al.*, 2000; Galperin, 2006; Gao *et al.*, 2007).

Existem variações desse protótipo, sendo a mais comum chamada de fosforelê (**Figura 1**). Nesse sistema, a proteína sensora híbrida contém tanto o domínio de histidina quinase como um ou mais domínios REC. Nestes casos, há a necessidade da participação de um módulo intermediário, o Hpt (*histidine-containing phosphotransfer*), que é capaz de mediar a transferência do grupo fosforila entre o aspartato da proteína sensora para o aspartato do RR. O módulo Hpt pode constituir um domínio da proteína sensora ou funcionar como uma proteína independente, como

no exemplo mostrado na **Figura 1**. Na ausência de sinal, a proteína sensora pode funcionar como uma fosfatase do RR, aumentando o nível de controle do sistema.

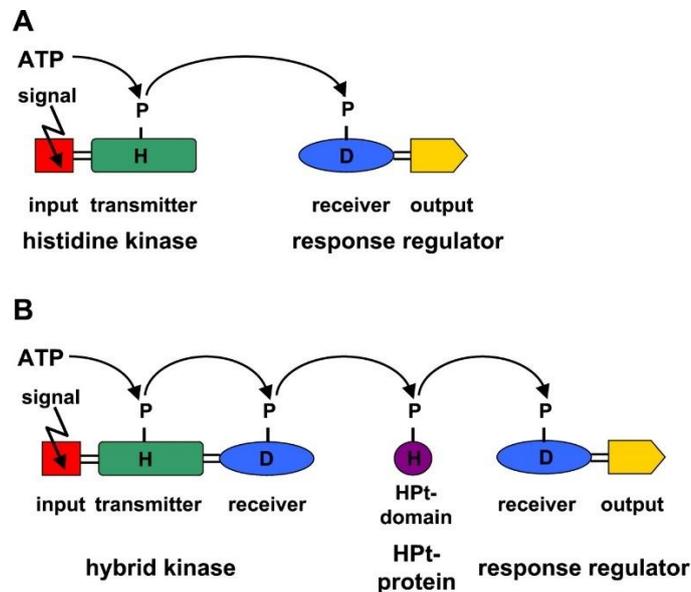


Figura 1. Sistemas de dois componentes canônicos (A) e de fosforelê (B). Em resposta a um sinal, a histidina quinase sensora é auto-fosforilada. Este grupo fosforilado é então transferido a um cognato regulador de resposta (A). Após a autofosforilação da histidina quinase híbrida, o grupo fosforilado é transferido intramolecularmente a um domínio REC, este então transfere fosforila a uma Hpt (histidine phosphotransfer), que pode fosforilar a um regulador de resposta (B). (Retirado de Lohrmann and Harter, 2002)

1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa pertence a classe das gamaproteobactérias e é capaz de metabolizar diversas fontes de carbono e nitrogênio, além de crescer tanto aeróbia como anaerobiamente. Essa ampla capacidade metabólica permite a adaptação e colonização a diferentes ambientes, como água e solo, além de atuar como um patógeno oportunista em humanos. *P. aeruginosa* é frequentemente associada a infecções em pacientes com imunossupressão, como é o caso de pacientes sob quimioterapia, portadores de fibrose cística ou queimaduras graves, além de ser de grande importância em infecções respiratórias, gastrointestinais e do trato urinário (Lyczak *et al.*, 2000; Wagner and Iglewski, 2008). As infecções

pulmonares associadas à infecção por *P. aeruginosa* apresentam uma das maiores taxas de mortalidade, em especial em pacientes sob ventilação mecânica (Gaynes *et al.*, 2005).

No pulmão, as células do sistema imune que constituem a primeira resposta frente a *P. aeruginosa* são os macrófagos residentes. A importância dos macrófagos durante a infecção pulmonar causada por *P. aeruginosa* está correlacionada com a capacidade do recrutamento de neutrófilos e com a produção de quimiocinas. A ausência dos macrófagos pulmonares resulta em neutropenia persistente neste órgão, com redução da capacidade do hospedeiro em eliminar o patógeno, confirmando a importância dos macrófagos em coordenar uma resposta imune eficiente contra *P. aeruginosa* (Kooguchi *et al.*, 1998). Foi observada uma maior produção da citocina pro-inflamatória TNF- α pelos macrófagos provenientes de camundongos resistentes à infecção em comparação aos macrófagos provenientes dos camundongos sensíveis, apesar de não haver diferenças na fagocitose (Morissette *et al.*, 1996). Esse estudo corrobora observações anteriores, em que a principal função dos macrófagos pulmonares seria como produtores de citocinas (Dunkley *et al.*, 1995). Reforçando essa hipótese, há um atraso no recrutamento de polimorfonucleares (PMN), como os neutrófilos, nos camundongos suscetíveis à infecção. Porém, quando o TNF- α foi administrado a esses animais, houve uma resposta inflamatória semelhante à dos camundongos resistentes a infecção, com um número de PMN semelhante aos camundongos resistentes à infecção (Morissette *et al.*, 1996).

As células do sistema imune inato, em especial os macrófagos, conseguem reconhecer as bactérias principalmente pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como por exemplo o lipopolissacarídeo (LPS), presente na membrana externa de bactérias gram-negativas. Esses PAMPs se ligam

aos receptores de reconhecimento padrão (PRR), como os do tipo Toll (TLRs), presentes nas células do sistema imune.

Nas infecções causadas por *P. aeruginosa*, destacam-se a flagelina e o LPS como PAMPs que são reconhecidos por TLR-5 e TLR-4, respectivamente (Raoust *et al.*, 2009). Ambos os receptores apresentam uma grande importância na imunidade contra *P. aeruginosa*, sendo que camundongos deficientes em TLR-4/5 demonstram uma maior susceptibilidade à infecção (Feuillet *et al.*, 2006; Ramphal *et al.*, 2008).

1.3. Modelos alternativos para o estudo de virulência

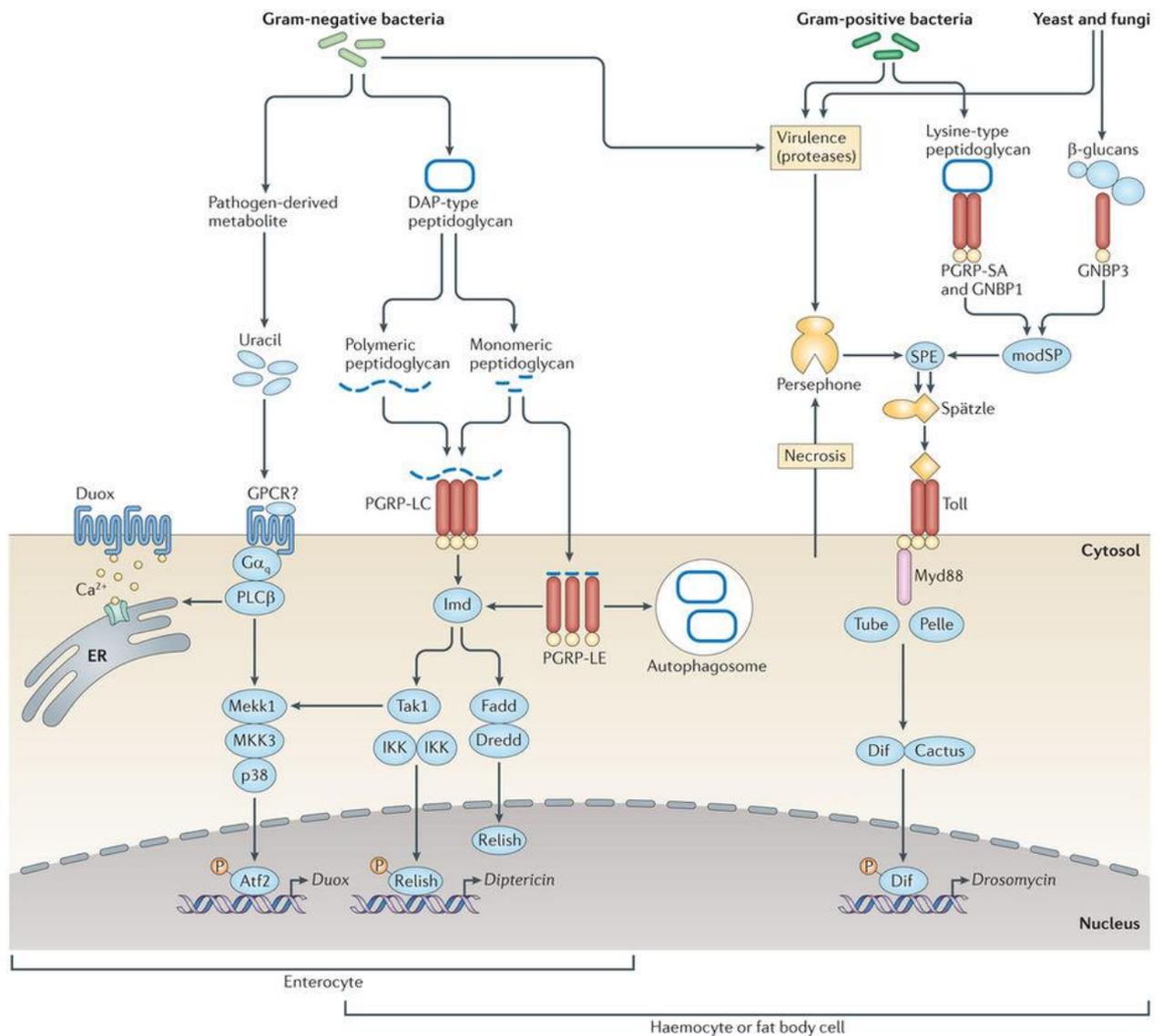
Diversos modelos alternativos já foram utilizados para identificar e compreender vias importantes tanto da bactéria patogênica como a resposta mediada pelo hospedeiro. Para o estudo da patogenicidade de *Pseudomonas aeruginosa* destacam-se os modelos de *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana*, *Danio rerio*, *Drosophila melanogaster* e *Galleria mellonella* (Rahme *et al.*, 1997; M.-W. Tan *et al.*, 1999; Jander *et al.*, 2000; D'Argenio *et al.*, 2001; Chand *et al.*, 2011).

Em particular, o estudo de *Drosophila melanogaster* é de extrema relevância para compreender a biologia de mamíferos, devido à conservação de muitas vias de transdução de sinais que controlam desde o metabolismo e desenvolvimento, como a imunidade inata (Johnston and Nüsslein-Volhard, 1992; Lemaitre and Hoffmann, 2007; Padmanabha and Baker, 2014). O amplo uso de *D. melanogaster* para elucidar a interação patógeno-hospedeiro deve-se à ampla homologia entre diversos órgãos da *Drosophila* em comparação com humanos. Além da facilidade de manutenção e manuseio desse organismo, diversas ferramentas genéticas estão disponíveis, permitindo ensaios em larga escala para identificar genes importantes para a virulência do patógeno a fim de compreender quais as vias e proteínas importantes da resposta do hospedeiro.

O reconhecimento de patógenos bacterianos por *Drosophila* ocorre por duas vias principais, a via das Imd e a via do Toll (**Figura 2**). A via do Toll é ativada pela ligação de Spätzle ao receptor Toll, com exceção do Toll-7 que é ativada diretamente pelo reconhecimento de glicoproteínas virais (Lemaitre *et al.*, 1996; Lemaitre *et al.*, 1997; Nakamoto *et al.*, 2012) (**Figura 2**). Spätzle é uma citocina estruturalmente semelhante a IL-17 de humanos (Hymowitz *et al.*, 2001), sintetizada na sua pró-forma, tornando-se ativa após uma clivagem proteolítica em resposta a infecções (pelo reconhecimento de proteases) ou ao dano celular, sendo que esse processamento ocorre pela enzima processadora do Spätzle (SPE) (**Figura 2**) (Gottar *et al.*, 2006; Chamy *et al.*, 2008). Após a ligação de Spätzle ao receptor Toll, ocorre uma cascata de sinalização dependente de MyD88, semelhante aos humanos, que culmina na translocação do fator de transcrição da família NF- κ B, D κ f, para o núcleo, induzindo a síntese do peptídeo antimicrobiano (AMP) drosomicina (**Figura 2**) (Hoffmann and Reichhart, 2002).

A via da imunodeficiência (Imd) da *Drosophila* é semelhante à via do TNF e à via TLR dependente de TRIF (Hoffmann and Reichhart, 2002). A via do Imd reconhece o ácido diaminopimélico (DAP) do peptídeo glicano, produzida por gram-negativas e espécies do gênero *Bacillus*. DAP é capaz de interagir com a proteína de reconhecimento de peptídeo glicano LC (PGRP-LC), presente na membrana, ou PGRP-LE, presente no citosol (Kaneko *et al.*, 2006) (**Figura 2**). Essa ligação do peptídeo glicano com o PGRP-LC ou PGRP-LE promove uma ativação de um NF- κ B (Relish), que culmina na expressão de diversos AMPs pela via de ativação do NF- κ B mediada por Toll, como por exemplo a diptericina (**Figura 2**). Além da expressão da diptericina, a via de Imd promove a expressão da enzima NADPH-dependente Duox (*dual oxidase*), uma importante enzima pró-oxidante, resultando na produção de

peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. A expressão de Duox mediada por Imd ocorre após a via de Tak1, que ativa a via da MAPK p38 (Buchon *et al.*, 2014) (Figura 2).



Nature Reviews | Immunology

Figura 2. Vias de sinalização de *Drosophila melanogaster* contra patógenos. As duas principais vias de resposta imune contra patógenos, a via do Toll e a via da imunodeficiência (Imd). A via do Toll é ativada, e em conjunto com a via da Imd, controla a produção sistêmica de peptídeos antimicrobianos (AMP). A via da Imd além de induzir a produção de AMP, ativa a expressão de enzimas capazes de gerar espécies reativas de oxigênio, como a Duox. Essas vias são ativadas em resposta a detecção de componentes da parede celular de micróbios. A proteína PGRP-LC e PGRP-LE reconhecem o peptidoglicano DAP de Gram negativas e algumas Gram positivas, ativando a via da Imd. O reconhecimento da peptidoglicana de gram-negativas pode induzir a proteólise da citocina Spätzle, que uma vez clivada se liga ao receptor Toll. Essa ligação induz a ativação do NF- κ B de uma maneira MyD88 dependente, culminando na expressão do AMP drosomicina. A ativação da via da Imd induz a translocação do NF- κ B relish, induzindo a expressão do AMP diptericina. A via da Imd, pode ativar a

via das MAPKs p38, via a fosforilação da Mekk1 pela Tak1, culminando na expressão da Duox. (Buchon *et al.*, 2014)

Durante a infecção da *D. melanogaster* por *P. aeruginosa*, as vias de sinalização de Toll e Imd desempenham papel fundamental para montar uma resposta imune adequada. Foi demonstrado que populações de *D. melanogaster* deficientes nos componentes da via de Toll ou da via da Imd apresentam uma maior suscetibilidade a infecção (Lau *et al.*, 2003), demonstrando que ambas atuam em conjunto, de forma não redundante, para orquestrar uma resposta imune adequada. Posteriormente foi demonstrado que o isolado clínico de *P. aeruginosa* CF5, que é avirulenta em *D. melanogaster*, induz a expressão de diversos genes envolvidos na resposta imune, assim como a expressão de diversos AMPs (Apidianakis *et al.*, 2005). Por outro lado, verificou-se que o mesmo não ocorre quando a infecção se dá pela linhagem virulenta PA14, quando esses genes são fracamente induzidos, indicando que essa linhagem é capaz de suprimir sua expressão, resultando na morte do hospedeiro. Curiosamente, nesse mesmo trabalho (Apidianakis *et al.*, 2005), foi observado que as moscas inoculadas previamente com a linhagem CF5, seguida da infecção com PA14, apresentaram uma maior sobrevivência em comparação às moscas infectadas apenas com a linhagem PA14. Essa resposta imune mais eficiente pelos hospedeiros previamente infectados se deve a mudanças epigenéticas nas células do sistema imune inato, gerando uma memória imunológica, e tal termo foi consolidado como resposta imune treinada (Netea *et al.*, 2011).

1.4. Sistemas de dois componentes em *P. aeruginosa*

Ao encontrar um novo ambiente, as bactérias precisam superar e se adaptar a diversos estresses. Durante essa adaptação, complexas cascatas de sinalização e regulação são ativadas. Dentre esses sistemas de sinalização, os mais frequentes são os sistemas de dois componentes.

A resposta frente ao estresse mediada pelo sistema de dois componentes modula primariamente a expressão gênica. Esse fato é reforçado pelo fato de que mais de 60% de todos os RR identificados em bactérias apresentarem um domínio de ligação a DNA (Galperin, 2006; Gao *et al.*, 2007). O genoma de *P. aeruginosa* UCBPP-PA14 (ou simplesmente PA14) codifica pelo menos 76 RR, sendo que cerca de 65% desses apresentam um domínio de ligação a DNA (**Tabela 1**). Os RR de *P. aeruginosa* apresentam diversas arquiteturas, sendo possível separar os RR com domínio de ligação a DNA nas famílias OmpR (REC-wHTH), NarL (REC-HTH), NtrC (REC-AAA-FIS), LytR (REC-LytR), e ActR (REC-FIS). Apesar de existir uma vasta informação sobre alguns sistemas de dois componentes em *P. aeruginosa*, não há um estudo específico sobre quais RR são importantes para a virulência (**Tabela 1**) e pouco se sabe sobre os sinais que possam ativar esses sistemas, assim como a maioria de seus regulons.

Tabela 1: Reguladores de resposta em *Pseudomonas aeruginosa* PA14

Família (Dominio) Locus/gene	Provável proteína sensora ¹	Envolvimento em características ligadas à adaptação e virulência	Referência
REC			
PA14_02260	PA14_02250		
PA14_05320/ <i>pilG</i>	PA14_05390	Twitching	(Darzins and Russell, 1997; D'Argenio <i>et al.</i> , 2001)
PA14_05330/ <i>pilH</i>	PA14_05390	Twitching	(Darzins and Russell, 1997; D'Argenio <i>et al.</i> , 2001)
PA14_45620/ <i>cheY</i>	PA14_45590		
PA14_36920			
PA14_26830	PA14_26810		
OmpR (REC-wHTH)			
PA14_06060/ <i>creB</i>	PA14_06070	Catabolismo, swarming e swimming	(Wagner <i>et al.</i> , 2007; Zamorano <i>et al.</i> , 2014)
PA14_54510	PA14_54500		(Bielecki <i>et al.</i> , 2015)
PA14_52250	PA14_52240	Aquisição de ferro	(Vasil and Ochsner, 1999)
PA14_49440	PA14_49420	Essencial para infecção crônica em ratos	(Potvin <i>et al.</i> , 2003)
PA14_49180/ <i>phoP</i>	PA14_49170	Sinalização por peptídeos antimicrobianos, polimixina, e formação de biofilme	(Macfarlane <i>et al.</i> , 1999; Ernst <i>et al.</i> , 1999)
PA14_45880	PA14_45870		
PA14_43340/ <i>kdpE</i>	PA14_43350		
PA14_41260/ <i>parR</i>	PA14_41270	Resistência a antibióticos, quórum sensing, produção de fenazinas e swarming	(Fernández <i>et al.</i> , 2010; Muller <i>et al.</i> , 2011; Wang <i>et al.</i> , 2013)
PA14_32580	PA14_32570		
PA14_31960/ <i>czcR</i>	PA14_31950	Resistencia a metal e antibiótico, regula patogenicidade em <i>C. elegans</i>	(Hassan <i>et al.</i> , 1999; Dieppois <i>et al.</i> , 2012)
PA14_29730/ <i>bqsR</i>	PA14_29740	Decaimento do biofilme, percepção de ferro, resistência a antibiotic, regulação da piocianina, swarming, manutenção da homeostase de cálcio	(Dong <i>et al.</i> , 2008; Kreamer <i>et al.</i> , 2015; Guragain <i>et al.</i> , 2016)
PA14_27810/ <i>copR</i>	PA14_27800	Resistência a imipenem e metais	(Teitzel <i>et al.</i> , 2006; Caille <i>et al.</i> , 2007)
PA14_24350/ <i>cprR</i>	PA14_24340	Medeia a modificação do LPS e resistência a peptídeos catiônicos	(Fernández <i>et al.</i> , 2010)
PA14_22940/ <i>gltR</i>	PA14_22960	Transporte de glicose, citotoxicidade mediada por T3SS	(Wolfgang <i>et al.</i> , 2003; O'Callaghan <i>et al.</i> , 2012)
PA14_22760/ <i>cpxR</i>	PA14_22730	Resposta a estresse de envelope. Resistência a antibiótico	(Beckmann <i>et al.</i> , 2005; Yakhnina <i>et al.</i> , 2015; Tian <i>et al.</i> , 2016)
PA14_11680	PA14_11630		
PA14_56950/ <i>colR</i>	PA14_56940	Resistência a polimixina virulência em <i>C. elegans</i> .	(Garvis <i>et al.</i> , 2009; Gutu <i>et al.</i> , 2013)
PA14_63150/ <i>pmrA</i>	PA14_63160	Resistência a polimixina B e peptídeos antimicrobianos	(McPhee <i>et al.</i> , 2003; Moskowitz <i>et al.</i> , 2004; McPhee <i>et al.</i> , 2006; Lee and Ko, 2014)
PA14_64570/ <i>irlR</i>	PA14_64580		
PA14_65880/ <i>aruR</i>	PA14_65860	Anticorpos contra a proteína encontrados no soro de pacientes com fibrose cística. Participa da via da arginina transaminase.	(Beckmann <i>et al.</i> , 2005; Yang and Lu, 2007)

Tabela 1: Continuação

Família (Dominio)	Provável proteína sensora ¹	Envolvimento em características ligadas à adaptação e virulência	Referência
OmpR (REC-wHTH)			
PA14_68700/ <i>ompR</i>	PA14_68680		
PA14_70750/ <i>phoB</i>	PA14_70760	Sinalização por baixas concentrações de fosfato, controle do QS e swarming	(Faure <i>et al.</i> , 2013; Blus-Kadosh <i>et al.</i> , 2013; Bielecki <i>et al.</i> , 2015)
NarL (REC-HTH)			
PA14_00430			
PA14_07840/ <i>agtR</i>	PA14_07820	Envolvido no reconhecimento de peptídeo glicana e controle de virulência	(Korgaonkar <i>et al.</i> , 2013)
PA14_46360	PA14_46370	Sinalização inter-espécies. formação de biofilme e resistência a antibiótico	(Ryan <i>et al.</i> , 2008)
PA14_38930/ <i>glpR</i> (<i>EraS</i> -)	PA14_38970	Oxidação de etanol, a resistência a antibiótico durante o biofilme	(Mern <i>et al.</i> , 2010; Beaudoin <i>et al.</i> , 2012)
PA14_38900/ <i>exaE</i> (<i>eraR</i>)	PA14_38910	Regula a oxidação de etanol, e relacionado a resistência a antibiótico durante o biofilme	(Mern <i>et al.</i> , 2010; Beaudoin <i>et al.</i> , 2012)
PA14_33920			
PA14_30650/ <i>gacA</i>	PA14_52260	Virulência em diversos hospedeiros, regulação dependente QS, formação de biofilme e resistência a antibióticos, swarming, regulação do T3SS/T6SS	(Reimann <i>et al.</i> , 1997; Rahme <i>et al.</i> , 2000; Parkins <i>et al.</i> , 2001; Heeb <i>et al.</i> , 2002; Soscia <i>et al.</i> , 2007; Goodman <i>et al.</i> , 2009; Frangipani <i>et al.</i> , 2014)
PA14_26570		Resposta a baixa tensão de oxigênio, virulência em macrófagos e infecção pulmonar	este trabalho
PA14_24710/ <i>rocA2</i>	PA14_24720	Regulação gênica de fímbrias e resistência a antibiótico	(Kulasekara <i>et al.</i> , 2004; Sivaneson <i>et al.</i> , 2011)
PA14_17670/ <i>erdR</i>		Regula a oxidação de etanol, e relacionado a resistência a antibiótico durante o biofilme	(Mern <i>et al.</i> , 2010; Beaudoin <i>et al.</i> , 2012)
PA14_16350			
PA14_13730/ <i>narL</i>	PA14_13740	Percepção de nitrato e respiração em hipóxia. Formação de biofilme, swimming e swarming	(Van Alst <i>et al.</i> , 2007; Benkert <i>et al.</i> , 2008)
PA14_12780/ <i>rocA1</i>	PA14_12820	Citotoxicidade, virulência, fímbrias, TTSS formação de biofilme.	(Kulasekara <i>et al.</i> , 2004; Kuchma <i>et al.</i> , 2005)
PA14_11120			
PA14_09690/ <i>bfiR</i>	PA14_09680	Formação e manutenção do biofilme	(Petrova and Sauer, 2009)
PA14_55810/ <i>pprB</i>	PA14_55780	Permeabilidade da membrana externa, resistência a aminoglicosídeos	(Wang <i>et al.</i> , 2003)
PA14_59770/ <i>rcsB</i>	PA14_59780	Controle da expressão da fímbria <i>cupD</i>	(He <i>et al.</i> , 2004; Mikkelsen <i>et al.</i> , 2009; Nicastro <i>et al.</i> , 2009; Mikkelsen <i>et al.</i> , 2013)
NtrC (REC-AAA-Fis)			
PA14_50180/ <i>fleR</i>	PA14_50200	Motilidade flagelar e adesão a mucina.	(Ritchings <i>et al.</i> , 1995; Dasgupta <i>et al.</i> , 2003)
PA14_46990/ <i>aauR</i>	PA14_46980		
PA14_60260/ <i>pilR</i>	PA14_60250	Expressão de fímbrias do tipo IV, twitching e swarming, formação de biofilme	(Ishimoto and Lory, 1992; Hobbs <i>et al.</i> , 1993; Goodman <i>et al.</i> , 2004; Overhage <i>et al.</i> , 2007; Kilmury and Burrows, 2016)
PA14_62540/ <i>cbrB</i>	PA14_62530	Armazenamento de carbono e nitrogênio, citotoxicidade, swarming, modulação do metabolismo, virulência e resistência a antibióticos	(Gallagher and Manoil, 2001; Goodman <i>et al.</i> , 2004; Wagner <i>et al.</i> , 2007; Yeung <i>et al.</i> , 2011; Yeung <i>et al.</i> , 2014)
PA14_67680/ <i>ntrC</i>	PA14_67670	Resposta aos níveis celulares de nitrogênio.	(Li and Lu, 2007)
PA14_68250/ <i>ddcD</i>	PA14_68230	Controle da expressão de transportadores de ácidos dicarboxílicos de 4 carbonos	(Valentini <i>et al.</i> , 2011)

Tabela 1: Continuação

Família (Dominio) Locus/gene	Provável proteína sensora ¹	Envolvimento em características	Referência
NtrC (REC-AAA-Fis)			
PA14_72380/ <i>algB</i>	PA14_72390	Biossíntese de alginato	(Wozniak and Ohman, 1991; Goldberg and Dahnke, 1992)
PA14_72720/ <i>dctD</i> (<i>mfir</i>)	PA14_72740	Formação de biofilme e metabolismo	(Tatke <i>et al.</i> , 2015)
LytR (REC-LytTR)			
PA14_69470/ <i>algR</i>	PA14_69480	Virulência, biossíntese de alginato, twitching e swarming, formação de biofilme, produção de cianeto, T3SS	(Deretic and Konyecsni, 1989; Whitchurch <i>et al.</i> , 1996; Lizewski <i>et al.</i> , 2002; Intile <i>et al.</i> , 2014; Okkotsu <i>et al.</i> , 2014)
ActR (REC-Fis)			
PA14_58300/ <i>roxR</i>	PA14_58320	Tolerância a cianeto, resposta a transmigração de neutrófilos, diminuição da citotoxicidade em células epiteliais.	(Comolli and Donohue, 2002; Hurley <i>et al.</i> , 2010; Fernández- Piñar <i>et al.</i> , 2012)
AmiR (REC-ANTAR)			
PA14_41490/ <i>nasT</i>	PA14_41480		
RssB (REC-PP2C)			
PA14_27940		Resistência a aminoglicosídeos	(Krahn <i>et al.</i> , 2012)
REC-PP2C-RsbW			
PA14_20780		Swarming e formação de biofilme	(Hsu <i>et al.</i> , 2008; Bhuwan <i>et al.</i> , 2012)
CheB (REC-CheB)			
PA14_02180/ <i>cheB2</i>	PA14_02250	Diminuição da virulência em modelo de <i>C. elegans</i>	(Garvis <i>et al.</i> , 2009)
PA14_05400/ <i>chpB</i>		Montagem de fímbrias tipo IV	(Whitchurch <i>et al.</i> , 2004)
PA14_45580	PA14_45590		
PA14_16480/ <i>wspF</i>		Virulência em <i>Drosophila</i> e camundongos Regulação dos níveis de c-di-GMP e biofilme	(Kim <i>et al.</i> , 2008)
WspR (REC-GGDEF)			
PA14_57140	PA14_57170	Regulação dos níveis de c-di-GMP e biofilme, auto-agregação.	(D'Argenio <i>et al.</i> , 2002; Kulasekara <i>et al.</i> , 2004; Hickman <i>et al.</i> , 2005; Kulasakara <i>et al.</i> , 2006)
PA14_16500/ <i>wspR</i>		Biofilme, autoagregação e c-di-GMP.	(D'Argenio <i>et al.</i> , 2002; Hickman <i>et al.</i> , 2005; Kulasakara <i>et al.</i> , 2006; Borlee <i>et al.</i> , 2010)
PA14_64050			
PA14_20820			
PA14_40570			
FimX (REC-GGDEF-EAL)			
PA14_65540/ <i>fimX</i>		Twitching, citotoxicidade	(Kulasekara <i>et al.</i> , 2004; Kuchma <i>et al.</i> , 2005)

Tabela 1: Continuação

Família (Dominio)	Provável proteína sensora¹	Envolvimento em características ligadas à adaptação e virulência	Referência
PvrR (REC-EAL)			
PA14_12810/ <i>rocR</i>	PA14_12820	Citotoxicidade, virulência, fímbrias, T3SS, biofilme.	(McLaughlin <i>et al.</i> , 2012)
PA14_59790/ <i>pvrR</i>	PA14_59800	Varição fenotípica, resistência a antibiótico, formação de biofilme. Controle da expressão de genes da fímbria CupD.	(Drenkard and Ausubel, 2002; He <i>et al.</i> , 2004; Mikkelsen <i>et al.</i> , 2009; Nicastro <i>et al.</i> , 2009; Mikkelsen <i>et al.</i> , 2013)
RpfG (REC-HD-GYP)			
PA14_30830	PA14_30840	Motilidade, virulência e resistência a antibióticos. virulência em <i>G. mellonella</i>	(Ryan <i>et al.</i> , 2009; McLaughlin <i>et al.</i> , 2012)
PA14_63210	PA14_63160	virulência em <i>G.mellonella</i>	(Ryan <i>et al.</i> , 2009)
CheV (CheW-REC)			
PA14_20750			
REC-HDOD			
PA14_03470			
REC-HisK			
PA14_30840	PA14_30700		
Outros			
PA14_70790			

¹ Baseado na proximidade dos genes no cromossomo ou evidências experimentais, quando disponíveis.

Os sistemas de dois componentes são caracterizados por responder a um estímulo específico ou a uma faixa estreita de estímulos (por exemplo, uma pequena variação de pH). Essa especificidade permite uma resposta precisa e apropriada, sendo que *crosstalks* entre diferentes sistemas seriam considerados raros (Laub and Goulian, 2007; Capra *et al.*, 2012). Entretanto, com os avanços recentes nesse tema, redes de regulação envolvendo múltiplas histidinas quinases que agem em conjunto e orquestram respostas complexas em *P. aeruginosa* estão sendo caracterizadas. Essas redes agem em conjunto, sentindo e integrando diversos estímulos e criando uma resposta elegante, com ajustes extremamente precisos.

Uma dessas redes de regulação ampliadas envolve o sistema de dois componentes GacS-GacA, classicamente envolvido na virulência em diversos hospedeiros (Rahme *et al.*, 2000), como planta (*Arabidopsis thaliana*), nematódeo

(*Caenorhabditis elegans*), insetos (*Drosophila melanogaster*, *Galleria mellonella*, *Bombyx mori*) e modelos de infecção aguda em camundongos (Rahme *et al.*, 1997; Mahajan-Miklos *et al.*, 1999; M W Tan *et al.*, 1999; Jander *et al.*, 2000; Brinkman *et al.*, 2001; Chieda *et al.*, 2005).

Nessa rede de regulação, diversas histidina quinases agem em conjunto para detectar e integrar diferentes sinais, para que exista um ajuste preciso e uma decisão equilibrada seja tomada, frequentemente associada à mudança entre a infecção aguda e crônica. A histidina quinase central dessa rede, GacS, regula a fosforilação do RR GacA (**Figura 3**). Uma vez fosforilado, GacA torna-se ativo e regula positivamente a transcrição de dois sRNAs, RsmZ e RsmY. Esses sRNAs atuam em paralelo e de forma aparentemente redundante para antagonizar as proteínas ligadoras de RNA RsmA e RsmN (Morris *et al.*, 2013). RsmA e RsmN são capazes de ligar-se a diversos mRNAs, promovendo a degradação de transcritos alvo envolvidos na cronicidade da infecção (por exemplo, genes envolvidos na formação do biofilme, sistema de secreção do tipo 6 (T6SS), e produtos extracelulares como cianeto e piocianina), e, ao mesmo tempo, essas proteínas promovem a virulência aguda (relacionada ao sistema de secreção do tipo 3 (T3SS) e motilidade) (Reimann *et al.*, 1997; Parkins *et al.*, 2001; Pessi *et al.*, 2001; Valverde *et al.*, 2003; Heurlier *et al.*, 2004; Burrowes *et al.*, 2006; Mulcahy *et al.*, 2008; Brencic and Lory, 2009; Morris *et al.*, 2013; Moscoso *et al.*, 2014).

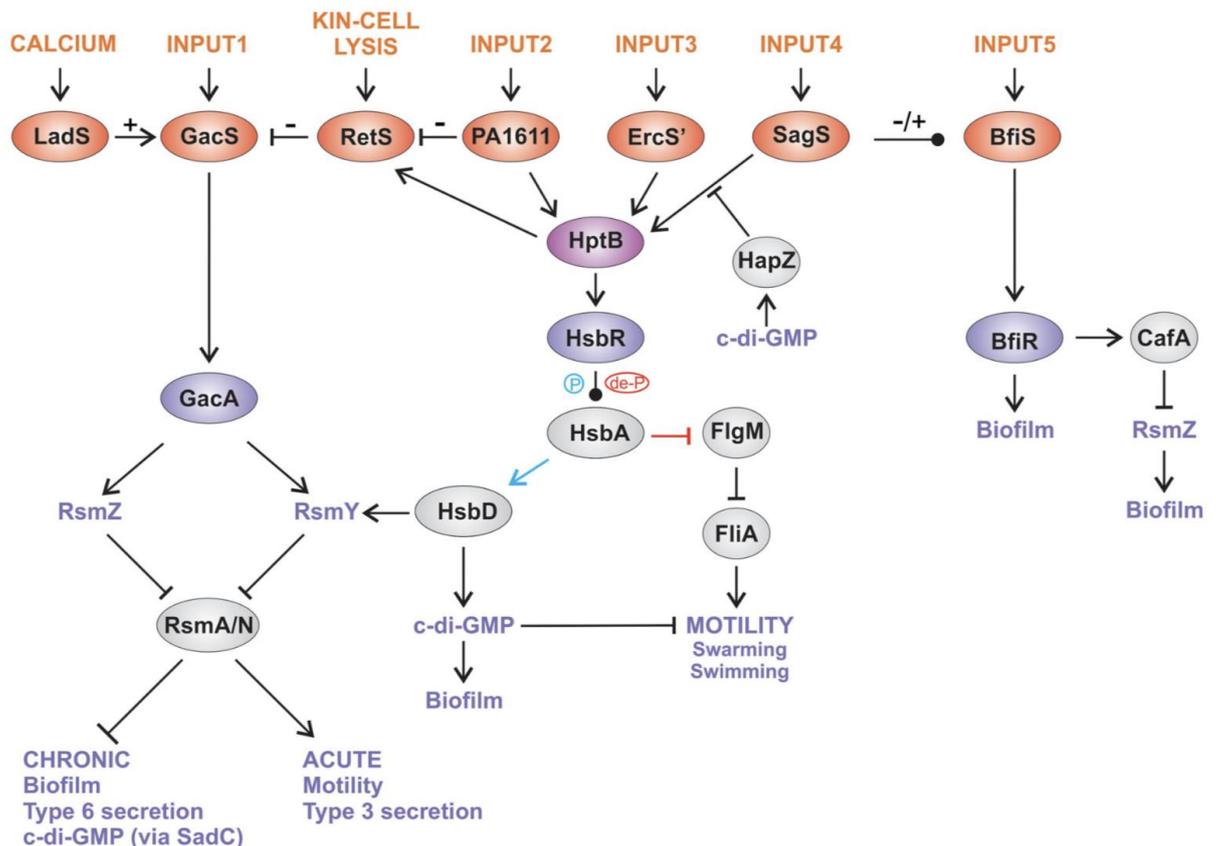


Figura 3: A rede de sinalização Gac. A rede inclui os ramos HptB e SagS/BfiS. A principal resposta da via GacS é a expressão dos pequenos RNAs RsmY e RsmZ, que sequestram o regulador pós-transcricional RsmA e RsmZ. Uma vez que RsmA/Z são sequestrados, genes de virulência associados a infecção crônica são regulados positivamente e genes associados a infecção aguda regulados negativamente. Os ramos HptB e SagS/BfiS da rede também regulam os níveis de RsmY/Z. O papel de HsbA difere dependendo do seu estado de fosforilação (seta azul) ou desfosforilado (seta vermelha). Duas diguanilatos ciclases são controladas por esse sistema, HsbD e SadC. Os círculos indicam as histidinas quinases, em azul os RRs, em roxo a proteína HptB e em cinza as outras proteínas do sistema. As setas indicam as interações que ativam o sistema, as setas interrompidas indicam interações inibitórias, e as setas com um círculo no final demonstram interações que ativam ou inibem dependendo da condição. (Retirado de Francis *et al.*, 2017)

GacS é uma histidina quinase complexa, que faz interações diretas com três diferentes histidina quinases, RetS, LadS e PA1611 (PA14_43670, em PA14, **Tabela 1**). RetS é capaz de bloquear o sistema Gac, enquanto LadS o ativa (Goodman *et al.*, 2004; Laskowski *et al.*, 2004; Ventre *et al.*, 2006; Laskowski and Kazmierczak, 2006). RetS regula negativamente a via por impedir a autofosforilação de GacS (Goodman *et al.*, 2009), enquanto LadS regula positivamente a sinalização via GacS através de um mecanismo de fosforelê com o grupo fosforila sendo transferido do domínio REC de LadS para o domínio Hpt de GacS (Chambonnier *et al.*, 2016). PA1611 não

interage diretamente com GacS, mas é capaz de interagir com RetS. A interação PA1611-RetS impede que RetS tenha um efeito inibitório sobre GacS, e, conseqüentemente, induz a ativação da rede (Kong *et al.*, 2013; Bhagirath *et al.*, 2017). Curiosamente, os sinais ambientais que ativam essa rede de regulação ainda não estão propriamente esclarecidos. GacS é regulada por moléculas produzidas em alta densidade celular, enquanto RetS é controlado por moléculas produzidas por células que sofreram lise, embora a identidade dessas moléculas não seja conhecida até o presente momento (Heeb *et al.*, 2002; LeRoux *et al.*, 2015). Recentemente, foi demonstrado que LadS é ativada por cálcio e regula positivamente fenótipos relacionados à cronicidade (Broder *et al.*, 2016).

Um ramo dessa rede de regulação envolve a proteína intermediária HptB, que é capaz de interagir com RetS, PA1611 e com mais duas histidinas quinases, SagS e ErcS' (Lin *et al.*, 2006; Hsu *et al.*, 2008). Conseqüentemente, HptB forma um sistema de fosforelê integrando RetS, PA1611, SagS e ErcS' com HsbR (PA3346, em PAO1, PA14_20780 em PA14). HsbR possui o domínio REC, o domínio PP2C (fosfatase 2C) e um domínio de serina/treonina quinase na sua extremidade C-terminal (Hsu *et al.*, 2008; Bhuwan *et al.*, 2012). HsbR, uma vez fosforilada, age como uma fosfatase, desfosforilando o fator anti-anti sigma HsbA (PA3347 em PAO1, PA14_20770 em PA14). HsbA desfosforilado sequestra o fator anti-sigma FlgM e essa interação libera o fator sigma FliA do complexo com FliA/FlgM). FliA ativa a expressão de genes do flagelo, promovendo as motilidades do tipo *swimming* e *swarming*, importantes no estabelecimento inicial da infecção (Bhuwan *et al.*, 2012).

Caso o RR HsbR apresente-se desfosforilado pela inativação de HptB, ele apresenta baixa atividade de fosfatase e maior atividade de serina/treonina quinase. Nesse estado desfosforilado, HsbR fosforila HsbA, prevenindo que HsbA interaja e

sequestre FlgM. FlgM se mantém em complexo com FliA, diminuindo a expressão dos genes de flagelo. Acredita-se que HsbA fosforilado seja capaz de interagir e ativar a diguanilato ciclase HsbD, promovendo o aumento de c-di-GMP e do pequeno RNA RsmY, que favorecem a formação de biofilme e a infecção crônica (Bordi *et al.*, 2010; Valentini *et al.*, 2016). O mecanismo pelo qual HsbD modula os níveis de RsmY ainda é desconhecido, porém o aumento desse sRNA no mutante em *hptB* depende da sinalização via GacS/GacA (Bordi *et al.*, 2010; Jean-Pierre *et al.*, 2016).

Além desse complexo ramo do HptB, outro ramo da rede Gac envolve as histidinas quinases SagS e BfiS. SagS regula a expressão de RsmY e RsmZ de maneiras distintas: enquanto a regulação de RsmY é dependente de HptB (Bordi *et al.*, 2010; Petrova and Sauer, 2011), RsmZ é regulado por SagS pela interação desta com BfiS. O RR cognato de BfiS, BfiR, ativa a expressão da RNase G CafA. CafA reduz os níveis de RsmZ (Petrova and Sauer, 2010). Portanto, o ramo da rede SagS/BfiS regula os níveis de RsmZ pós transcricionalmente, via CafA, sendo que os níveis de RsmY/RsmZ são regulados em sua maior parte pela rede GacS em nível transcricional (Ventre *et al.*, 2006; Goodman *et al.*, 2009).

Essa rede de regulação regula a produção e a resposta a c-di-GMP de duas formas. A primeira é o controle da taxa de tradução de SadC, pela ligação de RsmA a seu mRNA (Moscoso *et al.*, 2014); a segunda é pelo o ramo de HptB, que regula a atividade de ciclase de HsbD (Valentini *et al.*, 2016). Curiosamente, a rede Gac responde também aos níveis intracelulares de c-di-GMP. A superexpressão de uma diguanilato ciclase pode induzir o aumento dos níveis de c-di-GMP, induzindo a transição do estado de infecção aguda (expressão do T3SS) para crônica, caracterizado pela expressão do T6SS, sendo essa transição dependente de RsmY/Z (Moscoso *et al.*, 2011; Frangipani *et al.*, 2014). Há uma especulação de que os níveis

de c-di-GMP são capazes de ativar a rede de regulação Gac, promovendo a formação do biofilme e um estado crônico de infecção. Corroborando essa ideia, recentemente foi demonstrado que HapZ, uma proteína que apresenta um domínio PilZ que se liga a c-di-GMP interagindo com SagS e inibindo a transferência da fosforila para HptB (Xu *et al.*, 2016).

Essa rede de regulação demonstra a complexidade da outrora chamada de sistema de dois componentes. Esses sistemas estão sendo cada vez melhor caracterizados, sendo capazes de interagir direta ou indiretamente e permitindo um ajuste preciso para a maior eficiência possível de resposta frente a um estímulo ou conjunto de estímulos, uma vez que a adaptação ao ambiente envolve mudanças drásticas em diversos fatores, muitas vezes simultaneamente.

A rede Gac, que envolve pelo menos sete HKs e três RRs, ainda apresenta pontos que necessitam ser melhor esclarecidos, apesar do grande número de estudos que desvendaram seus alvos e conexões. Entretanto, apenas uma fração das proteínas de “sistemas de dois componentes” foi caracterizada até o momento em *P. aeruginosa*. Dessa maneira, este trabalho pretendeu ampliar o conhecimento sobre os reguladores de resposta desta bactéria, pela análise de sua contribuição na virulência em modelos de infecção distintos. A partir dos resultados obtidos, um dos RR que apresentou relevância em modelos de infecção *in vitro* e *in vivo* de mamíferos e que pertence a uma família pouco estudada foi escolhido para ter sua função caracterizada.

2. Objetivos

Este trabalho teve como objeto principal identificar e caracterizar novos reguladores de resposta (RR) envolvidos na virulência de *Pseudomonas aeruginosa*.

Objetos específicos:

- Triar os RR envolvidos na virulência de *P. aeruginosa* utilizando mutantes por transposon e mutantes apolares nos modelos de macrófago e de *Drosophila*.

-Caracterizar o RR atípico AtvR quanto a seu envolvimento na virulência, seu regulon e seu papel na fisiologia de *P. aeruginosa*.

3. Materiais e Métodos

3.1. Linhagens, plasmídeos e condições de cultivo

As linhagens e plasmídeos utilizados estão listados na **Tabela 2**. Culturas de *E. coli* e *P. aeruginosa* foram cultivadas rotineiramente em meio LB a 37°C acrescido de antibióticos, quando necessários, nas seguintes concentrações: ampicilina 100 µg/mL, carbenicilina 350 µg/mL, canamicina 50 µg/mL (*E. coli*) e 250 µg/mL (*P. aeruginosa*), ácido nalidixico 20 µg/mL, gentamicina 50 µg/mL (*P. aeruginosa*) com e sem a adição de 0,2% de arabinose, quando necessário e gentamicina 10 µg/mL (*E. coli*).

3.2. Técnicas básicas de Biologia Molecular.

Isolamento de DNA plasmidial, digestão, reações de polimerase em cadeia (PCR), ligações, transformações e outras técnicas básicas de biologia molecular foram realizadas de acordo com metodologia padrão, descritas em manuais de referência (Sambrook, J, Fritsch, E. F., Maniatis, 1990; Ausubel *et al.*, 2001). DNA genômico de *P. aeruginosa* foi isolado pela técnica de Chen e Kuo (Chen and Kuo, 1993) .

Tabela 2. Linhagens e plasmídeos.

Linhagens	Descrição	Referência
<i>P. aeruginosa</i>		
PA14	Linhagem selvagem <i>P. aeruginosa</i> UCBPP-PA14	(Rahme <i>et al.</i> , 1995)
PA14/pJN105	PA14 carregando o plasmídeo pJN105	Este trabalho
PA14/pAtvR	PA14 carregando o plasmídeo pAtvR	Este trabalho
$\Delta atvR$	PA14 com deleção in <i>atvR</i>	Este trabalho
$\Delta atvR$ /pJN105	$\Delta atvR$ carregando o plasmídeo pJN105	Este trabalho
$\Delta atvR$ /pAtvR	$\Delta atvR$ carregando o plasmídeo pAtvR	Este trabalho
Δanr	PA14 com deleção em <i>anr</i>	Este trabalho
Δanr /pJN105	Δanr carregando o plasmídeo pJN105	Este trabalho
Δanr /pAtvR	Δanr carregando o plasmídeo pAtvR	Este trabalho
Δdnr	PA14 com deleção em <i>dnr</i>	Este trabalho
Δdnr /pJN105	Δdnr carregando o plasmídeo pJN105	Este trabalho
Δdnr /pAtvR	Δdnr carregando o plasmídeo pAtvR	Este trabalho
$\Delta narXL$	PA14 com deleção em <i>narXL</i>	Este trabalho
$\Delta narXL$ /pJN105	$\Delta narXL$ carregando o plasmídeo pJN105	Este trabalho
$\Delta narXL$ /pAtvR	$\Delta narXL$ carregando o plasmídeo pAtvR	Este trabalho
$\Delta PA14_02180$	PA14 com deleção em <i>PA14_02180</i>	Este trabalho

Tabela 2: continuação

Linhagens	Descrição	Referência
$\Delta PA14_03470$	PA14 com deleção em <i>PA14_03470</i>	Este trabalho
$\Delta PA14_30840$	PA14 com deleção em <i>PA14_30840</i>	Este trabalho
$\Delta PA14_33920$	PA14 com deleção em $\Delta PA14_33920$	Este trabalho
$\Delta PA14_45620$	PA14 com deleção em $\Delta PA14_45620$	Este trabalho
$\Delta PA14_46360$	PA14 com deleção em $\Delta PA14_46360$	Este trabalho
$\Delta PA14_46990$	PA14 com deleção em $\Delta PA14_46990$	Este trabalho
$\Delta PA14_64570$	PA14 com deleção em $\Delta PA14_64570$	Este trabalho
$\Delta PA14_70790$	PA14 com deleção em $\Delta PA14_70790$	Este trabalho
$\Delta PA14_00430$	PA14 com deleção em $\Delta PA14_00430$	Este trabalho
$\Delta PA14_02260$	PA14 com deleção em $\Delta PA14_02260$	Este trabalho
$\Delta PA14_05320$	PA14 com deleção em $\Delta PA14_05320$	Este trabalho
$\Delta PA14_60260$	PA14 com deleção em $\Delta PA14_60260$	Este trabalho
$\Delta PA14_29730$	PA14 com deleção em $\Delta PA14_29730$	Este trabalho
Mutantes transposon		
<i>PA14_02260</i>	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de <i>PA14_02260</i> proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 28135)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
<i>PA14_05320</i>	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de <i>PA14_05320</i> proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 26986)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)

Tabela 2: Continuação

Linhagens	Descrição	Referência
PA14_05330	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_05330 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 45311)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_27940	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_27940 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 41119)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_20780	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_20780 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 31270)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_45580	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_45580 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 35248)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_16480	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_16480 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 29257)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_57140	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_57140 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 30693)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_16500	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_16500 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 28622)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_64050	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_64050 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 54304)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_20820	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_20820 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 48657)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_40570	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_40570 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 41347)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_12810	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_12810 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 46879)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_30830	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_30830 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 53749)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_63210	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_63210 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 55086)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_20750	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_20750 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 26645)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_70790	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_70790 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 39353)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)

Tabela 2: Continuação

Linhagens	Descrição	Referência
PA14_06060	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_06060 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 40341)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_54510	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_54510 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 26688)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_49440	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_49440 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 26191)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_49180	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_49180 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 40573)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_45880	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_45880 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 36012)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_41260	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_41260 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 55775)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_32580	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_32580 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 35120)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_31960	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_31960 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 33016)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_27810	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_27810 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 36496)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_24350	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_24350 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 27325)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_22940	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_22940 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 34039)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_11680	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_11680 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 25820)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_56950	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_56950 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 26077)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_63150	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_63150 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 37305)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_65880	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_65880 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 42076)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)

Tabela 2: Continuação

Linhagens	Descrição	Referência
PA14_70750	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_70750 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 48234)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_00430	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_00430 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 48432)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_07840	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_07840 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 30220)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_38900	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_38900 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 38131)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_30650	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_30650 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 54630)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_26570	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_26570 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 37636)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_24710	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_24710 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 26984)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_17670	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_17670 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 44732)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_16350	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_16350 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 33295)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_12780	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_12780 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 47341)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_11120	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_11120 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 39369)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_09690	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_09690 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 28988)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_55810	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_55810 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 38855)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_50180	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_50180 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 29423)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_60260	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_60260 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 37300)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_62540	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_62540 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 44074)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)

Tabela 2: Continuação

Linhagens	Descrição	Referência
PA14_67680	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_67680 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 30309)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_68250	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_68250 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 56053)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_72380	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_72380 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 24111)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_72720	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_72720 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 43245)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_69470	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_69470 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 46667)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_58300	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_58300 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 40945)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14_41490	Mutante por inserção do transposon mariner na região codificadora de PA14_41490 proveniente da biblioteca PA14NR; Gm ^R (ID: 43147)	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
<i>E. coli</i>		
DH5α	<i>supE44 lacU169 (80 lacZM15) hsdR17 recA1 endA11 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Invitrogen
S17-1	<i>Pro thi recA hsdR (r⁻ m⁺) Tp^r Sm^r Km^s [Δ RP4-2-Tc::Um-Km::Tn7]</i>	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
Macrófago		
J774.A1	Monocyte/Macrophage cell line	(Snyderman <i>et al.</i> , 1977)
Plasmídeo		
pGEM-T easy	Cloning vector; Ap ^r	Promega
pNPTS138	Replicon ColE1, oriT, <i>npt</i> (Km ^r), <i>sacB</i>	(Tsai and Alley, 2000)
pEX18Ap	ApR; oriT+sacB+, gene replacement vector with MCS from pUC18	(Hoang <i>et al.</i> , 1998)
pJN105	araC-pBAD cloned in pBBR1 MCS-5; GmR	(Newman and Fuqua, 1999)

Tabela 2: Continuação

Plasmídeo	Descrição	Referência
pAtvR	<i>atvR</i> coding region cloned in pJN105	Este trabalho
pGHK101	873 bp upstream of <i>atvR</i> coding region cloned in pGEM-T Easy	Este trabalho
pGHK002	793 bp downstream of <i>atvR</i> coding region cloned in pGEM-T Easy	Este trabalho
pGHK003	873 bp upstream and 793 downstream of <i>atvR</i> coding region cloned in pNPTS138	Este trabalho
pGHK006	1000 bp upstream and 1000 downstream of <i>anr</i> coding region cloned in pEX18Ap	Este trabalho

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho

Iniciadores de DNA	Sequência	Uso
Del_atvR_1	AAGCTT CCAGCGCTACAGCGAGAT	<i>Deleção de atvR</i>
Del_atvR_2	CTCGAG CGAACTCATTGCGCCTCT	
Del_atvR_3	CTCGAG TGACCGGGTTCGAAACAT	<i>Deleção de atvR</i>
Del_atvR_4	GAATTC ACTGGGTGCTGAGCTTGC	
Del_AnR 1	cctgcaggtcgactctagagGCCACTTTGAACTGGCCT	<i>Deleção de anr</i>
Del_AnR 2	aggcgcttcaCATTGAGGGGTCCTTGCTAG	
Del_AnR 3	cccctcaatgTGAAGCGCCTGCGAACCG	<i>Deleção de anr</i>
Del_AnR 4	attcgagctcggtacccgggTCATGAACTGGGTCATGAAGGG	
Del_Dnr 1	cctgcaggtcgactctagagCGCGAGGCGATGCGCGTA	<i>Deleção de dnr</i>
Del_Dnr 2	gggctgttcaCATGCTGGGAAGGCTCGC	
Del_Dnr 3	tcccagcatgTGAACAGCCCCGCGCTTG	<i>Deleção de dnr</i>
Del_Dnr 4	attcgagctcggtacccgggGTCGCCAACGCCTGCGCC	
Del_narXL 1	cctgcaggtcgactctagagAGTGGTGCCTGAACCAGC	<i>Deleção de narXL</i>
Del_narXL 2	gcgcggttcaCATGTGAAAAGCCTTTTAAAACAGTG	
Del_narXL 3	ttttcacatgTAAGCCGCGCGGGCTTG	<i>Deleção de narXL</i>
Del_narXL 4	attcgagctcggtacccgggGCAGGGCGTTCGGCGCCC	

Tabela 3: Continuação

Iniciadores de DNA	Sequência	Uso
PilG_1-2_fwd	cctgcaggtcgactctagagCTCAGCGGCTGGGCCACG	<i>Deleção de pilG</i>
PilG_1-2_rev	ccgatatcaCATGTTCCGCTATATCGACTCGGTG	
PilG_3-4_fwd	ggcgaacatgTGATATCCGGCCGCATGG	<i>Deleção de pilG</i>
PilG_3-4_rev	attcgagctcggtacccgggTTTATACGGCGACGTCGAG	
PilR_1-2_fwd	cctgcaggtcgactctagagAGCGCATGCGCACCGGCA	<i>Deleção de pilR</i>
PilR_1-2_rev	ttcacttcaCATGCGTGCGGCTTCCGTC	
pilR_3-4_fwd	cgcacgatgTGAAAGTAAAAGGCCTGTCC	<i>Deleção de pilR</i>
pilR_3-4_rev	attcgagctcggtacccgggCGTCTCGCCGCTCTATCC	
02180-1_2_fwd	cctgcaggtcgactctagagTCGACTGCGCCCGCCTGG	<i>Deleção de PA14_02180</i>
02180-1_2_rev	atcccgtcaCATGGCGGGCTCTCCCG	
02180-3_4_fwd	gcccgcctgTGAGCGGGATCCTGGCCG	<i>Deleção de PA14_02180</i>
02180-3_4_rev	attcgagctcggtacccgggGGCTGGTCGAGCAGGTCCG	
03470-1_2_fwd	cctgcaggtcgactctagagGGACATCGCCGCGATCATC	<i>Deleção de PA14_03470</i>
03470-1_2_rev	ggacggctcaCATGGCGTTCCTCTTCAAC	
03470-3_4_fwd	gaacccatgTGAGCCGTCCTCGCCGG	<i>Deleção de PA14_03470</i>
03470-3_4_rev	attcgagctcggtacccgggGGGTGATGCTCGACCCCG	
30840-1_2_fwd	cctgcaggtcgactctagagTCCGATAGCCGCTGCC	<i>Deleção de PA14_30840</i>
30840-1_2_rev	gcaacagttaCATGCCCTCGTCCAGGC	
30840-3_4_fwd	gagggcatgTAACTGTTGCGCCGCTTAAG	<i>Deleção de PA14_30840</i>
30840-3_4_rev	attcgagctcggtacccgggAGCCGACGTTGACCGAAC	
33920-1_2_fwd	cctgcaggtcgactctagagTTCCATGCCGCGGAAGGC	<i>Deleção de PA14_33920</i>
33920-1_2_rev	aacctgcctaCATTGTCGTCCCGTCTTGG	
33920-3_4_fwd	gacgacaatgTAGGCAGGTTCCACGCGG	<i>Deleção de PA14_33920</i>
33920-3_4_rev	attcgagctcggtacccgggTCGCTGTCGGTCGCATAG	
36920_1-2_fwd	cctgcaggtcgactctagagCCAGGAGAATGTCTTCTCG	<i>Deleção de PA14_36920</i>
36920_1-2_rev	tcggtggtcaCATCGTGCAGATTGCCCG	
36920_3-4_fwd	ctgcacgatgTGACCACCGAGGAGCCCG	<i>Deleção de PA14_36920</i>
36920_3-4_rev	attcgagctcggtacccgggTCCTCGCCTTCGTGGTACG	

Tabela 3: Continuação

Iniciadores de DNA	Sequência	Uso
45620_1_2_fwd	cctgcaggtcgactctagagGCGAGCCGTATACGAGGC	<i>Deleção de PA14_45620</i>
45620_1_2_rev	gccggcttcaCATGTTCTTGTCCAAGTAAACCTCC	
45620_3_4_fwd	caagaacatgTGAAACCGGCCAAGAGGG	<i>Deleção de PA14_45620</i>
45620_3_4_rev	attcgagctcggtacccgggTCCCAGAGACGTGTTACTCGAAAG	
46360-1_2_fwd	cctgcaggtcgactctagagCCACAGGCGGCAAGGGCG	<i>Deleção de PA14_46360</i>
46360-1_2_rev	catggtgctaCATTCTTGTAGTCTCCAGGAGTCGCAGTTTC	
46360-3_4_fwd	tacaagaatgTAGCACCATGGGCACGCC	<i>Deleção de PA14_46360</i>
46360-3_4_rev	attcgagctcggtacccgggCGGCGATCCTCGACCACC	
64570-1_2_fwd	cctgcaggtcgactctagagGGCGGCGAGATGCCAGGC	<i>Deleção de PA14_64570</i>
64570-1_2_rev	ggcgctcctcCATGTCTCGTTCCTCCCTCGTTCCG	
64570-3_4_fwd	acgagacatgGAGGAGCGCCCGTGCCCG	<i>Deleção de PA14_64570</i>
64570-3_4_rev	attcgagctcggtacccgggACGTTCTCGGCCAGCCC	
46990-1_2_fwd	cctgcaggtcgactctagagAGACCTGCGCCGCGACGC	<i>Deleção de PA14_46990</i>
46990-1_2_rev	ctccggcctaCAAGACATGCGGATCGTCTTCGACGATCAG	
46990-3_4_fwd	gcatgtcttgTAGGCCGAGCGCCCTCTTC	<i>Deleção de PA14_46990</i>
46990-3_4_rev	attcgagctcggtacccgggACCGCGCCTGCAGGGTG	
70790-1_2_fwd	cctgcaggtcgactctagagGTTACCAACCCGGCGAAG	<i>Deleção de PA14_70790</i>
70790-1_2_rev	aaaccgctcaCATCGACTTCTCTGGACAG	
70790-3_4_fwd	gaagtcgatgTGAGCGGTTTTTTTCCCGAC	<i>Deleção de PA14_70790</i>
70790-3_4_rev	attcgagctcggtacccgggATGGCGAAGTTCGGCAGG	
00430-1_2_fwd	cctgcaggtcgactctagagTCGAAAGCATGAGCCGCC	<i>Deleção de PA14_00430</i>
00430-1_2_rev	gggatcctcaCATGCGAACCTTCTTTGAATGC	
00430-3_4_fwd	ggttcgatgTGAGGATCCCATGCGAAC	<i>Deleção de PA14_00430</i>
00430-3_4_rev	attcgagctcggtacccgggGATTCCGGCGGTGCTCAG	
pEX18AP_rev	CTCTAGAGTCGACCTGCAGGC	<i>Plasmid amplification for SLIC cloning</i>
pEX18AP_fwd	CCCGGGTACCGAGCTCGAAT	
LEFT_pJN105_Atvr	GAATTC AGAGGCGCAATGAGTTCG	<i>atvR coding region, for pJN105 cloning</i>
RIGHT_pJN105_Atvr	AAGCTT CTGGCGGTCGAGATGTTT	

Tabela 3: Continuação

Iniciadores de DNA	Sequência	Uso
qRT_narK2_left	CTTCAAGCGCAAGCACAA	
qRT_narK2_right	GGGGAACTGGGTCTTGCT	<i>narK2</i> qRT-PCR
qRT_narG_left	AACGATGACCTCGGCAAG	
qRT_narG_right	GGTGGTGACCAGGTCGAG	<i>narG</i> qRT-PCR
qRT_narH_left	AGTCGCCGGTGTACAAGC	
qRT_narH_right	GGTGGCACGTACCAGACC	<i>narH</i> qRT-PCR
qRT_nirC_left	CTGACGTTGCCTGTCCT	
qRT_nirC_right	TCCTGCAACAGCAGGTGA	<i>nirC</i> qRT-PCR
qRT_nirS_left	GTTGCCGTGATCGACTCC	
qRT_nirS_right	GCCGTA ¹ CTTGGGATGCAC	<i>nirS</i> qRT-PCR
qRT_nirQ_left	AACCCCGGCTACCAGAAC	
qRT_nirQ_right	GGGTAGTCGAAGCGCAAC	<i>nirQ</i> qRT-PCR
qRT_phzS_left	ACCATGATCGTCGCCAAC	
qRT_phzS_right	CCATGCACACCCAGTTCA	<i>phzS</i> qRT-PCR
qRT_phzM_left	CAAGAGGTGCCGTCCAAC	
qRT_phzM_right	ATTGCCGAGCAACCTCAG	<i>phzM</i> qRT-PCR
qRT_hcnA_left	GGGCAGACATGACCATCC	
qRT_hcnA_right	GGCATTGAGCACGTTGAG	<i>hcnA</i> qRT-PCR
qRT_katA_left	TGTTGCTGCAGGACGTGT	
qRT_katA_right	CGGTGAAGGTGCCATAGG	<i>katA</i> qRT-PCR
qRT_anr_left	CAGATCACCGCTTCCAC	
qRT_anr_right	ATCTCGCAGACCGAGGTG	<i>anr</i> qRT-PCR
qRT_dnr_left	GGCGCACGCCTTCTACTA	
qRT_dnr_right	AGTTCGGGGTGTCCATGA	<i>dnr</i> qRT-PCR
qRT_narL_left	CGGCTACCTGCTCAAGGA	
qRT_narL_right	GCGAGGATCTGGGTCAAC	<i>narL</i> qRT-PCR
qRT_atvR_left	CCCGCAAATGAAGGTGAT	
qRT_atvR_right	GCTGCGCTTGCTGATGTA	<i>atvR</i> qRT-PCR

¹Os sítios de restrição inseridos nos produtos de PCR estão destacados em negrito.²A sequência do vetor para o SLIC está em letra minúscula.

3.3. Construção dos mutantes não polares

A fim de se evitar efeitos polares nos genes adjacentes aos genes de interesse, foram construídos mutantes nos reguladores de respostas que não estavam disponíveis na biblioteca de transposon.

Para construir tais mutantes, *primers* flanqueando a região a montante e a jusante da região codificadora dos genes de interesse foram desenhados (**Tabela 3**). Para o mutante em *atvR*, os amplicons foram clonados no plasmídeo pNPTS138 entre os sítios EcoRI e HindIII para gerar o pNPTS138 Δ *atvR*. Para os demais mutantes de deleção construídos neste trabalho, as regiões flanqueando a montante e a jusante da região codificante foram amplificadas com os *primers* listados na **Tabela 3**. Os amplicons foram então clonados no pEX18Ap utilizando uma clonagem independente de ligação e sequenciamento (Jeong *et al.*, 2012). As construções resultantes foram utilizadas para introduzir a deleção no gene de interesse no genoma da linhagem selvagem por recombinação homóloga, gerando os mutantes simples apresentados na **Tabela 2**. Para a construção dos duplos mutantes (Δ *atvR*/ Δ *anr*, Δ *atvR*/ Δ *dnr*) e o triplo mutante (Δ *atvR*/ Δ *narXL*) foi utilizado a linhagem Δ *atvR* como base. Os mutantes foram construídos via recombinação homóloga como já descrito anteriormente (Hmelo *et al.*, 2015). Todos os mutantes foram confirmados por PCR.

Para a construção do plasmídeo superexpressando *atvR*, a região codificadora de *atvR* foi amplificada e clonada no vetor pGEM-T e o plasmídeo resultante foi digerido nos sítios EcoRI e SpeI. Este fragmento foi purificado e clonado no plasmídeo pJN105 gerando o pAtvR. Os plasmídeos pAtvR ou pJN105 foram introduzidos nas linhagens PA14, e nos mutantes das via de desnitrificação, como detalhado em resultados.

3.4. Ensaios de infecção *in vitro*

3.4.1. Cultura dos macrófagos

A linhagem celular de macrófagos murinos J774 foi mantida em meio R-10 (RPMI 1640 suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB), 2 mM L-glutamina, 40 µg/mL gentamicina) a 37°C em 5% CO₂. Os macrófagos foram contados em câmara de Neubauer, utilizando solução de azul de tripan para excluir as células mortas. Os macrófagos foram plaqueados na concentração desejada em meio R-10 sem antibiótico e acrescido de 10 ng/mL IFN-γ e mantidos a 37°C em 5% CO₂.

3.4.2. Ensaios de *clearance* bacteriano

A linhagem selvagem PA14 e os mutantes por transposon ou de deleção foram cultivados em meio LB até uma DO_{600nm} = 2. Essas culturas foram diluídas em meio R-10 sem antibiótico, obtendo-se uma concentração de aproximadamente 5 x 10⁶ bactérias/mL. O número de unidades formadoras de colônias (CFU) foi confirmado via diluição em série e inóculo em placas LB-água, sendo as colônias contadas após 16-18h a 37°C. Os macrófagos, previamente semeados em placas de 96 poços a uma concentração de 1 x 10⁵ macrófagos/poço, foram infectados a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 10. Após a infecção, amostras do sobrenadante contendo as bactérias foram coletadas em tempos determinados e o número de CFU foi determinado como descrito acima. Quando indicado, os resultados referem-se a porcentagem de CFU/mL recuperado pelos macrófagos infectados com a linhagem mutante em comparação aos macrófagos infectados com a linhagem selvagem, considerado como 100%.

Alternativamente para os ensaios de fagocitose e evasão, os macrófagos previamente semeados foram tratados ou não com o inibidor da NADPH oxidase

diphenyleneiodonium (DPI) por quatro horas. As bactérias foram adicionadas a uma MOI de 10, e, após uma hora de infecção, o sobrenadante foi removido e meio R-10 contendo 200 μg de gentamicina foi adicionado à cultura mista, para eliminar as bactérias presentes no meio extracelular. Após 30 minutos de incubação com gentamicina, as células foram lavadas com PBS e meio R-10 sem antibiótico foi adicionado. Este ponto foi definido como tempo zero. Após os tempos indicados nos resultados, o sobrenadante foi coletado e diluído seriadamente, as bactérias foram plaqueadas e o número de CFU, correspondente às bactérias no sobrenadante, foi determinada. Para determinar a quantidade de bactérias intracelulares, os macrófagos foram lavados com PBS e lisados com PBS contendo 0,1% de Triton X-100; os lisados foram diluídos seriadamente e plaqueados, e o número de CFU determinado.

3.4.3. Ensaio de citotoxicidade

Para verificar a citotoxicidade da linhagem selvagem e dos mutantes frente à cultura de macrófagos, ou seja, a capacidade das bactérias de lisarem os macrófagos, foi realizado o mesmo protocolo de infecção descrito no item acima. Após o período de infecção, a placa foi centrifugada a 200 g por 5 min e o sobrenadante foi recolhido. A citotoxicidade foi verificada pela atividade da lactato desidrogenase (LDH) liberada pelos macrófagos no sobrenadante, utilizando-se o kit Cytotox 96 Nonradioactive cytotoxicity Assay (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante.

3.4.4. Avaliação da secreção de TNF- α

Para a quantificação de TNF- α , foi utilizado o mesmo método de infecção referido no item 3.4.2, com algumas modificações. Foram plaqueados 5×10^5 macrófagos/poço, em placas de 24 poços. Após 3 horas de infecção, o sobrenadante

foi recolhido e o TNF- α quantificado via ELISA (R&D systems), de acordo com as recomendações do fabricante.

3.5. Ensaio de infecção *in vivo*

3.5.1. Animais

Camundongos fêmeas da linhagem BALB/c com 8-12 semanas de vida foram obtidos do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em padrão SPF (*specific pathogen free*) e alimentados com ração comercial irradiada. Todos os experimentos estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sendo aprovada pela Comissão Ética em Uso de Animais (CEUA/IQ-USP) número de certificado 17/2015 (**Anexo I**).

3.5. Infecção intra-traqueal

A linhagem selvagem PA14 e os mutante $\Delta atvR$ foram cultivados como descrito acima (**item 3.4.2**), com algumas modificações. Após atingirem a $DO_{600nm} = 2$, as bactérias foram centrifugadas a 12000 g por 3 min, e o precipitado lavado com PBS estéril, sendo as bactérias suspensas em PBS. Os animais foram pré-anestesiados com 10 mL/kg de uma solução 0,4% de cloridrato de 2-(2,6- xiidino) 5,6 dihidro-4H-1,3-tiazina pela via intraperitoneal e anestesiados com a administração de cetamida + xilasina (100 + 10 mg/kg) pela via intraperitoneal. Os animais (N=8 para cada linhagem bacteriana) foram infectados via intra-traqueal como já descrito (Cai *et al.*, 2012), com algumas modificações. Após a anestesia, foi feita uma incisão medioventral e os músculos foram isolados, expondo a traqueia. A suspensão bacteriana (2×10^6 bactérias/60 μ L) em PBS foi inoculada intra-traquealmente. A quantidade de bactérias

inoculadas foi confirmada por diluição seriada do inóculo inicial e contagem das CFU. Como controle, 60 μ L de PBS estéril foram inoculados intra-traquealmente (N=3).

3.5.3. Sobrevivência

Após a infecção intra-traqueal, os animais infectados com a linhagem selvagem ou o mutante $\Delta atvR$ foram acompanhados. O grau de moribundidade foi determinado avaliando-se: a respiração rápida, lenta, ofegante ou difícil, rápida perda de peso (perda de 20% do peso a partir do tempo 0 de infecção), anorexia, postura curvada (*hunched*), hipo/hipertermia (variações acima ou abaixo de 4-6°C), ulceração severa, dermatite, diarreia ou constipação, paralisia ou locomoção debilitada e/ou letargia. Os animais que apresentassem um alto grau de moribundidade foram sacrificados em câmara de CO₂, considerando-os como “mortos” na análise de dados. Os dados foram analisados utilizando-se a curva de sobrevivência de Kaplan-Meier e a significância foi calculada utilizando o teste log-rank (Koh *et al.*, 2009).

3.5.4. Determinação do número de unidades formadoras de colônia nos órgãos após infecção

Após 24 horas de infecção com a linhagem selvagem ou o mutante $\Delta atvR$, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, os órgãos (pulmão, fígado, e baço) foram retirados cirurgicamente e macerados mecanicamente em 1mL de PBS. Os sobrenadantes foram diluídos em série e semeados em placas LB-ágar, mantidas por 16-18 horas a 37°C, quando o número de colônias foi determinado.

3.5.5. Quantificação das citocinas do pulmão

Após 24 horas da infecção, os grupos infectados e controle foram eutanasiados, retirando-se o pulmão. Após a maceração do órgão, como descrito acima, o macerado foi centrifugado a 12000 g por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram utilizados

para a quantificação das citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-10 via ELISA (R&D systems), de acordo com as recomendações do fabricante dos kits.

3.5.6. Imunofenotipagem pulmonar

Células pulmonares foram purificadas de camundongos BALB/c como descrito (Gonzalez-Juarrero & Orme, 2001). Após 24 horas de infecção, os animais foram sacrificados, retirando-se o pulmão, que foi incubado por 30 minutos a 37°C na presença de tampão de digestão, contendo 0,7 mg/mL de colagenase IV em PBS. Após esse período, o tecido foi macerado para liberação das células, as partículas maiores foram removidas passando-se a suspensão através de uma membrana de nylon, com posterior centrifugação a 500 g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, lavando-se o precipitado com tampão hemolítico (310 mM NH₄Cl, 12 mM NaHCO₃, 130 μ M EDTA), para a remoção dos eritrócitos. As células foram centrifugadas e suspensas em PBS com 3% SFB e contadas em câmara de Neubauer, utilizando solução de azul de tripan para excluir as células mortas.

Foram utilizadas cerca de 5×10^6 células para a marcação, adicionando-se anticorpos conjugados com diferentes fluorocromos numa combinação distintas de fluoróforos: F4/80-PECy5 (BM8), CD11c-FITC (HL3), CD11b-PE (M1/70) e Ly6G/Ly6C-APC (RB6-8C5), incubando-se por 20 minutos em gelo. Após a incubação, as células foram centrifugadas e lavadas com PBS com 3% SFB, utilizando-se as mesmas condições já descritas neste item. O precipitado foi suspenso em PBS com 3% SFB. Para a análise por citometria de fluxo foi utilizado o aparelho FacsCanto II e os dados gerados foram analisados posteriormente com o software FlowJo.

Para distinguir células autofluorescentes de células que expressam pequenas concentrações de marcadores de superfície, utilizou-se a metodologia de fluorescence-

minus-one (FMO) (Roederer, 2001). Controles FMO são determinados através da marcação das células com todos os anticorpos/marcadores, exceto aquele que será analisado. Os valores obtidos nessa análise são considerados como o limite de FMO e todos os valores de fluorescência acima deste são considerados positivos. O nível de fluorescência da população de interesse, obtido no canal no qual será medido um determinado marcador, revelará a auto-fluorescência inerente daquela população alvo. Esse valor permite estabelecer um limite com o qual se faz a distinção entre células auto-fluorescentes e aquelas que expressam um determinante que se ligará ao anticorpo fluorescente usado para detectá-lo. (Herzenberg *et al.*, 2006).

3.6. Curva de crescimento

Para as curvas de crescimento, as linhagens foram crescidas overnight em LB ou meio R-10, e ajustadas para uma OD₆₀₀ de 0,1 em LB ou meio R-10 com ou sem gentamicina, e 1 mL da amostra foi transferida para placas de 24 poços. O crescimento foi determinado pela OD₆₀₀ em intervalos de 15 minutos no SpectraMax Paradigm multimode microplate reader a 37C e baixa agitação orbital. Alternativamente, as linhagens bacterianas foram crescidas até uma OD₆₀₀ de 2 em meio LB com ou sem gentamicina e arabinose. As bactérias foram diluídas a uma concentração de 5×10^6 bactérias/mL em meio R-10 com (para a linhagem $\Delta atvR/pJN105$ e $\Delta atvR/pAtvR$) ou sem (para a linhagem PA14 e $\Delta atvR$) 50 μ g/mL de gentamicina e 0,2% de arabinose. 200 μ L da suspensão bacteriana foi adicionada a uma placa de 96 poços e a placa foi incubada por 4h e 30min a 37C em 5% CO₂, a mesma condição utilizada para o ensaio *in vitro* de virulência. Nos pontos indicados, cada cultura foi diluída seriadamente e o CFU foi determinado.

3.7 Análise de RNA-Seq

Detalhes sobre a padronização referente ao sequenciamento em larga escala (RNA-Seq) realizada durante o desenvolvimento deste trabalho estão descritas no **anexo IV**. Brevemente, as linhagens PA14/pJN105 e PA14/pAtvR foram crescidas em meio LB contendo 0,2% de arabinose e 50 µg/mL de gentamicina a 37°C até uma OD₆₀₀ de 1. Duas réplicas biológicas foram analisadas para cada linhagem. As células foram coletadas após a adição do RNAProtect (Qiagen), o RNA total foi isolado utilizando o RNeasy minikit (Qiagen) e a qualidade determinada via Bioanalyzer. As amostras foram enriquecidas para mRNA utilizando o Ribo-Zero rRNA removal kit (for Gram-negative bacteria; Illumina), e a depleção do rRNA confirmada utilizando-se o Bioanalyzer. Bibliotecas *paired-end* foram construídas com o TruSeq RNA library preparation kit (v2). O tamanho médio do fragmento foi determinado utilizando-se o Bioanalyzer, e a concentração de cada biblioteca foi determinada utilizando-se o Kapa library quantification kit (Kapa Biosystems) de acordo com o protocolo do fabricante. Todas as amostras foram sequenciadas no MiSeq (Illumina) no modo *paired-end*.

3.8 Quantificação da expressão gênica.

Os *reads* resultantes foram separados de acordo com o seu *barcode*, e o mesmo removido. Para cada amostra, a qualidade dos *reads* foi determinada utilizando-se o FastQC, e a extremidade 3' aparada com o auxílio do FastX toolkit. Após esse passo, as sequências foram mapeadas e contadas ao genoma da linhagem referência *P. aeruginosa* PA14 utilizando-se o programa EDGE-Pro (Magoc *et al.*, 2013). O pacote de R EDGE-R (Robinson *et al.*, 2010) foi utilizado para análise de expressão diferencial. Genes foram classificados diferencialmente expressos se o log₂-fold change fosse maior que 1 ou menor que -1 e se o valor de p ajustado via o procedimento de Benjamini-Hochberg fosse menor que 0,05.

3.9 Hipóxia

Os experimentos foram realizados em condições de hipóxia, como já descrito anteriormente com algumas modificações (Cooper *et al.*, 2003). Brevemente, as linhagens bacterianas foram crescidas em condições aeróbias em meio LB e diluídas em 1 mL de meio LB com ou sem 50 mM de nitrato em um microtubo de 1,5mL. As culturas foram mantidas por 24 horas em um frasco com vela (*candle jar*). Após essa incubação, a OD₆₀₀ foi determinada e o RNA total foi extraído como descrito abaixo.

3.10 qRT-PCR

As linhagens PA14/pJN105 ou PA14/pAtvR foram crescidas nas mesmas condições descritas para o RNA-Seq. Para a condição de hipóxia, as amostras foram incubadas ou não em um frasco com vela e coletados após 3h (normóxia) ou após 24 horas da inoculação (hipóxia). Alternativamente, as linhagens mutantes em *anr*, *dnr*, *narXL*, e/ou *atvR* foram crescidas até uma OD₆₀₀ de 2 em meio LB com 50 mM KNO₃. As amostras foram incubadas em um frasco com vela e coletadas após 4 horas. Todas as amostras de RNA foram extraídas com o reagente TRIzol (Invitrogen), tratadas com DNase I (Thermo Scientific), e utilizadas para a síntese de cDNA com a RevertAid reverse transcriptase (Thermo Scientific) e random hexamer primers (Thermo Scientific). O cDNA foi utilizado como molde para o RT-PCR quantitativo (qRT-PCR) utilizando Maxima SYBR green-carboxy-X-rhodamine quantitative PCR máster mix (Thermo Scientific) e o aparelho StepOne Plus real-time PCR system (Applied Biosystems). Os primers utilizados estão listados na tabela 2. A expressão foi normalizada utilizando-se o gene *nadB*, e a expressão relativa foi calculada utilizando-se pelo menos três réplicas biológicas. A expressão foi apresentada como a taxa de expressão (fold-change) com o desvio padrão (SD) (Livak and Schmittgen, 2001).

4. Resultados e Discussão

4.1. Triagem de RR envolvidos na virulência de *P. aeruginosa*

Para compreender o papel dos reguladores de resposta (RR) na virulência de *P. aeruginosa*, foram utilizados mutantes nos genes que os codificam, inicialmente em um modelo de infecção de macrófagos. Esses mutantes foram obtidos de uma biblioteca por transposon anotada (Liberati *et al.*, 2006). Uma das limitações do uso dessa biblioteca é que ela contém apenas 57 de 76 mutantes por transposon nos RRs de *P. aeruginosa* PA14, correspondendo a 75% do total. Para complementar os ensaios aqui descritos, foram utilizados mutantes por deleção em 16 RRs adicionais, totalizando 85%. Outro fator a ser considerado são possíveis efeitos polares da inserção do transposon nos genes adjacentes.

Inicialmente, para avaliar o papel dos RR, foi utilizado o ensaio de *clearance* bacteriano, utilizando-se macrófagos J774 estimulados com IFN- γ e infectados com 23 mutantes por transposon. Nesse ensaio, é possível medir a capacidade dos macrófagos de eliminar as bactérias, resultando em um decréscimo no número de bactérias no meio extracelular. Após a incubação das bactérias com os macrófagos em uma multiplicidade de infecção de 10 (MOI=10), o meio líquido foi coletado e as unidades formadoras de colônias (CFU) foram enumeradas.

Foi observado um aumento do *clearance* bacteriano para os mutantes nos genes de reguladores de resposta PA14_02260, *pilG*, *czcR*, PA14_00430, *agtR*, *exaE*, *gacA*, PA14_26570 e *bfiR*, em comparação aos macrófagos infectados com a linhagem selvagem, considerado como 100% (**Figura 4**). Por outro lado, o mutante em *gltR* apresentou um menor *clearance* bacteriano mediado pelos macrófagos em comparação aos macrófagos infectados com a linhagem selvagem. Como controle

neste e nos ensaios a seguir, foi utilizado o mutante no RR *gacA*, cuja função está relacionada com a virulência de *P. aeruginosa* em diversos modelos (Rahme et al., 1997), conforme descrito na Introdução.

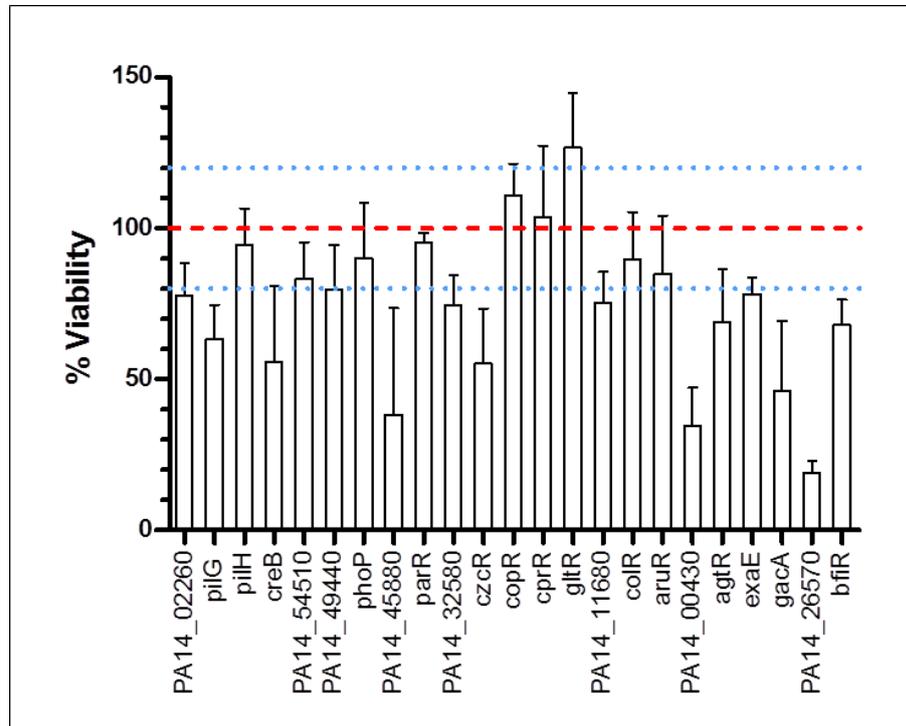


Figura 4. Efeito da ausência de RR selecionados na viabilidade das bactérias incubadas com macrófagos. Noensaio de *clearance* bacteriano, macrófagos J774 estimulados com 10 ng/mL de IFN- γ foram infectados com *P. aeruginosa* PA14 ou mutantes por transposon para os RR, em uma MOI de 10. Após 3 horas de infecção, o sobrenadante foi coletado, diluído e o número de unidades formadoras de colônia (CFU) foi determinado. O resultado mostrado é representativo de 3 experimentos independentes repetidos em triplicata, as barras representam a média \pm desvio padrão. 100% corresponde ao número de CFU/ml recuperados após a incubação dos macrófagos com a linhagem selvagem.

Macrófagos infectados com as linhagens mutantes em *PA14_02260*, *pilG*, *pilH*, *PA14_27940*, *PA14_20780*, *wspF*, *wspR*, *PA14_40570*, *rocR*, *PA14_30830*, *PA14_63210*, *PA14_49440*, *phoP*, *parR*, *czcR*, *copR*, *gltR*, *phoB*, *PA14_00430*, *agtR*, *exaE*, *PA14_26570*, *erdR*, *PA14_16350*, *narXL*, *rocA1*, *PA14_11120*, *bfiR*, *pprB*, *fleR*, *pilR*, *ddcD*, *algB*, *mfiR*, *algR*, *roxR* e *nasT* apresentaram uma maior produção de TNF- α em comparação aos macrófagos infectados com a linhagem selvagem (**Figura 5** e **Tabela 4**). Entretanto, os macrófagos infectados com as linhagens mutantes *creB*, *PA14_32580*, *gacA*, *rocA2* e *ntrC* apresentaram uma diminuição da secreção de TNF-

α em comparação aos macrófagos infectados com a linhagem selvagem (**Figura 5 e Tabela 4**). A diminuição da produção de TNF- α em macrófagos infectados pelo mutante em *gacA* é interessante, pois esse fenótipo não foi caracterizado até o presente momento, uma vez que seria esperado que os macrófagos infectados com o mutante em *gacA* apresentassem um aumento na secreção de TNF- α em comparação aos macrófagos infectados com a linhagem selvagem, já que a mutação nesse gene reduz a virulência em diversos modelos de infecção (Rahme *et al.*, 1997). Uma possibilidade para a diminuição da secreção do TNF- α pelos macrófagos infectados com o mutante em *gacA* pode ser a supreexpressão do T3SS (Brencic *et al.*, 2009). O T3SS injeta toxinas dentro da célula alvo, como a fosfolipase ExoU, sendo capaz de inibir a via das MAPKs ERK1/2 e p38 (Mota and Cornelis, 2005). Logo, no mutante em *gacA* pode ocorrer um aumento tanto da expressão do sistema como dos efetores do T3SS, acarretando na maior translocação da exotoxina ExoU dentro do macrófago, inibindo as vias das MAPKs e diminuindo a produção de TNF- α .

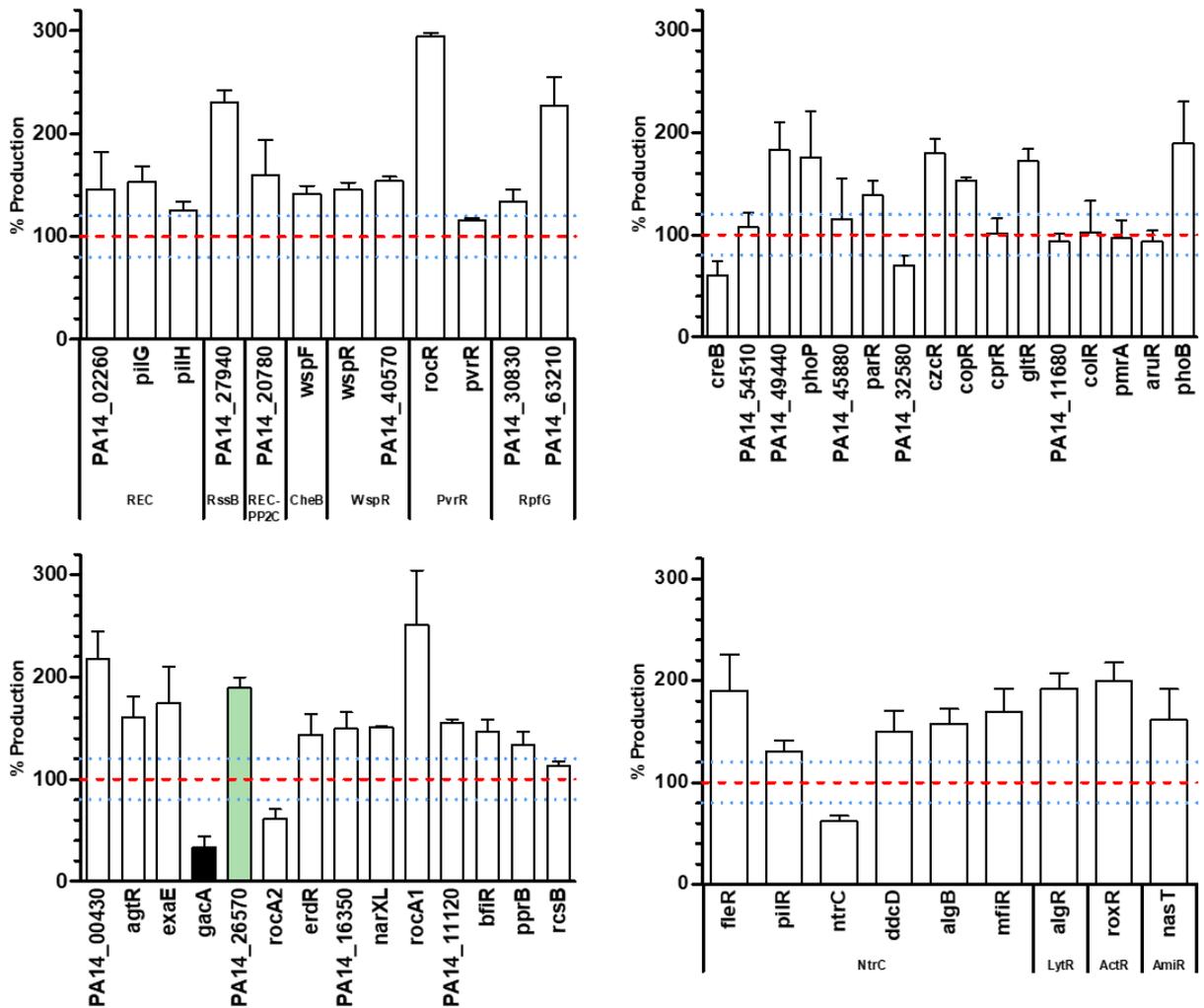


Figura 5. Macrófagos infectados com diferentes linhagens mutantes nos RR apresentam taxas variáveis de produção de TNF- α . Macrófagos J774 estimulados com 10 ng/mL de IFN- γ foram infectados com *P. aeruginosa* PA14 ou mutantes, em uma MOI de 10. Após 3 horas de infecção, o sobrenadante foi coletado e a concentração de TNF- α determinada via ELISA. Representativo de três experimentos independentes, repetidos em triplicata; as barras representam a média \pm desvio padrão. 100% corresponde a citocina produzida após a incubação dos macrófagos com a linhagem selvagem.

Adicionalmente, foi utilizado um modelo de infecção em *Drosophila melanogaster* que mimetiza a infecção crônica. Nessa triagem, diversos mutantes apresentaram também uma menor virulência em comparação à linhagem selvagem, sendo que as drosófilas infectadas com estes mutantes atenuados apresentaram uma maior sobrevivência (Tabela 4). Dentre os 40 mutantes testados para virulência em macrófagos e em *Drosophila*, 22 (55%) apresentaram atenuação de virulência tanto em macrófagos como em drosófilas (Figura 6 e Tabela 4).

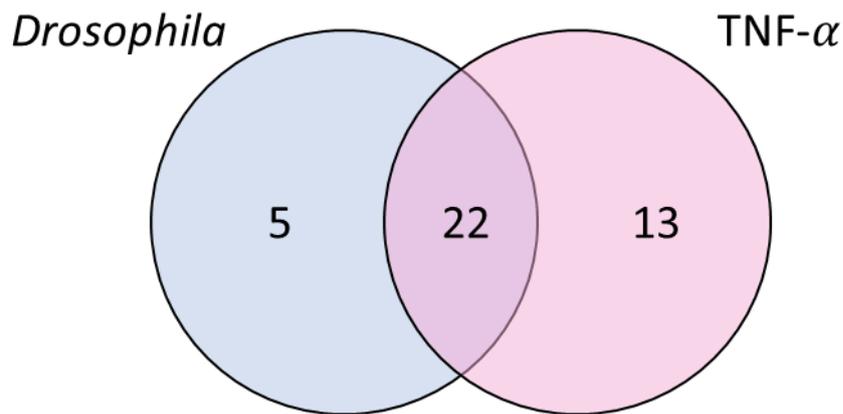


Figura 6. Diversos RR são importantes para a virulência em macrófagos e em *Drosophila*. Diagrama de Venn mostrando a intersecção entre os RR importantes para virulência em macrófagos *in vitro* e o modelo de *feeding* de *Drosophila*, com 55% deles sendo essenciais nos dois modelos.

Estudos anteriores em larga escala utilizando a técnica de Tn-Seq identificaram diversos RR possivelmente importantes para a colonização do trato gastrointestinal (GI) de camundongos (Skurnik *et al.*, 2013), infecção aguda ou crônica (Turner *et al.*, 2014). Neste tipo de ensaio, uma biblioteca de mutantes é usada como inóculo e, ao final do ensaio, as bactérias são recuperadas e têm seus sítios de inserção de transposon sequenciados. Uma menor recuperação de um determinado mutante presente no inóculo indica que o gene interrompido é importante para a colonização ou *fitness* neste modelo, tendo perdido a competição para as outras linhagens presentes. Um destes ensaios foi complementado por estudos de expressão diferencial por RNA-Seq, a fim de definir quais genes seriam diferencialmente expressos *in vivo* (Turner *et al.*, 2014). Ao comparar os dados obtidos no presente trabalho com os dados já publicados (**Figura 7 e Tabela 4**), foi possível observar que diversos RR devem ser importantes para a virulência de *P. aeruginosa* em modelos distintos, validando a estratégia aqui utilizada e mostrando que determinados RR são requeridos para o sucesso em mais de um modelo de infecção.

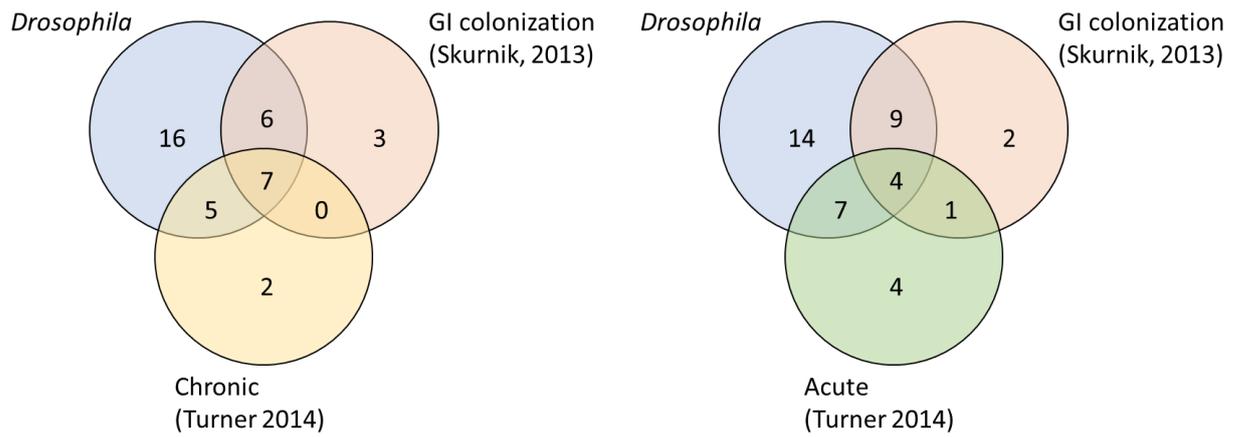


Figura 7. Diversos RR que são importantes para a virulência em *Drosophila* participam na infecção aguda ou na colonização do hospedeiro. Os RR que apresentaram diminuição da virulência em *Drosophila* foram comparados com os dados de Tn-Seq descritos por Skunik *et al*, 2013, e Turner *et al*, 2014.

Tabela 4: Fenótipos dos mutantes em RR em diferentes modelos de virulência.

Família RR	Gene	Liberação de TNF- α por macrófagos (este trabalho)	Virulência em <i>Drosophila</i> (este trabalho)	Fitness no modelo de virulência (Tn-Seq) ou expressão diferencial no modelo de virulência (RNA-Seq)		
				colonização GI (Skurnik, 2013)	queimadura (Turner 2014)	infecção crônica (Turner 2014)
REC	<i>PA14_02260</i>	+	-	-		-
	<i>pilG</i>	+				
	<i>pilH</i>	+	-		-	-
	<i>cheY</i>	nd	-	-	-	-
	<i>PA14_36920</i>	nd	nd	-		-
	<i>PA14_26830</i>	nd	nd			
RssB	<i>PA14_27940</i>	+		-		
REC-PP2C- RsbW	<i>PA14_20780</i>	+				
CheB	<i>cheB2</i>	nd				
	<i>chpB</i>	nd				
	<i>PA14_45580</i>	nd			-	
	<i>wspF</i>	+				
WspR	<i>PA14_57140</i>	nd	nd		+	-
	<i>wspR</i>	+				
	<i>PA14_64050</i>	nd	nd		+	
	<i>PA14_20820</i>	nd	nd			
	<i>PA14_40570</i>	+				-
PvrR	<i>rocR</i>	+	nd			
	<i>pvrR</i>		nd			
RpfG	<i>PA14_30830</i>	+	-			
	<i>PA14_63210</i>	+		-		
CheV	<i>PA14_20750</i>	nd		-	-	

Tabela 4: Continuação

Família RR	Gene	Liberação de TNF- α por macrófagos (este trabalho)	Virulência em <i>Drosophila</i> (este trabalho)	Fitness no modelo de virulência (Tn-Seq) ou expressão diferencial no modelo de virulência (RNA-Seq)		
				colonização GI (Skurnik, 2013)	queimadura (Turner 2014)	infecção crônica (Turner 2014)
HDOD	<i>PA14_03470</i>	nd	-	-	+	-
REC-HisK	<i>PA14_30840</i>	nd	-			
Others	<i>PA14_70790</i>	nd				-
	<i>creB</i>	-	-			
	<i>PA14_54510</i>					
	<i>PA14_52250</i>	nd	nd			
	<i>PA14_49440</i>	+	-		-	
	<i>phoP</i>	+	-			
	<i>PA14_45880</i>		-			
	<i>kdpE</i>	nd	nd			
	<i>parR</i>	+				
OmpR	<i>PA14_32580</i>	-			+	
	<i>czcR</i>	+	-	-		
	<i>bqsR</i>	nd	-	-		-
	<i>copR</i>	+	-			
	<i>cprR</i>		-	-		
	<i>gltR</i>	+	-	-		-
	<i>cpxR</i>	nd	nd	-		
	<i>PA14_11680</i>					-
	<i>colR</i>		-			
	<i>pmrA</i>		-			

Tabela 4: Continuação

Família RR	Gene	Liberação de TNF- α por macrófagos (este trabalho)	Virulência em <i>Drosophila</i> (este trabalho)	Fitness no modelo de virulência (Tn-Seq) ou expressão diferencial no modelo de virulência (RNA-Seq)		
				colonização GI (Skurnik, 2013)	queimadura (Turner 2014)	infecção crônica (Turner 2014)
OmpR	<i>irIR</i>	nd				
	<i>aruR</i>		-			
	<i>ompR</i>	nd	nd			-
	<i>phoB</i>	+	nd			
NarL	<i>PA14_00430</i>	+	-		-	
	<i>agtR</i>	+	-	-		
	<i>PA14_46360</i>	nd	-	-		
	<i>glpR</i>	nd	nd	-		
	<i>exaE</i>	+	-	-	-	-
	<i>PA14_33920</i>	nd	-	-	-	
	<i>gacA</i>	-	-		-	-
	<i>PA14_26570</i>	+	nd			
	<i>rocA2</i>	-	-		+	+
	<i>erdR</i>	+	-			
	<i>PA14_16350</i>	+	nd			
	<i>narXL</i>	+	-			
	<i>rocA1</i>	+	-			
	<i>PA14_11120</i>	+			-	
	<i>bfiR</i>	+	-	-		-
	<i>pprB</i>	+				
<i>rcsB</i>			nd			

Tabela 4: Continuação

Família RR	Gene	Liberação de TNF- α por macrófagos (este trabalho)	Virulência em <i>Drosophila</i> (este trabalho)	Fitness no modelo de virulência (Tn-Seq) ou expressão diferencial no modelo de virulência (RNA-Seq)		
				colonização GI (Skurnik, 2013)	queimadura (Turner 2014)	infecção crônica (Turner 2014)
NtrC	<i>fleR</i>	+	-		-	-
	<i>aauR</i>	nd	-			
	<i>pilR</i>	+	-			
	<i>cbrB</i>	nd	nd		+	
	<i>ntrC</i>	-				
	<i>ddcD</i>	+	-		+	-
	<i>algB</i>	+			-	
	<i>mfiR</i>	+	nd	-		
LytR	<i>algR</i>	+	nd			
ActR	<i>roxR</i>	+	-	-		
AmiR	<i>nasT</i>	+	nd	-		-

+: maior produção de TNF- α ou maior colonização do GI que a linhagem selvagem

-: menor produção de TNF- α , virulência atenuada em *Drosophila* ou menor *fitness* do mutante por Tn nos modelos indicados, em relação à linhagem selvagem

nd: não determinado

verde: menor expressão e rosa, maior expressão do gene em questão nos modelos indicados

Células em branco representam que não houve diferença significativa da linhagem mutante em relação à selvagem

Dentre os mutantes identificados nesta triagem, destaca-se o mutante em *PA14_26570*. O gene *PA14_26570* foi escolhido como um candidato promissor para análises de função e regulação, devido a algumas particularidades apresentadas abaixo.

4.2. PA14_26570, um RR atípico envolvido em virulência

4.2.1 Subfamília ALR (*aspartate-less receiver*) dos RR

Como mencionado anteriormente (**Seção 1.1**), o domínio REC dos RR apresentam uma estrutura secundária conservada importante para a sua atividade. O domínio REC classicamente possui resíduos críticos para a sua ativação, que incluem o aspartato no final da terceira fita beta, que pode ser fosforilado pela histidina quinase cognata (Bourret, 2010). Apesar dessa conservação, alguns RRs não possuem esse resíduo de aspartato ou algumas outras características e, portanto, são consideradas reguladores de resposta atípicos. Dentre os RR, recentemente uma subfamília foi classificada como ALR (do inglês, *aspartate less receivers*), estando presente em todos os filós bacterianos, totalizando cerca de 4% dos RR. Dentre as características presentes nessa subfamília, é importante destacar a substituição do aspartato para qualquer aminoácido (com exceção do triptofano) no sítio de fosforilação (Maule *et al.*, 2015). Usando uma abordagem computacional, quatro RRs de *P. aeruginosa* (*PA14_30650*, *PA14_26570*, *PA14_64050*, *PA14_03470*) foram anteriormente designados como pertencentes à subfamília ALR (Maule *et al.*, 2015).

Para seguir com a caracterização de *PA14_26570* e confirmar a classificação dos ALR de *P. aeruginosa*, um alinhamento múltiplo utilizando o domínio REC dos RR de *PA14* foi realizado com a ferramenta Muscle (Edgar, 2004). Como citado anteriormente, a estrutura secundária desse domínio é conservada, assim como o aspartato receptor do

grupo fosforila no fim da terceira fita beta nos RRs clássicos (**Figura 8**, marcado com asterisco). A estrutura secundária de CheY (PA14_45620), um RR canônico, foi utilizada como representativa nessa análise, que mostrou que apenas três dos 76 RR de *P. aeruginosa* podem ser classificados como ALR: PA14_26570, PA14_36920 e PA14_03470, sendo que PA14_26570 e PA14_03470 estão também presentes na classificação de Maule et al (2015). As proteínas GacA (PA14_30650) e PA14_64050, classificadas como sendo RRs atípicos por estes autores, possuem um aspartato no final da terceira fita beta, sendo, portanto, RRs típicos (**Figura 8**). Além disso, GacA é um dos reguladores de resposta melhor caracterizados e é fosforilado pela HK GacS (Goodman et al., 2009) (ver item 1.3 da Introdução). PA14_64050 é anotado como GcbA, um RR contendo o domínio de diguanilato ciclase (GGDEF) no seu C-terminal, mas não há informações sobre sua HK cognata (Petrova et al., 2014). Os três RR pertencentes a subfamília ALR como definido na nossa análise possuem uma substituição de aspartato para glutamato no final da terceira folha beta (**Figura 8**, destacado em laranja) e devem apresentar um estado sempre ativo, independente de fosforilação, já que o glutamato mimetiza a conformação ativa, por sua cadeia lateral ser maior que a do aspartato.

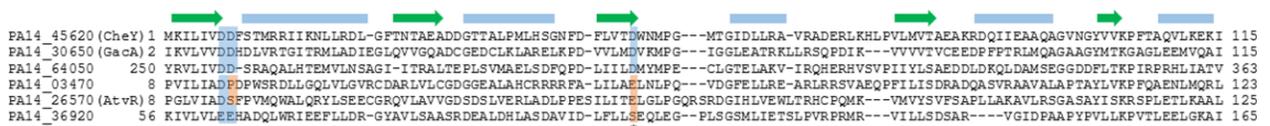


Figura 8: Alinhamento múltiplo de domínios REC de RR selecionados de *P. aeruginosa*. A seta verde acima da sequência corresponde a fitas beta e os retângulos azuis, a alfa-hélices na estrutura secundária. Os resíduos conservados nos sítios catalíticos nos RR clássicos estão destacados em azul e, em laranja, os resíduos divergentes nos RRs atípicos PA14_03470, AtvR e PA14_36920. O asterisco aponta o aspartato fosforilável nos RR clássicos, com uma substituição para glutamato nos RR atípicos. Os números correspondem à posição dos aminoácidos na estrutura primária de cada proteína. As sequências foram obtidas de www.pseudomonas.com (Winsor et al., 2016).

PA14_03470 é um ALR com uma arquitetura pouco caracterizada, do tipo REC-HDOD. O domínio HDOD (do inglês, *HD-related output domain*) pertence a superfamília HD, que é caracterizada sendo um domínio de fosfoidrolase metal-dependente (Aravind and Koonin, 1998). Entretanto, na família HDOD faltam resíduos importantes para a ligação do íon metálico, sendo difícil a predição da sua função quanto à atividade de fosfoidrolase ou fosfodiesterase, como por exemplo o domínio HD-GYP (Galperin, 2006). Em *Xanthomonas campestris*, GmsR (do inglês, *general stress and motility regulator*) apresenta uma arquitetura de domínios do tipo REC-HDOD, com 24% de identidade e 35% de similaridade a PA14_03470. O mutante em *gsmR* demonstrou uma redução da expressão de genes envolvidos na síntese do flagelo, com consequente diminuição da motilidade (Liu *et al.*, 2013). Curiosamente, o mutante em *PA14_03470* apresentou uma menor virulência no modelo de infecção crônica em *Drosophila* (**Tabela 4**) e é menos capaz de colonizar o trato gastrointestinal e feridas crônicas (Turner *et al.*, 2014), mas, paradoxalmente, apresentou um melhor *fitness* em um modelo de infecção aguda, podendo estar relacionado a um fenótipo hipervirulento (Turner *et al.*, 2014).

PA14_36920 pertence a subfamília CheY dos RRs, contendo apenas o domínio REC. A subfamília CheY está geralmente envolvida em interações proteína-proteína e, classicamente, está diretamente relacionada a motilidade e quimiotaxia, como por exemplo seu representante CheY de *E. coli*, que, uma vez fosforilado pela HK cognata CheA, é capaz de interagir com FliN, um componente do corpo flagelar, regulando a direção do movimento do flagelo (Sarkar *et al.*, 2010). Outro exemplo é a complexa regulação mediada por ChpA em *P. aeruginosa*. ChpA é uma histidina quinase com múltiplos domínios Hpt e um REC, capaz de fosforilar os RRs PilG e PilH, ambos pertencentes a subfamília CheY. PilG e PilH apresentam funções antagônicas,

envolvidos na extensão (PilG fosforilado) e contração (PilH fosforilado) do pilus tipo IV. A complexa regulação destes RRs que apresentam o mesmo domínio, sendo fosforilados por domínios HPT diferentes localizados na mesma histidina quinase (ChpA), demonstra o ajuste fino e temporal necessário para o correto funcionamento do maquinário bacteriano (Bertrand *et al.*, 2010; Inclan *et al.*, 2011; Persat *et al.*, 2015; Silversmith *et al.*, 2016). Até o presente momento, nenhum ALR pertencente a subfamília CheY foi caracterizado, portanto o papel de PA14_36920 na fisiologia e adaptação de *P. aeruginosa* ainda é desconhecido, sendo que este RR pode apresentar características interessantes, como interação proteína-proteína com outros RRs, formando heterodímeros, promovendo a liberação/formação do complexo em uma determinada condição e permitindo a ação/inibição do RR. Adicionalmente, o gene para esse RR foi o único da família REC que apresentou uma maior expressão tanto no modelo de queimadura como em um modelo de infecção crônica, em relação ao controle (Turner *et al.*, 2014). Mutantes que não expressam esse RR atípico também apresentaram um menor *fitness* durante a colonização do trato gastrointestinal e de um modelo de ferida crônica (**Tabela 4**) (Turner *et al.*, 2014).

PA14_26570 apresenta dois domínios conservados, o domínio REC e o domínio de ligação a DNA do tipo HTH. Essa arquitetura de domínios é típica da família de RR NarL (Galperin, 2006). Além da substituição do aspartato fosforilável (D61E), AtvR possui uma substituição num aminoácido importante para estabilização do fosfato em RR típicos (D15S) (**Figura 8**). A substituição de aspartato fosforilável para glutamato usualmente induz um estado sempre ativo, por mimetizar essa conformação (Klose *et al.*, 1993; Gao *et al.*, 2006; Arribas-Bosacoma *et al.*, 2007). Portanto, a atividade de AtvR deve ser independente de fosforilação e, conseqüentemente, independente de uma HK cognata,

e a sua presença na célula pode ser suficiente para a ativação da transcrição de genes-alvo. De acordo com os dados apresentados a seguir, PA14_26570 foi nomeado como *AtvR* (do inglês, *atypical virulence-related response regulator*).

4.2.2 *AtvR* é importante para a virulência contra macrófagos *in vitro*

Para confirmar que a diminuição da virulência do mutante em *atvR* da biblioteca de transposon não é devido a um efeito polar do transposon ou de mutações secundárias, o mutante não polar $\Delta atvR$ foi construído a partir da linhagem parental PA14, como descrito nos materiais e métodos.

Inicialmente, foi verificado se a linhagem mutante $\Delta atvR$ apresenta algum defeito de crescimento em meio rico, ou em condições semelhantes a utilizada no ensaio de infecção dos macrófagos. Não houve diferenças entre a linhagem selvagem e o mutante em *atvR* em meio rico (LB) (**Figura 9A**), ou no meio de cultura celular RPMI-1640 + 10% SFB (R-10) (**Figura 9B**), ou nas mesmas condições utilizadas para a infecção dos macrófagos (**Figura 9C**).

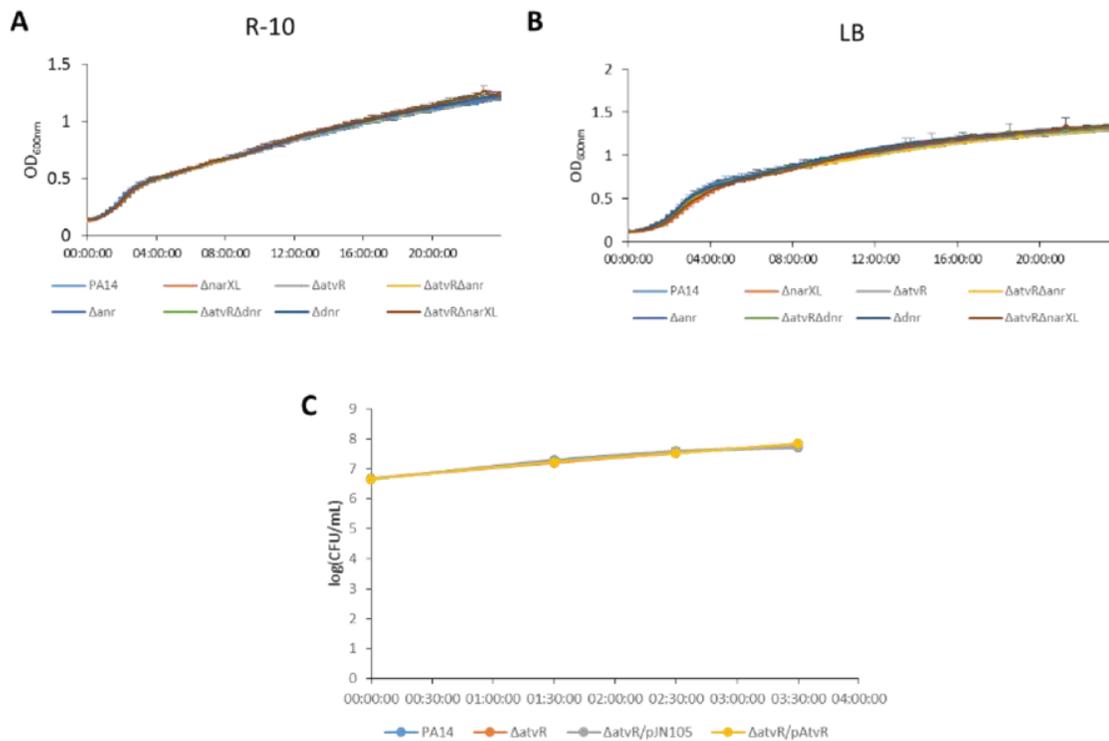


Figura 9. Curvas de crescimento para mutantes nos reguladores de desnitrificação em diferentes condições. Culturas foram pré-incubadas *overnight* em meio LB (A) ou R-10 (B) e ajustadas para uma densidade optica de 0,1 em LB ou R10. Um mililitro de cada amostra foi aplicado em uma placa de 24 poços e o crescimento foi monitorada a uma densidade optica de 600nm em intervalos de 15 minutos a 37°C. (C). As linhagens de bactérias foram pre-incubadas até uma densidade optica de 2,0 em LB com gentamicina e arabinose, quando requerido. As culturas foram diluídas em R-10 para uma concentração de 5×10^6 bactérias/mL. 200uL da suspensão bacteriana foram adicionadas a uma placa de 96 poços e incubadas por 4 horas e 30 minutos a 37°C a 5% CO₂, a mesma condição utilizada para os ensaios de virulência *in vitro*. Nos tempos indicados, cada cultura foi diluída seriadamente, plaqueada, e o número de CFU determinado. Todas as curvas foram realizadas em triplicata.

Os macrófagos J774 ativados com IFN- γ foram infectados com a linhagem selvagem ou com a linhagem $\Delta atvR$ por uma hora antes da adição de gentamicina, usada para eliminar as bactérias extracelulares. Após 30 minutos (tempo zero), as células foram lavadas e meio R-10 sem antibiótico foi adicionado. Os números de CFU no sobrenadante foram determinados após uma e duas horas (**Figura 10A**). Os macrófagos foram lavados e lisados nos tempos zero, uma e duas horas, as bactérias liberadas foram plaqueadas e enumeradas (bactérias intracelulares) (**Figura 10B**). O número de bactérias fagocitadas foram similares entre os macrófagos infectados com a linhagem selvagem e os

macrófagos infectados com a linhagem $\Delta atvR$ em todos os tempos analisados (**Figura 10B**), indicando que não deve haver diferenças no processo de internalização das duas linhagens. Entretanto, foi observado um menor número de bactérias extracelulares quando os macrófagos foram infectados com a linhagem $\Delta atvR$ em comparação aos macrófagos infectados com a linhagem selvagem (**Figura 10A**), sugerindo que AtvR pode contra-atacar a morte mediada pelos macrófagos, induzindo uma maior sobrevivência da bactéria e reduzindo a produção de moléculas de defesa produzidas pelos macrófagos, como por exemplo as espécies reativas de oxigênio. Para verificar se AtvR pode de alguma forma interferir com o estado oxidativo dos macrófagos e promover a virulência da bactéria, os macrófagos foram tratados com o inibidor da NADPH oxidase diphenyleneiodonium (DPI). Nessas condições, houve um aumento na contagem das bactérias extracelulares quando os macrófagos foram tratados com DPI (compare os resultados dos macrófagos infectados com o mutante $\Delta atvR$ e os macrófagos tratados com DPI e infectados com a o mutante $\Delta atvR$ [$\Delta atvR$ + DPI] na **Figura 10A**). O aumento da contagem de bactérias extracelulares dos macrófagos infectados com a linhagem selvagem não é significativa, indicando que a linhagem selvagem é capaz de reduzir, ou deixar de ativar, a resposta redox, como observado anteriormente (Kaihami *et al.*, 2014). A taxa de fagocitose foi similar entre os macrófagos tratados ou não tratados com DPI, e o número de bactérias intracelulares permaneceu constante em todas as condições (**Figura 10B**).

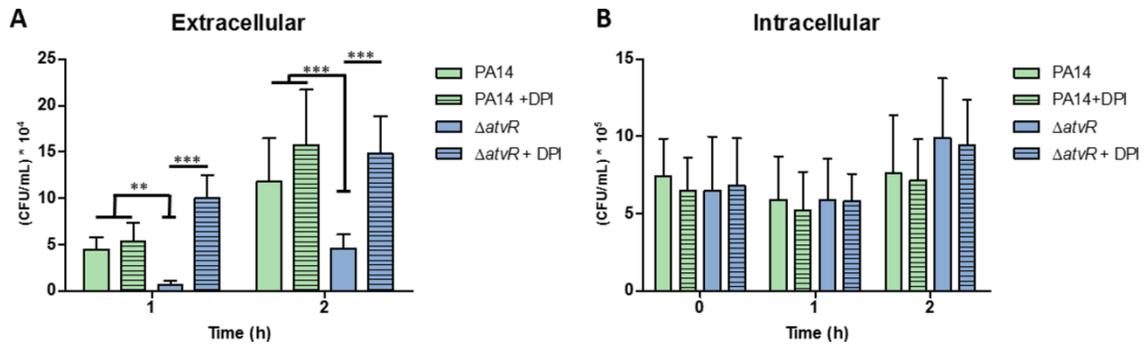


Figura 10. AtvR é importante para a resistência e ativação dos macrófagos. Macrófagos J774 foram tratados ou não com DPI por 4 horas. Após esse período, os macrófagos foram incubados com a linhagem PA14 ou $\Delta atvR$ em uma MOI de 10. (A) As células foram lavadas com PBS, R-10 contendo 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina foi adicionado aos poços, a placa foi incubada por 30 minutos e os poços foram lavados e meio R-10 foi adicionado. Nos tempos indicados, o sobrenadante foi coletado, diluído e o número de CFU foi determinado (extracelular). (B) Os macrófagos foram infectados e tratados como em (A) e lisados com Triton X-100. As bactérias liberadas foram diluídas e o número de CFU determinado (intracelular). **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Para confirmar se AtvR modula a ativação dos macrófagos, estes foram infectados com a linhagem selvagem PA14, o mutante $\Delta atvR$, $\Delta atvR/pJN105$ (a linhagem $\Delta atvR$ portando o vetor pJN105), ou a linhagem $\Delta atvR/pAtvR$ (a linhagem $\Delta atvR$, que apresenta a região codificadora de *atvR* sobre o controle de um promotor induzível por arabinose no pJN105). Após 3 horas de infecção, o sobrenadante foi recuperado e os níveis de TNF- α foram determinados por ELISA. Os macrófagos infectados com a linhagem $\Delta atvR$ apresentaram maior secreção de TNF- α em comparação aos macrófagos infectados com a linhagem selvagem (**Figura 11A**). O aumento na produção de TNF- α foi devido diretamente à falta de AtvR, uma vez que os níveis de secreção de TNF- α pelos macrófagos infectado com a linhagem $\Delta atvR/pAtvR$ foram restaurados aos níveis dos macrófagos infectados com a linhagem selvagem. Houve uma maior sobrevivência dos macrófagos infectados com a linhagem $\Delta atvR$ do que dos macrófagos infectados com a linhagem PA14 (**Figura 11B**), indicando que a função de AtvR é necessária para promover a morte dos macrófagos.

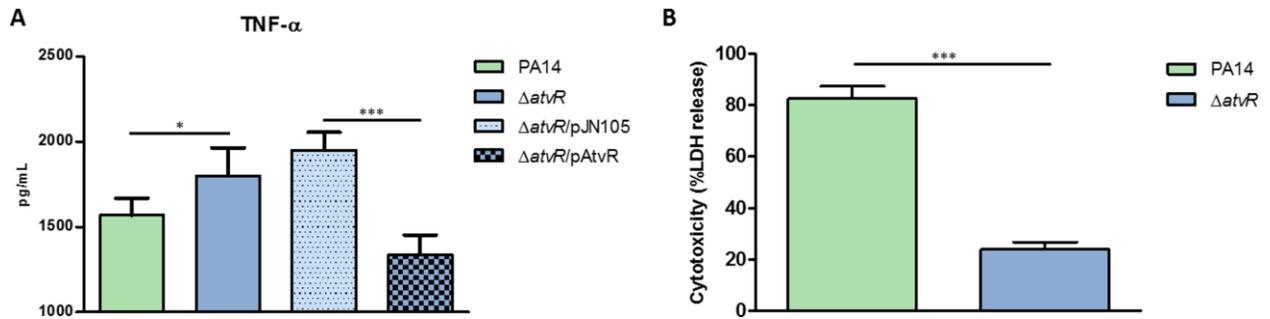


Figura 11. AtvR é importante para virulência em macrófagos *in vitro*. Macrófagos J774 foram incubados com a linhagem *P. aeruginosa* PA14, $\Delta atvR$, $\Delta atvR/pJN105$, ou $\Delta atvR/pAtvR$ em uma MOI de 10. (A) Após 3 horas infecção, o sobrenadante foi recuperado e a secreção de TNF- α determinada via ELISA. (B) Para o ensaio de citotoxicidade, após duas horas de infecção, o LDH liberado foi determinado como uma medida para a morte dos macrófagos. Os dados são referentes a média \pm SD de três experimentos independentes. *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$. A porcentagem de liberação de LDH foi calculada tendo a lise dos macrófagos com detergente considerada como 100%.

Esses resultados de infecção *in vitro* sugerem que AtvR tem papel na virulência de *P. aeruginosa*, induzindo uma maior carga bacteriana e reduzindo a ativação dos macrófagos e a sua sobrevivência. Essa hipótese é reforçada pelos resultados obtidos com o DPI, em que a inibição da NADPH oxidase exclui a habilidade de eliminar o mutante $\Delta atvR$. Foi observado que AtvR regula positivamente a expressão de *katA* e *rahU* (Tabela 5), como discutido abaixo (Seção 4.2.4), sendo que esses genes modulam o estado oxidativo dos macrófagos (Lee *et al.*, 2005; Rao *et al.*, 2011).

4.2.3 AtvR é importante *in vivo*

Uma vez que AtvR está envolvido na virulência *in vitro*, o próximo passo foi verificar se esse RR atípico também é relevante para um modelo *in vivo* e o modelo de pneumonia aguda em camundongos foi selecionado. Enquanto os camundongos infectados intra-traquealmente (i.t.) com a linhagem selvagem morreram 48 horas pós-infecção (h.p.i.), os camundongos infectados com o mutante $\Delta atvR$ apresentaram uma maior taxa de sobrevivência, com 68% dos camundongos viáveis após 48 h.p.i. e 12% dos animais viáveis após 7 dias (Figura 12A).

Neste modelo de infecção, *P. aeruginosa* é capaz de se disseminar rapidamente a outros órgãos, causando a morte do animal (Ramphal *et al.*, 2008; Kaihama *et al.*, 2014). Portanto, a carga bacteriana no sítio primário de infecção (pulmão) assim como nos órgãos secundários (fígado e baço) foi analisada como um indicativo de sepse. Esses órgãos foram coletados 24 h.p.i. e a carga bacteriana foi determinada. Os animais infectados com o mutante $\Delta atvR$ apresentaram uma redução da carga bacteriana em todos os órgãos analisados, em comparação aos animais infectados com a linhagem selvagem (**Figura 12B**), demonstrando que AtvR interfere com a resposta do hospedeiro, induzindo uma menor resolução da infecção bacteriana pelo hospedeiro infectado com a linhagem PA14.

Uma vez que AtvR afeta a produção de citocinas *in vitro* (**Figura 11A**), foi verificado se AtvR é capaz de reduzir a ativação do sistema imune assim como o recrutamento de neutrófilos para o sítio primário de infecção. Os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IFN- γ nos pulmões foram determinados por ELISA 24 h.p.i.. Os animais infectados com o mutante $\Delta atvR$ apresentaram maiores níveis dessas citocinas em comparação aos camundongos infectados com a linhagem selvagem (**Figura 12C e D**). Foi observado um maior recrutamento de neutrófilos (Ly6G/Ly6C⁺, CD11b⁺, F4/80⁺) nos camundongos infectados com o mutante $\Delta atvR$ em comparação aos camundongos infectados com a linhagem selvagem ou aos animais controle (**Figura 12E**). A atividade da mieloperoxidase (MPO) foi presente tanto nos animais infectados com a linhagem selvagem como nos animais controle, porém maiores níveis foram encontrados nos animais infectados com o mutante $\Delta atvR$ quando comparado aos animais controle ou infectados com a linhagem selvagem, confirmando que os neutrófilos recrutados estavam

ativados (**Figura 12F**). A quantidade dos macrófagos nos pulmões foi semelhante nos animais infectados com a linhagem selvagem ou com a linhagem mutante (dados não mostrados), porém os dados *in vitro* sugerem que eles são ativados mais eficientemente quando os camundongos são desafiados com a linhagem $\Delta atvR$ que quando infectados com a linhagem PA14, provavelmente permitindo o recrutamento dos neutrófilos para o sítio de infecção.

Esses resultados indicam a relevância de *AtvR* para promover a adaptação de *P. aeruginosa* no hospedeiro, interferindo na ativação do sistema imune e reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, assim como o recrutamento dos neutrófilos e sua posterior ativação e, conseqüentemente, promovendo maiores taxas de mortalidade do hospedeiro.

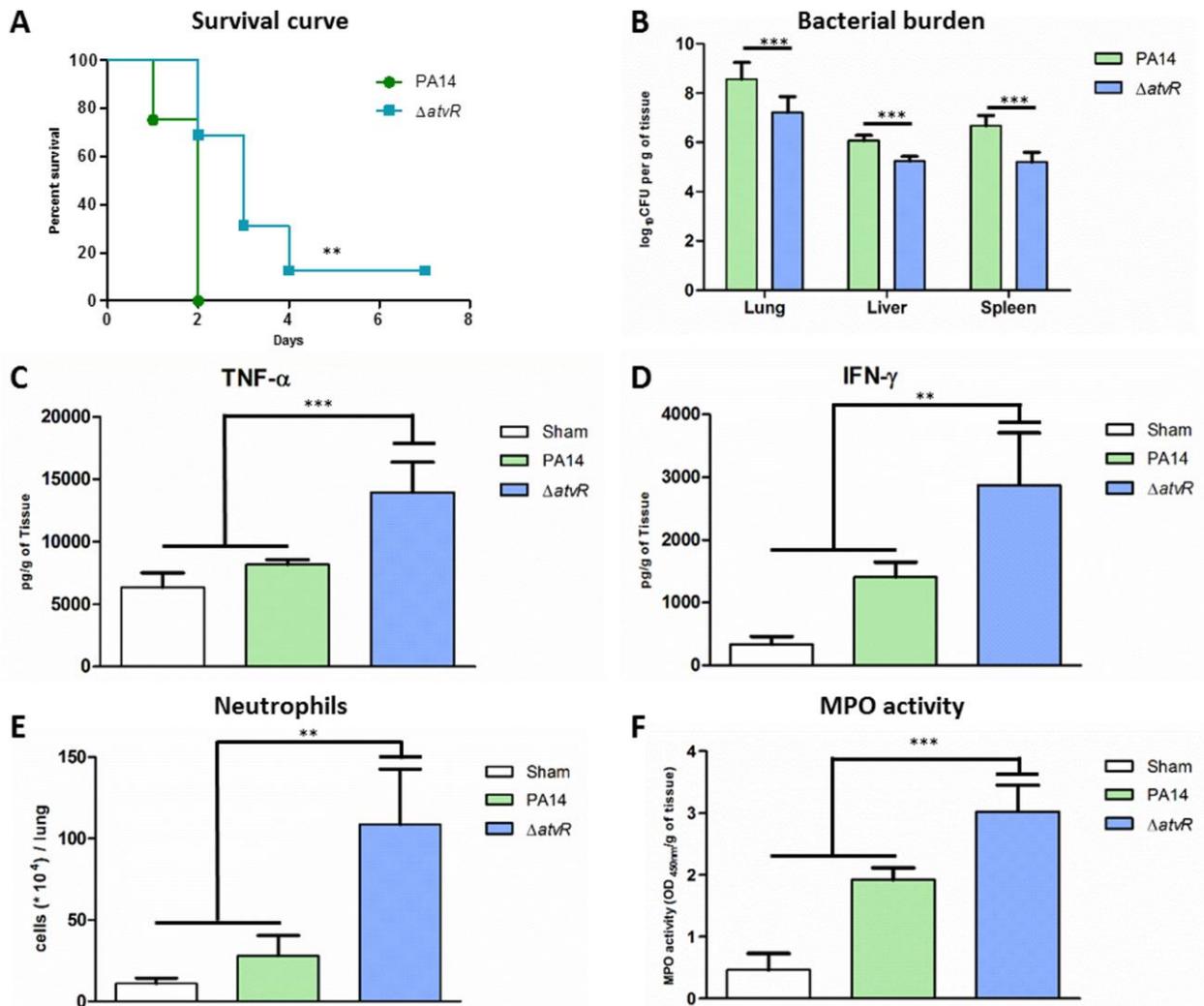


Figura 12. AtvR é importante para virulência de *P. aeruginosa* em um modelo de pneumonia aguda. Camundongos BALB/c foram infectados i.t. com 2×10^6 bactérias com a linhagem selvagem PA14 ou o mutante $\Delta atvR$. (A) A sobrevivência dos camundongos foi observada durante o curso do experimento. (B) Após 24 horas da infecção, os animais foram sacrificados, os órgãos macerados e as CFU enumeradas. (C, D). Os níveis das citocinas TNF- α e IFN- γ nos pulmões foram determinadas via ELISA. (E) Os animais foram eutanasiados, e os pulmões foram macerados e a suspensão celular foi marcada para neutrófilos (Ly6G/Ly6C⁺; F4/80⁺) e analisados via FACS. (F) As células do pulmão foram lisadas e sonicadas, a suspensão foi centrifugada. O sobrenadante resultante foi utilizado para medir a atividade da MPO com TMB e a DO foi determinada a 450nm. (B-F) Para todos ensaios, as amostras foram coletadas após 24 horas de infecção. Dados são referentes a média \pm SD de três experimentos independentes. **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

4.2.4 AtvR afeta a expressão de genes relacionados a adaptação a baixa tensão de oxigênio e virulência.

Para compreender a contribuição de AtvR para a adaptação de *P. aeruginosa* no hospedeiro, que induz uma maior virulência, foi utilizada uma estratégia transcritômica através do sequenciamento de nova geração (NGS), RNA-Seq. O fluxo de trabalho, desde a preparação da amostra até a análise de genes diferencialmente expressos, foi estabelecido durante este trabalho, possibilitando obter os melhores resultados com o máximo de qualidade possível e está detalhado na **seção 4.3**, abaixo.

A linhagem superexpressando AtvR (PA14/pAtvR) e a linhagem controle (PA14/pJN105) foram cultivadas até uma densidade óptica a 600nm de 1 na presença de arabinose para induzir a expressão de *atvR*. Nesse ponto o RNA total foi extraído e preparado como descrito nos materiais e métodos e em maiores detalhes na seção 4.3. Foi encontrado um total de 287 genes diferencialmente expressos, sendo 224 genes regulados positivamente (**Tabela em anexo II**) e 63 genes regulados negativamente (**Tabela em anexo III**) na linhagem PA14/pAtvR comparado com a linhagem PA14/pJN105. Interessantemente, 44 genes de 224 regulados positivamente (19,6%) pertencem a nove clusters gênicos envolvidos na respiração anaeróbia na presença de nitrato (**Tabela 5**). Esses genes incluem genes que codificam a via completa de denitrificação da redução do nitrato para nitrogênio molecular, compreendendo os clusters da nitrato redutase (*nar* e *nap*), nitrito redutase (*nir*), oxido nítrico redutase (*nor*), e oxido nitroso redutase (*nos*). O operon *arc*, que é necessário para o crescimento fermentativo de *P. aeruginosa* na presença de arginina, e clusters relacionados com a biossíntese de

piocianina (*phz*) também foram regulados positivamente (**Tabela 5**). Esses resultados sugerem que AtvR pode regular o metabolismo anaeróbio/hipóxia.

Tabela 5. Genes selecionadas, diferencialmente expressos entre a linhagem PA14/pAtvR vs PA14/pJN105.

PA14 locus	PAO1 locus	gene	razão
Nitrate Reductase			
PA14_13750	PA3877	<i>narK1</i>	3.62
PA14_13770	PA3876	<i>narK2</i>	5.44
PA14_13780	PA3875	<i>narG</i>	10.23
PA14_13800	PA3874	<i>narH</i>	10.67
PA14_13810	PA3873	<i>narJ</i>	9.09
PA14_13830	PA3872	<i>narI</i>	9.61
PA14_13840	PA3871		4.34
PA14_13850	PA3870	<i>moaA</i>	2.71
Nitrite Reductase			
PA14_06650	PA0509	<i>nirN</i>	5.80
PA14_06660	PA0510	<i>nirE</i>	9.51
PA14_06670	PA0511	<i>nirJ</i>	7.20
PA14_06680	PA0512	<i>nirH</i>	5.86
PA14_06690	PA0513	<i>nirG</i>	5.05
PA14_06700	PA0514	<i>nirL</i>	4.49
PA14_06710	PA0515	<i>nirD</i>	3.80
PA14_06720	PA0516	<i>nirF</i>	3.23
PA14_06730	PA0517	<i>nirC</i>	3.93
PA14_06740	PA0518	<i>nirM</i>	4.58
PA14_06750	PA0519	<i>nirS</i>	3.23
PA14_06790	PA0521	<i>nirO</i>	2.41
PA14_06770	PA0520	<i>nirQ</i>	2.82
Nitric oxide reductase			
PA14_06810	PA0523	<i>norC</i>	6.12
PA14_06830	PA0524	<i>norB</i>	7.44
Nitrous oxide reductase			
PA14_20190	PA3393	<i>nosD</i>	4.02
PA14_20200	PA3392	<i>nosZ</i>	7.53
Arginine metabolism			
PA14_68330	PA5171	<i>arcA</i>	2.29
PA14_68340	PA5172	<i>arcB</i>	4.34
PA14_68350	PA5173	<i>arcC</i>	5.42

Tabela 5: Continuação

PA14 locus	PAO1 locus	gene	razão
QS-regulated			
PA14_36330	PA2193	<i>hcnA</i>	2.01
PA14_36320	PA2194	<i>hcnB</i>	3.19
PA14_36310	PA2195	<i>hcnC</i>	4.46
PA14_16250	PA3724	<i>lasB</i>	2.23
PA14_19100	PA3479	<i>rhlA</i>	2.60
Phenazine biosynthesis			
PA14_09400	PA4217	<i>phzS</i>	3.70
PA14_09410	PA4216	<i>phzG1</i>	7.16
PA14_09420	PA4215	<i>phzF1</i>	4.71
PA14_09440	PA4214	<i>phzE1</i>	5.88
PA14_09450	PA4213	<i>phzD1</i>	6.38
PA14_09460	PA4212	<i>phzC1</i>	9.14
PA14_09470	PA4211	<i>phzB1</i>	9.95
PA14_09480	PA4210	<i>phzA1</i>	6.11
PA14_09490	PA4209	<i>phzM</i>	2.69
PA14_39880	PA1905	<i>phzG2</i>	3.97
PA14_39890	PA1904	<i>phzF2</i>	4.71
PA14_39910	PA1903	<i>phzE2</i>	5.38
PA14_39925	PA1902	<i>phzD2</i>	6.52
PA14_39945	PA1901	<i>phzC2</i>	5.42
PA14_39960	PA1900	<i>phzB2</i>	6.57
PA14_39970	PA1899	<i>phzA2</i>	3.55
Redox related			
PA14_01490	PA0122	<i>rahU</i>	2.10
PA14_09150	PA4236	<i>katA</i>	2.33

Tabela 5: Continuação

PA14 locus	PAO1 locus	gene	razão
Type VI secretion systems			
PA14_00820	PA0070	<i>tagQ1</i>	2.09
PA14_01030	PA0085	<i>hcp1</i>	2.11
PA14_44290	PA1656	<i>hsiA2</i>	2.06
PA14_43040	PA1657	<i>hsiB2</i>	3.27
PA14_43030	PA1658	<i>hsiC2</i>	3.00
PA14_43020	PA1659		2.46
PA14_43000	PA1660	<i>hsiG2</i>	2.58
PA14_42990	PA1661	<i>hsiH2</i>	2.48
PA14_42980	PA1662	<i>clpV2</i>	2.50
PA14_42970	PA1663	<i>sfa2</i>	2.35
PA14_42950	PA1665	<i>fha2</i>	3.68
PA14_42940	PA1666	<i>lip2.1</i>	2.76
PA14_42920	PA1667	<i>hsiJ2</i>	2.10
PA14_42910	PA1668	<i>dotU2</i>	2.74
PA14_42900	PA1669	<i>icmF2</i>	2.19
PA14_34020	PA2368	<i>hsiF3</i>	60.50

Interessantemente, durante o dano agudo do pulmão, o edema das vias aéreas e atelectasia resultam em uma condição de baixa ventilação e baixa perfusão, e conseqüentemente em um ambiente hipóxico nas áreas afetadas (Ulich *et al.*, 1991; Leeper-Woodford *et al.*, 1991; Kisala *et al.*, 1993). Esse ambiente hostil, tanto para o hospedeiro como para o patógeno, induz diversas vias de sinalização em *P. aeruginosa*, que incluem o sistema de dois componentes NarXL. No topo da cadeia de regulação da resposta a anóxia está o regulador transcricional Anr, cuja atividade é dependente de baixas tensões de oxigênio. Anr já foi demonstrado como sendo essencial para o crescimento de *P. aeruginosa* em anóxia (Trunk *et al.*, 2009), induzindo a expressão do cluster gênico da nitrato redutase, assim como a dos reguladores transcricionais *narXL* e *dnr*. O sistema de dois componentes NarXL responde tanto a nitrato como nitrito, ativando diretamente a expressão do cluster *nar*, e indiretamente regulando outros genes da

desnitrificação via Dnr, um fator transcricional que regula positivamente os clusters gênicos da nitrito redutase, da óxido nítrico redutase, e da óxido nitroso redutase (Schreiber *et al.*, 2007; Arai, 2011). A expressão dos genes envolvidos na desnitrificação é consistente com a sua função dos seus produtos na cadeia de transporte de elétrons. Na ausência de oxigênio e nitrato, *P. aeruginosa* pode entrar em um estado fermentativo, utilizando a via da arginina deiminase (cluster gênico da *arc*) ou a via do piruvato (Arai, 2011). Adicionalmente, o fator de virulência piocianina, pode atuar como acceptor final de elétrons em condições de baixa tensão de oxigênio, fazendo parte da oxidação de NADH para NAD⁺, com liberação de succinato no meio (Arai, 2011; Dietrich *et al.*, 2013).

Como Anr regula direta ou indiretamente todos os clusters da desnitrificação, os dados no RNA-Seq da superexpressão de AtvR foram comparados com o regulon de Anr previamente descrito (Trunk *et al.*, 2009). Foi observado que apenas 16% do regulon de Anr está sobre controle de AtvR (**Figura 13**) e 89% do regulon de AtvR (207 de 232 genes) não está sobre controle de Anr (**Figura 13**). O regulon de AtvR inclui genes do sistema de secreção do tipo VI, *lasB*, *rahU* (discutido abaixo), e o operon que compreende o transdutor de aerotaxia *aer2*, que não são afetados pela mutação em *anr* (Trunk *et al.*, 2009; Hammond *et al.*, 2015).

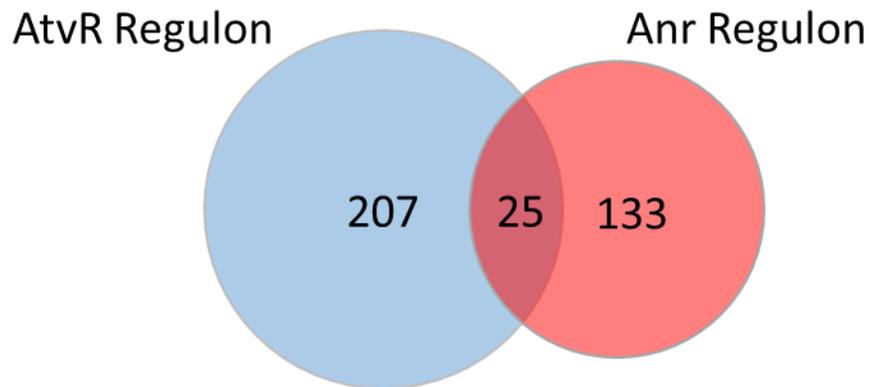


Figura 13. Regulons de AtvR e Anr compartilham poucas unidades transcricionais. As unidades transcricionais reguladas por AtvR (azul) foram comparadas com o transcriptoma de Anr (vermelho) descrito por Trunk *et al*, 2009. 89% dos genes induzidos por AtvR são únicos e não estão sobre controle de Anr.

Alguns dos genes relevantes para virulência foram regulados positivamente na linhagem superexpressando AtvR, como por exemplo *hcnA*, *lasB*, *katA*, *rahU*, o sistema de secreção do tipo VI e genes envolvidos na síntese de piocianina (Wretlind and Pavlovskis, n.d.; Gallagher and Manoil, 2001; Alcorn and Wright, 2004; Lee *et al.*, 2005; Rao *et al.*, 2011). Catalase (*katA*) e RahU já foram relacionados com a modulação da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, respectivamente, diminuindo a reposta dos macrófagos e, portanto, permitindo a infecção por *P. aeruginosa* (Lee *et al.*, 2005; Rao *et al.*, 2011).

Para confirmar o envolvimento de AtvR na expressão de genes da via de desnitrificação e de outros considerados relevantes, o nível transcricional de *nar* (*narK1*, *narG*, e *narH*), *nir* (*nirC*, *nirS*, e *nirQ*), da via biosintética das fenazinas (*phzS*, *phzM*), assim como genes envolvidos na biossíntese de cianeto (*hcnA*) e o gene da catalase (*katA*), foi comparado na linhagem $\Delta atvR/pJN105$ em relação a $\Delta atvR/pAtvR$. Análises de qRT-PCR confirmaram a maior expressão desses genes na linhagem $\Delta atvR$ complementada com AtvR em comparação a linhagem controle ($\Delta atvR/pJN105$)

(Figura 14). Esses dados corroboram a regulação transcricional direta ou indireta dos genes envolvidos na desnitrificação e virulência por AtvR e são consistentes com os dados do RNA-Seq,

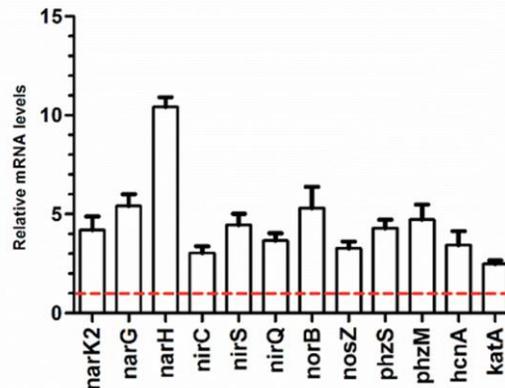


Figura 14. AtvR regula transcionalmente genes relacionados a desnitrificação e virulência. O cDNA obtido pela reação de transcrição reversa do RNA total de $\Delta atvR/pJN105$ ou $\Delta atvR/pAtvR$ crescidas até uma DO 1 em LB a 37°C com 0,2% arabinose e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina sob agitação foram utilizados em ensaios de qRT-PCR. Os resultados são valores relativos em comparação a linhagem controle $\Delta atvR/pJN105$, considerado como 1 (linha vermelha).

4.2.5 A expressão de AtvR é induzida em baixas concentrações de oxigênio e presença de nitrato

Uma vez que AtvR regula genes envolvidos na resposta a hipóxia/anóxia em nível transcricional, o próximo passo foi verificar se esse RR atípico está envolvido na capacidade de adaptação (*fitness*) de *P. aeruginosa* em baixas tensões de oxigênio. As linhagens PA14, $\Delta atvR/pJN105$, $\Delta atvR/pAtvR$, e Δanr foram crescidas em condições de baixa tensão de oxigênio com ou sem nitrato. Alternativamente, essas linhagens foram crescidas em normóxiainormóxia em frascos agitados. O mutante Δanr foi incluído como um controle sensível a hipóxia/anóxia (Filiatrault *et al.*, 2006; Trunk *et al.*, 2009). Após 24 horas em condição de baixo oxigênio ou 3 horas em normóxia, a densidade óptica foi medida e o RNA extraído. Nessas condições, não foi observada nenhuma diferença nas culturas submetidas a baixo oxigênio na ausência de nitrato (**Figura 15A**). Entretanto, na

presença de nitrato e baixos níveis de oxigênio, as linhagens $\Delta atvR$ ou $\Delta atvR/pAtvR$ apresentaram uma leve diferença no crescimento em comparação a linhagem selvagem PA14 ou a linhagem $\Delta atvR/pAtvR$ (**Figura 15A**).

A expressão de *atvR* foi maior quando a linhagem PA14 foi crescida em baixas tensões de oxigênio na presença de nitrato, em comparação à mesma linhagem crescida em normóxia, indicando o papel de AtvR durante a condição de estresse (**Figura 15B**). Para reforçar essa hipótese, a expressão de *narH*, um dos genes do cluster gênico da nitrato redutase identificado na análise de RNA-Seq, apresentou níveis reduzidos de mRNA na linhagem $\Delta atvR$ em comparação à linhagem selvagem crescida na presença de nitrato tanto em hipóxia como em normóxia (**Figura 15C**). Como esperado, a linhagem complementada teve os níveis de expressão de *narH* restaurados ao mesmo nível da linhagem selvagem (**Figura 15D**).

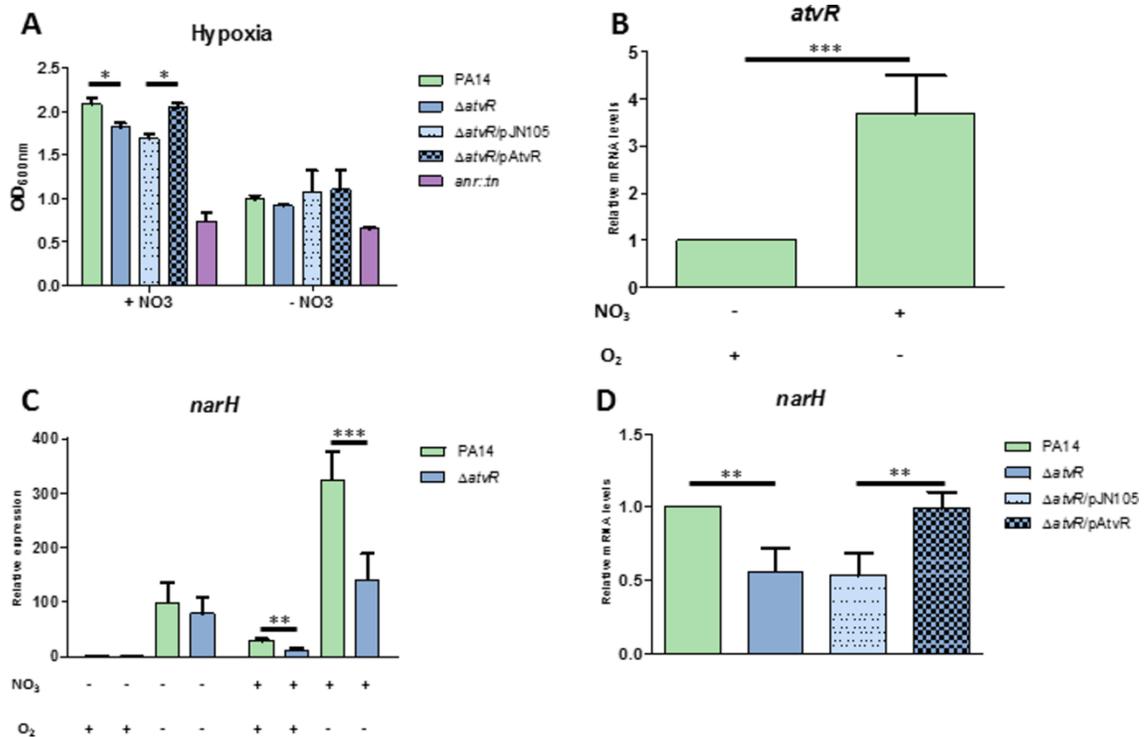


Figura 15. AtvR é expresso em baixos níveis de oxigênio e regula genes da desnitrificação. (A) A linhagem selvagem PA14, $\Delta atvR$, $\Delta atvR/pJN105$, $\Delta atvR/pAtvR$, e a linhagem controle Δanr foram crescidas em condição de hipóxia com ou sem 50mM nitrato, a DO 600nm foi determinada após 24 horas. **(B, C)** O RNA total foi extraído da linhagem PA14 e $\Delta atvR$ em normóxia ou hipóxia com ou sem 50 mM nitrato, como indicado na figura. **(B)** A expressão relativa de *atvR* em comparação a linhagem PA14 crescida em normóxia na ausência de nitrato. **(C)** Expressão de *narH* foi determinada em diferentes condições, os dados são relativos a linhagem PA14 crescida em normóxia na ausência de nitrato. **(D)** Expressão de *narH* durante a hipóxia com nitrato foi analisada e normalizada aos níveis da linhagem PA14 na mesma condição. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

4.2.6 AtvR atua em paralelo com a via de Anr-NarXL-Dnr

Para investigar se o papel regulatório de AtvR age em conjunto com outros sistemas regulatórios da via da desnitrificação, linhagens mutantes nos reguladores *anr*, *dnr* ou *narXL* foram construídos utilizando-se como *background* genético a linhagem selvagem ou a linhagem $\Delta atvR$, e o plasmídeo superexpressando AtvR (pAtvR) ou o plasmídeo controle pJN105 foram introduzidos nesses mutantes. Como o mutante *anr* apresenta um baixo crescimento em baixa concentrações de oxigênio, todas as linhagens foram incubadas em meio LB na presença de KNO₃ em normóxia até OD_{600nm} de 2. Nesse ponto, as culturas foram transferidas para uma jarra com vela (*candle-jar*) e o RNA total

extraído após quatro horas. Nessas condições, não houve diferenças significativas de crescimento entre as linhagens em hipóxia.

AtvR não teve efeito nos níveis de expressão de *anr*, *dnr*, e *narL*, enquanto os outros fatores transcricionais (Anr, Dnr, NarXL), são parte de uma rede de regulação intrincada e complexa, em que Anr é o regulador global induzindo a expressão de *dnr* e *narL* (**Figura 16 e 17**) (Arai, 2011). Como esperado, foi observado que Dnr e NarXL não controlam a expressão de *anr* porém eles controlam um ao outro, em que a falta de *dnr* resultou uma menor expressão de *narL* e a falta de *narXL* reduz os níveis de expressão de *dnr*. Dnr e NarXL não tiveram uma influência na expressão de *atvR*, porém curiosamente Anr apresentou um efeito negativo na expressão de *atvR* (**Figura 16 e 17**).

Para compreender o efeito de AtvR na regulação da expressão de genes da desnitrificação, foi verificado o efeito da combinação da deleção de *atvR*, com a deleção de *anr*, *dnr* e *narXL* na expressão de *narH*. Como esperado, houve uma redução de aproximadamente 70 vezes e 60 vezes na expressão de *narH* na linhagem Δanr e $\Delta narXL$, respectivamente, comparado a linhagem selvagem (**Figura 16 e 17**). Houve uma redução de seis vezes na linhagem Δdnr (**Figura 16 e 17**), estando de acordo com dados previamente publicados (Schreiber *et al.*, 2007). Como observado anteriormente (**Figura 15A**), a falta de AtvR resultou em uma diminuição de duas vezes na expressão de *narH* em comparação a linhagem selvagem (**Figura 16 e 17**). É importante ressaltar que a expressão de *narH* não é restaurada quando AtvR é superexpresso, na linhagem simples, duplo, ou triplo mutante, porém essa é restaurada na linhagem $\Delta atvR$ (**Figura 17**).

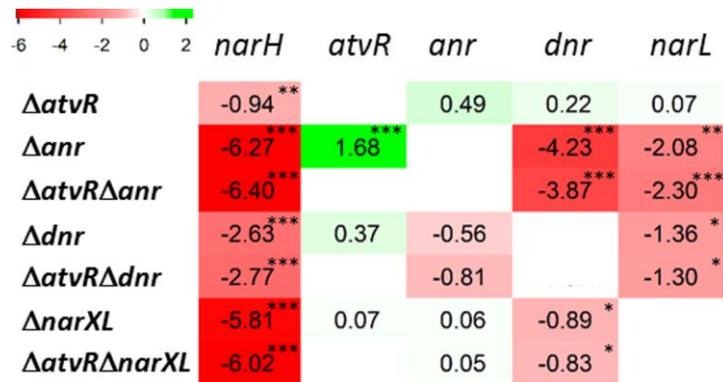


Figura 16. *AtvR* não faz parte da cascata regulatória da desnitrificação já caracterizada e é reprimida por *Anr* em condições de baixo O_2 . A linhagem PA14/pJN105, e os mutantes $\Delta atvR$ /pJN105, Δanr /pJN105, Δdnr /pJN105, $\Delta narXL$ /pJN105, $\Delta atvR\Delta anr$ /pJN105, $\Delta atvR\Delta dnr$ /pJN105, $\Delta atvR\Delta narXL$ /pJN105 foram crescidas em meio LB com 50 mM nitrato em condições de normóxia até uma OD600nm de 2. As culturas celulares foram transferidas para um frasco com vela por quatro horas, o RNA foi extraído e ensaios de qRT-PCR foram realizados com os genes indicados no topo da figura. A expressão é relativa foi normalizada para cada gene referente a linhagem PA14/pJN105 e estão representadas em \log_2 . *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

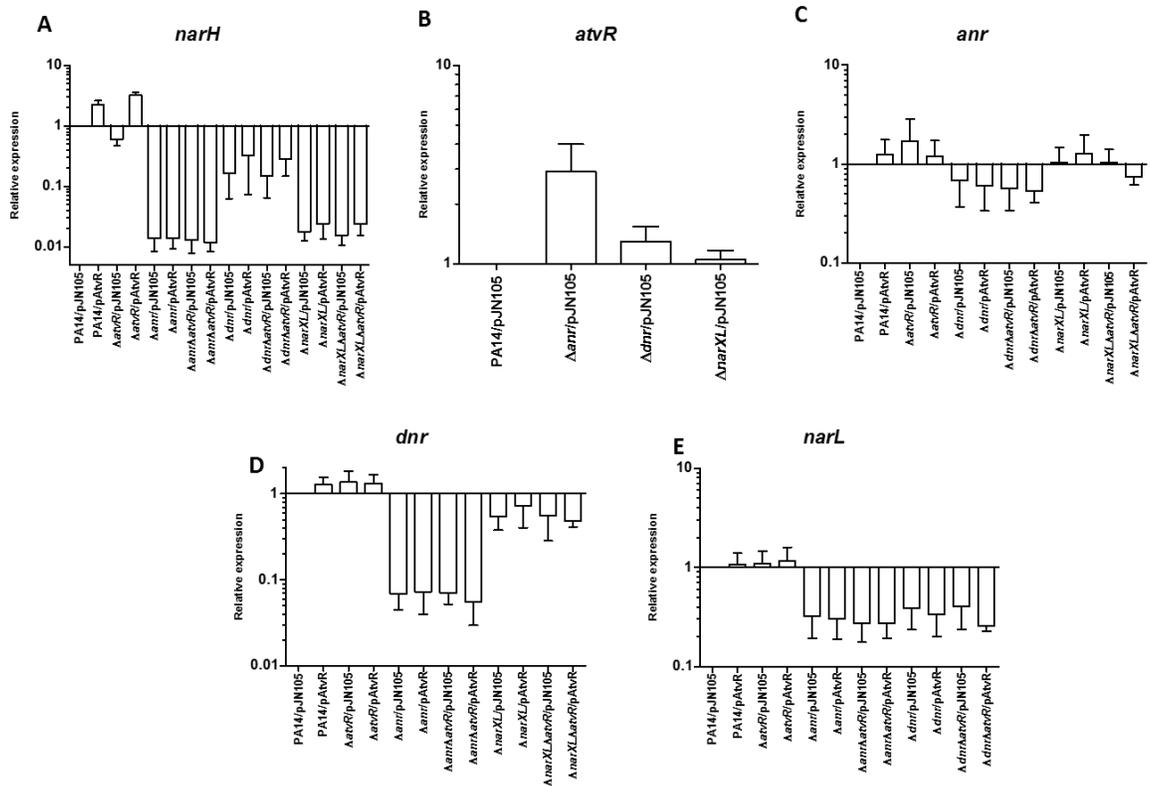


Figura 17. *AtvR* não faz parte da cascata regulatória da desnitrificação já caracterizada e é reprimida por *Anr* em condições de baixo O_2 . A linhagem selvagem e as linhagens mutantes contendo o plasmídeo pJN105 ou pAtvR foram crescidas em meio LB com 50mM de nitrato com 0,2% de arabinose em condições de normóxia até uma OD600 de 2. Nesse ponto, as culturas celulares foram transferidas para um frasco com vela por quatro horas, o RNA foi extraído e ensaios de qRT-PCR foram realizados para cada gene indicado em cada gráfico. Os níveis da expressão relativa foram normalizados para cada gene na linhagem PA14/pJN105. Os mesmos dados foram utilizados para a **Figura 15**. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Esses dados, são corroborados pelo crescimento da linhagem mutante Δanr em baixas tensões de oxigênio não ser restaurado pela superexpressão de AtvR (dados não mostrados), sugerindo que AtvR não apresenta uma ação aditiva com Anr, Dnr, ou NarXL na expressão de *narH* e que AtvR pode controlar os genes da desnitrificação de uma maneira alternativa.

4.2.7. Considerações

Os sistemas de dois componentes estão entre os sistemas mais bem estudados em bactérias. Os RR atípicos contendo um domínio de ligação a DNA já foram associados a diversas funções, como a regulação do crescimento celular de *Helicobacter pylori*, o desenvolvimento de *Streptomyces*, e indução uma via que resulta na clorose em *Synechococcus* sp. em condições de carência nutricional. O único RR atípico indiretamente associado a virulência é o ChxR de *Chlamydia trachomatis*, que interfere na regulação de genes possivelmente relacionados a virulência, porém nenhuma relação direta desse RR atípico e seu envolvimento a infecção foi demonstrada (McDaniel *et al.*, 2001; Koo *et al.*, 2006; Pflock *et al.*, 2007; Salinas *et al.*, 2007; Ruiz *et al.*, 2008; Hickey *et al.*, 2011; Barta *et al.*, 2014; Al-Bassam *et al.*, 2014; Donczew *et al.*, 2015).

Durante esse trabalho, a importância do RR atípico na virulência, com a diminuição da resposta imune do hospedeiro, e a regulação de genes relacionados na virulência foi demonstrado. Entre os genes que codificam fatores de virulência, já extensivamente caracterizados, incluem o cluster gênico das fenazinas (*phz*), que é necessário para biossíntese da piocianina, uma molécula redox; *hcn*, responsável pela produção de cianeto; o gene da catalase; e genes do sistema de secreção do tipo VI (Gallagher and Manoil, 2001; Lau *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005; Lesic *et al.*, 2009). Genes regulados por

percepção de quórum (do inglês, *quorum sensing*), como por exemplo *lasB* e *rhlB*, também foram influenciados por AtvR e podem estar correlacionados com a virulência reduzida do mutante $\Delta atvR$, talvez por uma resposta descoordenada da via da percepção de quórum, corroborando a regulação positiva do cluter gênico *phz*. Curiosamente, os genes regulados por QS são regulados positivamente tanto na linhagem superexpressando AtvR como no mutante em *anr* (Hammond *et al.*, 2015), indicando posições contrárias nesse caso e concordando com a repressão de *atvR* por Anr. Catalase, codificada pelo gene *kataA*, é uma enzima capaz de reduzir peróxido de hidrogênio que é originado do burst oxidativo dos macrófagos (Lee *et al.*, 2005), e *rahU* codifica uma enzima extracelular que foi demonstrada por inibir a óxido nítrico sintase (iNOS) de macrófagos, sendo parte do arsenal bacteriano para contra-atacar as linhas de defesa do hospedeiro (Rao *et al.*, 2011).

Diversos genes envolvidos na desnitrificação foram induzidos na linhagem superexpressando AtvR. Durante a infecção aguda ou crônica, *P. aeruginosa* pode encontrar um ambiente de microaerofilia, portanto a presença de um sistema complexo de regulação em resposta a baixo oxigênio não é surpreendente. Pelo menos três sistemas principais foram correlacionados com a regulação da respiração anaeróbia em *P. aeruginosa*, esses são os sistemas NarXL, Anr e Dnr (Van Alst *et al.*, 2009; Noriega *et al.*, 2010). NarXL e Anr regulam diretamente o cluster gênico da nitrato redutase e indiretamente outros genes envolvidos na respiração anaeróbia via DnR. A importância desses sistemas na capacidade de adaptação de *P. aeruginosa* é reforçada pela redução da virulência nos mutantes em *anr*, *nar*, e *nir*, e pela capacidade desses genes permitirem a sobrevivência em condições de anoxia/hipóxia na presença de nitrato (Van Alst *et al.*, 2007; Van Alst *et al.*, 2009; Jackson *et al.*, 2013). Curiosamente, o sistema de secreção

do tipo III não é expresso no mutante em *nirS*, porém essa é restaurada pela adição de doadores de NO exógenos, sugerindo que NO pode atuar como uma molécula sinalizadora para a citotoxicidade (Alst *et al.*, 2009). Durante as infecções bacterianas, ocorre um aumento das concentrações de nitrato (Linnane *et al.*, 1998), e esse nitrato pode ser utilizado como um aceptor de elétrons permitindo uma via alternativa de respiração para a bactéria. A respiração anaeróbia já foi demonstrada como sendo importante para outros patógenos, como *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, em que a presença da nitrato redutase periplasmática é essencial para a virulência durante a colite (Lopez *et al.*, 2015).

Portanto, AtvR contribui para a virulência de *P. aeruginosa* uma vez que permite que essa bactéria se dissemine durante a infecção, colonizando os órgãos primários e secundários, e conseqüentemente um quadro de infecção aguda severa resultando na morte do hospedeiro. AtvR é necessário para a resistência de *P. aeruginosa* contra a morte promovida pelos macrófagos, uma vez que a deleção de *atvR* resultou em maior produção de TNF- α e maior *clearance in vitro*. A linhagem deficiente em *atvR* foi defectiva no modelo de pneumonia aguda em camundongos, sendo resolvida com maior eficiência e permitindo o recrutamento e ativação dos neutrófilos no sitio de infecção. Esses dados sugerem que AtvR apresenta um importante papel na capacidade de *P. aeruginosa* de adaptar ao hospedeiro e modular a resposta imune inata.

Os papéis dos reguladores transcricionais em fazer um ajuste fino na expressão gênica, induzindo uma expressão *just-in-time*, são fundamentais para uma alta adaptabilidade da bactéria para responde a uma diversidade de condições desfavoráveis que ela encontra durante a colonização de diferentes nichos. A sobrevivência na

ausência de oxigênio ou na presença de baixas tensões de oxigênio é crucial para que a *P. aeruginosa* possa colonizar eficientemente o hospedeiro durante a infecção, esse fato é evidente pelos numerosos reguladores envolvidos na mudança metabólica permitindo a respiração anaeróbia. A esses ativadores já caracterizados, compreendendo Anr, NarL, e Dnr, foi adicionado o RR atípico AtvR (**Figura 18**). Curiosamente, AtvR é uma exceção a essa cascata de regulação da desnitrificação, em que Anr é o ativador global ativando Dnr e NarXL como reguladores a jusante. Os níveis de mRNA de *atvR* não estão sobre controle de Dnr e NarXL mas apresenta-se reduzido por Anr (**Figura 16 e 17**). Embora parte do regulon de AtvR se sobreponha a esses reguladores, esse RR pode responder a condições diferentes e ativar outros genes relevantes para a virulência (**Tabela 5**). A função de AtvR não é capaz de suprimir a falta de Anr (**Figura 16 e 17**), embora esse seja capaz de regular positivamente toda a via de desnitrificação.

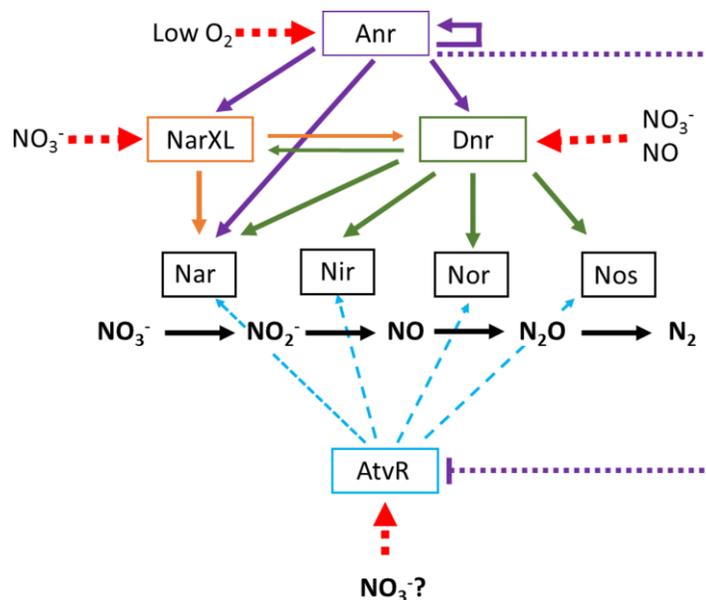


Figura 18. AtvR e a complexa regulação dos genes envolvidos na desnitrificação em *P. aeruginosa*. Os genes envolvidos na transferência de elétrons entre os complexos da nitração (Nar), nitrito (Nir), óxido nítrico (Nor) e óxido nítrico (Nos) redutases (boxes em cinza) estão sob controle dos ativadores transcricionais Anr, do sistema de dois componentes NarXL, e Dnr e do recém descoberto AtvR. As setas em preto indicam a via de transferência de elétrons e as setas coloridas e sólidas representam ativação positiva da transcrição. Fatores que afetam a atividade dos reguladores estão representadas em setas vermelhas apontando para os seus alvos.

O maior desafio agora é compreender como a expressão e a atividade de AtvR são regulados, uma vez que a falta de aspartato impede a regulação via fosforilação de maneira canônica. Seria essa uma modulação simplesmente transcricional na presença de nitrato, ou seria um mecanismo sutil de regulação que regula a estabilidade da mensagem e/ou a atividade da proteína por si? Como esses todos reguladores interagem entre si para garantir que o processo de desnitrificação seja induzido somente quando necessário? Essas são questões ainda em aberto que precisam ser respondidas para compreender uma das vias centrais que contribuem para a ubiquidade e versatilidade de *Pseudomonas*.

5. Conclusões

Este trabalho trouxe contribuições importantes para um melhor entendimento do papel dos RR de *P. aeruginosa*, no que diz respeito à virulência e adaptação.

Na triagem de 51 mutantes de RR no modelo *in vitro*, os macrófagos infectados com 42 desses mutantes apresentaram perfis de secreção de TNF-alfa diferentes dos macrófagos infectados com a linhagem selvagem, sendo que cinco desses mutantes diminuem a produção, enquanto 37 induzem uma maior produção de TNF- α . Isto mostra que a resposta dos macrófagos ao desafio com *P. aeruginosa* pode ser modulada por produtos bacterianos.

Foi determinado que 55% dos mutantes analisados apresentam-se atenuados em virulência tanto no modelo de macrófagos quanto no de *Drosophila*, demonstrando a conservação destes determinantes de virulência contra hospedeiros distintos, mas que apresentam vias similares de ativação da resposta imune,

Dentre os RR de PA14, foi caracterizado como atípico AtvR (PA14_26570), que apresenta um glutamato substituindo o aspartato fosforilável.

Macrófagos infectados com o mutante em AtvR apresentam maior produção da citocina pró-inflamatória TNF- α , maior *clearance* bacteriano e são menos sensíveis à citotoxicidade. neste modelo, em comparação aos macrófagos infectados com a linhagem selvagem.

A linhagem deficiente em AtvR também apresenta menor virulência *in vivo* no modelo de pneumonia aguda em camundongos, com menor carga bacteriana nos sítios primário e secundários de infecção. Foi observada maior produção de citocinas pró-inflamatórias e maior recrutamento e ativação de neutrófilos nos pulmões dos

camundongos infectados com a linhagem mutante em AtvR em comparação aos camundongos infectados com a linhagem selvagem.

AtvR está envolvida na expressão de genes envolvidos na respiração anaeróbia, como por exemplo a nitrato redutase.

A falta do regulador global da resposta á hipóxia Anr induz o aumentada expressão de AtvR nessa condição, o contrário do efeito deste ativador em outros reguladores da respiração anaeróbia. Portanto, AtvR não faz parte dessa cascata regulatória, mas atua em paralelo a ela.

Este trabalho introduziu a técnica de análise transcritômica por RNAseq no nosso grupo de pesquisa, que já vem sendo utilizada em outros trabalhos.

6. Referências Bibliográficas

- Al-Bassam, M.M., Bibb, M.J., Bush, M.J., Chandra, G., and Buttner, M.J. (2014) Response Regulator Heterodimer Formation Controls a Key Stage in *Streptomyces* Development. *PLoS Genet* **10**: e1004554.
- Alcorn, J.F., and Wright, J.R. (2004) Degradation of pulmonary surfactant protein D by *Pseudomonas aeruginosa* elastase abrogates innate immune function. *J Biol Chem* **279**: 30871–9.
- Alst, N.E. Van, Picardo, K.F., Iglewski, B.H., and Haidaris, C.G. (2007) Nitrate Sensing and Metabolism Modulate Motility, Biofilm Formation, and Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **75**: 3780–3790.
- Alst, N.E. Van, Sherrill, L.A., Iglewski, B.H., and Haidaris, C.G. (2009) Compensatory periplasmic nitrate reductase activity supports anaerobic growth of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in the absence of membrane nitrate reductase. *Can J Microbiol* **55**: 1133–1144.
- Alst, N.E. Van, Wellington, M., Clark, V.L., Haidaris, C.G., and Iglewski, B.H. (2009) Nitrite Reductase NirS Is Required for Type III Secretion System Expression and Virulence in the Human Monocyte Cell Line THP-1 by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **77**: 4446–4454.
- Apidianakis, Y., Mindrinos, M.N., Xiao, W., Lau, G.W., Baldini, R.L., Davis, R.W., and Rahme, L.G. (2005) Profiling early infection responses: *Pseudomonas aeruginosa* eludes host defenses by suppressing antimicrobial peptide gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 2573–8.
- Arai, H. (2011) Regulation and Function of Versatile Aerobic and Anaerobic Respiratory Metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol* **2**: 103.
- Aravind, L., and Koonin, E. V (1998) The HD domain defines a new superfamily of metal-dependent phosphohydrolases. *Trends Biochem Sci* **23**: 469–72.
- Arribas-Bosacoma, R., Kim, S.-K., Ferrer-Orta, C., Blanco, A.G., Pereira, P.J.B., Gomis-Rüth, F.X., *et al.* (2007) The X-ray crystal structures of two constitutively active mutants of the *Escherichia coli* PhoB receiver domain give insights into activation. *J Mol Biol* **366**: 626–41.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (eds) (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
- Barta, M.L., Hickey, J.M., Anbanandam, A., Dyer, K., Hammel, M., and Hefty, P.S. (2014) Atypical Response Regulator ChxR from *Chlamydia trachomatis* Is Structurally Poised for DNA Binding. *PLoS One* **9**: e91760.
- Beaudoin, T., Zhang, L., Hinz, A.J., Parr, C.J., and Mah, T.-F. (2012) The Biofilm-Specific Antibiotic Resistance Gene ndvB Is Important for Expression of Ethanol Oxidation Genes in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *J Bacteriol* **194**: 3128–3136.
- Beckmann, C., Brittnacher, M., Ernst, R., Mayer-Hamblett, N., Miller, S.I., and Burns, J.L. (2005) Use of phage display to identify potential *Pseudomonas aeruginosa* gene products relevant to early cystic fibrosis airway infections. *Infect Immun* **73**: 444–52.
- Benkert, B., Quack, N., Schreiber, K., Jaensch, L., Jahn, D., and Schobert, M. (2008) Nitrate-responsive NarX-NarL represses arginine-mediated induction of the *Pseudomonas aeruginosa* arginine fermentation arcDABC operon. *Microbiology* **154**: 3053–3060.
- Bertrand, J.J., West, J.T., and Engel, J.N. (2010) Genetic analysis of the regulation of type IV pilus function by the Chp chemosensory system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **192**: 994–1010.
- Bhagirath, A.Y., Pydi, S.P., Li, Y., Lin, C., Kong, W., Chelikani, P., and Duan, K. (2017) Characterization of the Direct Interaction between Hybrid Sensor Kinases PA1611 and RetS That

- Controls Biofilm Formation and the Type III Secretion System in *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Infect Dis* **3**: 162–175.
- Bhuwan, M., Lee, H.-J., Peng, H.-L., and Chang, H.-Y. (2012) Histidine-containing Phosphotransfer Protein-B (HptB) Regulates Swarming Motility through Partner-switching System in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Strain. *J Biol Chem* **287**: 1903–1914.
- Bielecki, P., Jensen, V., Schulze, W., Gödeke, J., Strehmel, J., Eckweiler, D., *et al.* (2015) Cross talk between the response regulators PhoB and TctD allows for the integration of diverse environmental signals in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Res* **43**: 6413–25.
- Blanka, A., Schulz, S., Eckweiler, D., Franke, R., Bielecka, A., Nicolai, T., *et al.* (2014) Identification of the Alternative Sigma Factor SigX Regulon and Its Implications for *Pseudomonas aeruginosa* Pathogenicity. *J Bacteriol* **196**: 345–356.
- Blus-Kadosh, I., Zilka, A., Yerushalmi, G., and Banin, E. (2013) The Effect of *pstS* and *phoB* on Quorum Sensing and Swarming Motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* **8**: e74444.
- Bordi, C., Lamy, M.-C., Ventre, I., Termine, E., Hachani, A., Fillet, S., *et al.* (2010) Regulatory RNAs and the HptB/RetS signalling pathways fine-tune *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Mol Microbiol* **76**: 1427–1443.
- Borlee, B.R., Goldman, A.D., Murakami, K., Samudrala, R., Wozniak, D.J., and Parsek, M.R. (2010) *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. *Mol Microbiol* **75**: 827–842.
- Bourret, R.B. (2006) Census of Prokaryotic Senses. *J Bacteriol* **188**: 4165–4168.
- Bourret, R.B. (2010) Receiver domain structure and function in response regulator proteins. *Curr Opin Microbiol* **13**: 142–149.
- Brencic, A., and Lory, S. (2009) Determination of the regulon and identification of novel mRNA targets of *Pseudomonas aeruginosa* RsmA. *Mol Microbiol* **72**: 612–32.
- Brencic, A., McFarland, K.A., McManus, H.R., Castang, S., Mogno, I., Dove, S.L., and Lory, S. (2009) The GacS/GacA signal transduction system of *Pseudomonas aeruginosa* acts exclusively through its control over the transcription of the RsmY and RsmZ regulatory small RNAs. *Mol Microbiol* **73**: 434–45.
- Brinkman, F.S., Macfarlane, E.L., Warrener, P., and Hancock, R.E. (2001) Evolutionary relationships among virulence-associated histidine kinases. *Infect Immun* **69**: 5207–11.
- Broder, U.N., Jaeger, T., and Jenal, U. (2016) LadS is a calcium-responsive kinase that induces acute-to-chronic virulence switch in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Microbiol* **2**: 16184.
- Buchon, N., Silverman, N., and Cherry, S. (2014) Immunity in *Drosophila melanogaster* — from microbial recognition to whole-organism physiology. *Nat Rev Immunol* **14**: 796–810.
- Burrowes, E., Baysse, C., Adams, C., and O’Gara, F. (2006) Influence of the regulatory protein RsmA on cellular functions in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, as revealed by transcriptome analysis. *Microbiology* **152**: 405–418.
- Caille, O., Rossier, C., and Perron, K. (2007) A copper-activated two-component system interacts with zinc and imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **189**: 4561–8.
- Capra, E.J., Perchuk, B.S., Skerker, J.M., and Laub, M.T. (2012) Adaptive Mutations that Prevent Crosstalk Enable the Expansion of Paralogous Signaling Protein Families. *Cell* **150**: 222–232.
- Chambonnier, G., Roux, L., Redelberger, D., Fadel, F., Filloux, A., Sivaneson, M., *et al.* (2016) The Hybrid Histidine Kinase LadS Forms a Multicomponent Signal Transduction System with the GacS/GacA Two-Component System in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS Genet* **12**: e1006032.
- Chamy, L. El, Leclerc, V., Caldelari, I., and Reichhart, J.-M. (2008) Sensing of “danger signals”

- and pathogen-associated molecular patterns defines binary signaling pathways “upstream” of Toll. *Nat Immunol* **9**: 1165–1170.
- Chand, N.S., Lee, J.S.-W., Clatworthy, A.E., Golas, A.J., Smith, R.S., and Hung, D.T. (2011) The sensor kinase KinB regulates virulence in acute *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Bacteriol* **193**: 2989–99.
- 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.
- Chieda, Y., Iiyama, K., Yasunaga-Aoki, C., Lee, J.M., Kusakabe, T., and Shimizu, S. (2005) Pathogenicity of *gacA* mutant of *Pseudomonas aeruginosa* PA01 in the silkworm, *Bombyx mori*. *FEMS Microbiol Lett* **244**: 181–6.
- Comolli, J.C., and Donohue, T.J. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* RoxR, a response regulator related to *Rhodobacter sphaeroides* PrrA, activates expression of the cyanide-insensitive terminal oxidase. *Mol Microbiol* **45**: 755–68.
- Cooper, M., Tavankar, G.R., and Williams, H.D. (2003) Regulation of expression of the cyanide-insensitive terminal oxidase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **149**: 1275–1284.
- D’Argenio, D.A., Calfee, M.W., Rainey, P.B., and Pesci, E.C. (2002) Autolysis and autoaggregation in *Pseudomonas aeruginosa* colony morphology mutants. *J Bacteriol* **184**: 6481–9.
- D’Argenio, D.A., Gallagher, L.A., Berg, C.A., and Manoil, C. (2001) *Drosophila* as a Model Host for *Pseudomonas aeruginosa* Infection. *J Bacteriol* **183**: 1466–1471.
- Darzins, A., and Russell, M.A. (1997) Molecular genetic analysis of type-4 pilus biogenesis and twitching motility using *Pseudomonas aeruginosa* as a model system--a review. *Gene* **192**: 109–15.
- Dasgupta, N., Wolfgang, M.C., Goodman, A.L., Arora, S.K., Jyot, J., Lory, S., and Ramphal, R. (2003) A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **50**: 809–24.
- Deretic, V., and Konyecsni, W.M. (1989) Control of mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*: transcriptional regulation of *algR* and identification of the second regulatory gene, *algQ*. *J Bacteriol* **171**: 3680–8.
- Diepinois, G., Ducret, V., Caille, O., and Perron, K. (2012) The Transcriptional Regulator CzcR Modulates Antibiotic Resistance and Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* **7**: e38148.
- Dietrich, L.E.P., Okegbe, C., Price-Whelan, A., Sakhtah, H., Hunter, R.C., and Newman, D.K. (2013) Bacterial Community Morphogenesis Is Intimately Linked to the Intracellular Redox State. *J Bacteriol* **195**: 1371–1380.
- Donczew, R., Makowski, Ł., Jaworski, P., Bezulska, M., Nowaczyk, M., Zakrzewska-Czerwińska, J., and Zawilak-Pawlik, A. (2015) The atypical response regulator HP1021 controls formation of the *Helicobacter pylori* replication initiation complex. *Mol Microbiol* **95**: 297–312.
- Dong, Y.-H., Zhang, X.-F., An, S.-W., Xu, J.-L., and Zhang, L.-H. (2008) A novel two-component system BqsS-BqsR modulates quorum sensing-dependent biofilm decay in *Pseudomonas aeruginosa*. *Commun Integr Biol* **1**: 88–96.
- Dötsch, A., Eckweiler, D., Schniederjans, M., Zimmermann, A., Jensen, V., Scharfe, M., *et al.* (2012) The *Pseudomonas aeruginosa* Transcriptome in Planktonic Cultures and Static Biofilms Using RNA Sequencing. *PLoS One* **7**: e31092.
- Drenkard, E., and Ausubel, F.M. (2002) *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* **416**: 740–743.
- Dunkley, M., Pabst, R., and Cripps, A. (1995) An important role for intestinally derived T cells in

- respiratory defence. *Immunol Today* **16**: 231–6.
- Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* **32**: 1792–1797.
- Ernst, R.K., Yi, E.C., Guo, L., Lim, K.B., Burns, J.L., Hackett, M., and Miller, S.I. (1999) Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* **286**: 1561–5.
- Fabbro, C. Del, Scalabrin, S., Morgante, M., and Giorgi, F.M. (2013) An Extensive Evaluation of Read Trimming Effects on Illumina NGS Data Analysis. *PLoS One* **8**: e85024.
- Faure, L.M., Llamas, M.A., Bastiaansen, K.C., Bentzmann, S. de, and Bigot, S. (2013) Phosphate starvation relayed by PhoB activates the expression of the *Pseudomonas aeruginosa* *vreI* ECF factor and its target genes. *Microbiology* **159**: 1315–1327.
- Fernández-Piñar, R., Espinosa-Urgel, M., Dubern, J., Heeb, S., Ramos, J.L., and Cámara, M. (2012) Fatty acid-mediated signalling between two *Pseudomonas* species. *Environ Microbiol Rep* **4**: 417–423.
- Fernández, L., Gooderham, W.J., Bains, M., McPhee, J.B., Wiegand, I., and Hancock, R.E.W. (2010) Adaptive resistance to the ‘last hope’ antibiotics polymyxin B and colistin in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by the novel two-component regulatory system ParR-ParS. *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 3372–82.
- Feuillet, V., Medjane, S., Mondor, I., Demaria, O., Pagni, P.P., Galan, J.E., *et al.* (2006) Involvement of Toll-like receptor 5 in the recognition of flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci* **103**: 12487–12492.
- Filiatrault, M.J., Picardo, K.F., Ngai, H., Passador, L., and Iglewski, B.H. (2006) Identification of *Pseudomonas aeruginosa* Genes Involved in Virulence and Anaerobic Growth. *Infect Immun* **74**: 4237–4245.
- Francis, V.I., Stevenson, E.C., and Porter, S.L. (2017) Two-component systems required for virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* **364**.
- Frangipani, E., Visaggio, D., Heeb, S., Kaefer, V., Cámara, M., Visca, P., and Imperi, F. (2014) The Gac/Rsm and cyclic-di-GMP signalling networks coordinately regulate iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* **16**: 676–688.
- Gallagher, L.A., and Manoel, C. (2001) *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 kills *Caenorhabditis elegans* by cyanide poisoning. *J Bacteriol* **183**: 6207–14.
- Galperin, M.Y. (2006) Structural Classification of Bacterial Response Regulators: Diversity of Output Domains and Domain Combinations. *J Bacteriol* **188**: 4169–4182.
- Gao, R., Mack, T.R., and Stock, A.M. (2007) Bacterial response regulators: versatile regulatory strategies from common domains. *Trends Biochem Sci* **32**: 225–34.
- Gao, R., Mukhopadhyay, A., Fang, F., and Lynn, D.G. (2006) Constitutive Activation of Two-Component Response Regulators: Characterization of VirG Activation in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **188**: 5204–5211.
- Garvis, S., Munder, A., Ball, G., Bentzmann, S. de, Wiehlmann, L., Ewbank, J.J., *et al.* (2009) *Caenorhabditis elegans* Semi-Automated Liquid Screen Reveals a Specialized Role for the Chemotaxis Gene *cheB2* in *Pseudomonas aeruginosa* Virulence. *PLoS Pathog* **5**: e1000540.
- Gaynes, R., Edwards, J.R., and National Nosocomial Infections Surveillance System, J.R. (2005) Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis* **41**: 848–54.
- Giannoukos, G., Ciulla, D.M., Huang, K., Haas, B.J., Izard, J., Levin, J.Z., *et al.* (2012) Efficient and robust RNA-seq process for cultured bacteria and complex community transcriptomes. *Genome Biol* **13**: r23.
- Goldberg, J.B., and Dahnke, T. (1992) *Pseudomonas aeruginosa* AlgB, which modulates the

- expression of alginate, is a member of the NtrC subclass of prokaryotic regulators. *Mol Microbiol* **6**: 59–66.
- Goodman, A.L., Kulasekara, B., Rietsch, A., Boyd, D., Smith, R.S., and Lory, S. (2004) A Signaling Network Reciprocally Regulates Genes Associated with Acute Infection and Chronic Persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Dev Cell* **7**: 745–754.
- Goodman, A.L., Merighi, M., Hyodo, M., Ventre, I., Filloux, A., and Lory, S. (2009) Direct interaction between sensor kinase proteins mediates acute and chronic disease phenotypes in a bacterial pathogen. *Genes Dev* **23**: 249–259.
- Gottar, M., Gobert, V., Matskevich, A.A., Reichhart, J.-M., Wang, C., Butt, T.M., *et al.* (2006) Dual Detection of Fungal Infections in *Drosophila* via Recognition of Glucans and Sensing of Virulence Factors. *Cell* **127**: 1425–1437.
- Guragain, M., King, M.M., Williamson, K.S., Pérez-Osorio, A.C., Akiyama, T., Khanam, S., *et al.* (2016) The *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Two-Component Regulator CarSR Regulates Calcium Homeostasis and Calcium-Induced Virulence Factor Production through Its Regulatory Targets CarO and CarP. *J Bacteriol* **198**: 951–963.
- Gutu, A.D., Sgambati, N., Strasbourger, P., Brannon, M.K., Jacobs, M.A., Haugen, E., *et al.* (2013) Polymyxin Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* phoQ Mutants Is Dependent on Additional Two-Component Regulatory Systems. *Antimicrob Agents Chemother* **57**: 2204–2215.
- Haas, B.J., Chin, M., Nusbaum, C., Birren, B.W., and Livny, J. (2012) How deep is deep enough for RNA-Seq profiling of bacterial transcriptomes? *BMC Genomics* **13**: 734.
- Hammond, J.H., Dolben, E.F., Smith, T.J., Bhujju, S., and Hogan, D.A. (2015) Links between Anr and Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *J Bacteriol* **197**: 2810–20.
- Hassan, M.T., Lelie, D. van der, Springael, D., Römling, U., Ahmed, N., and Mergeay, M. (1999) Identification of a gene cluster, *czr*, involved in cadmium and zinc resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **238**: 417–25.
- He, J., Baldini, R.L., Déziel, E., Saucier, M., Zhang, Q., Liberati, N.T., *et al.* (2004) The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 2530–5.
- Heeb, S., Blumer, C., and Haas, D. (2002) Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA-dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J Bacteriol* **184**: 1046–56.
- Heurlier, K., Williams, F., Heeb, S., Dormond, C., Pessi, G., Singer, D., *et al.* (2004) Positive control of swarming, rhamnolipid synthesis, and lipase production by the posttranscriptional RsmA/RsmZ system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* **186**: 2936–45.
- Hickey, J.M., Weldon, L., and Hefty, P.S. (2011) The Atypical OmpR/PhoB Response Regulator ChxR from *Chlamydia trachomatis* Forms Homodimers In Vivo and Binds a Direct Repeat of Nucleotide Sequences. *J Bacteriol* **193**: 389–398.
- Hickman, J.W., Tifrea, D.F., and Harwood, C.S. (2005) A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proc Natl Acad Sci* **102**: 14422–14427.
- Hmelo, L.R., Borlee, B.R., Almlblad, H., Love, M.E., Randall, T.E., Tseng, B.S., *et al.* (2015) Precision-engineering the *Pseudomonas aeruginosa* genome with two-step allelic exchange. *Nat Protoc* **10**: 1820–1841.
- Hoang, T.T., Karkhoff-Schweizer, R.R., Kutchma, A.J., and Schweizer, H.P. (1998) A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* **212**: 77–86.

- Hobbs, M., Collie, E.S., Free, P.D., Livingston, S.P., and Mattick, J.S. (1993) PilS and PilR, a two-component transcriptional regulatory system controlling expression of type 4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **7**: 669–82.
- Hoffmann, J.A., and Reichhart, J.-M. (2002) *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat Immunol* **3**: 121–126.
- Hsu, J.-L., Chen, H.-C., Peng, H.-L., and Chang, H.-Y. (2008) Characterization of the Histidine-containing Phosphotransfer Protein B-mediated Multistep Phosphorelay System in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Biol Chem* **283**: 9933–9944.
- Hurley, B.P., Goodman, A.L., Mummy, K.L., Murphy, P., Lory, S., and McCormick, B.A. (2010) The two-component sensor response regulator RoxS/RoxR plays a role in *Pseudomonas aeruginosa* interactions with airway epithelial cells. *Microbes Infect* **12**: 190–198.
- Hymowitz, S.G., Filvaroff, E.H., Yin, J.P., Lee, J., Cai, L., Risser, P., *et al.* (2001) IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding. *EMBO J* **20**: 5332–5341.
- Inclan, Y.F., Huseby, M.J., and Engel, J.N. (2011) FimL Regulates cAMP Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* **6**: e15867.
- Intile, P.J., Diaz, M.R., Urbanowski, M.L., Wolfgang, M.C., and Yahr, T.L. (2014) The AlgZR two-component system recalibrates the RsmAYZ posttranscriptional regulatory system to inhibit expression of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *J Bacteriol* **196**: 357–66.
- Ishimoto, K.S., and Lory, S. (1992) Identification of pilR, which encodes a transcriptional activator of the *Pseudomonas aeruginosa* pilin gene. *J Bacteriol* **174**: 3514–21.
- Jackson, A.A., Gross, M.J., Daniels, E.F., Hampton, T.H., Hammond, J.H., Vallet-Gely, I., *et al.* (2013) Anr and Its Activation by PlcH Activity in *Pseudomonas aeruginosa* Host Colonization and Virulence. *J Bacteriol* **195**: 3093–3104.
- Jander, G., Rahme, L.G., and Ausubel, F.M. (2000) Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *J Bacteriol* **182**: 3843–5.
- Jean-Pierre, F., Tremblay, J., and Déziel, E. (2016) Broth versus Surface-Grown Cells: Differential Regulation of RsmY/Z Small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* by the Gac/HptB System. *Front Microbiol* **7**: 2168.
- Jeong, J.-Y., Yim, H.-S., Ryu, J.-Y., Lee, H.S., Lee, J.-H., Seen, D.-S., and Kang, S.G. (2012) One-Step Sequence- and Ligation-Independent Cloning as a Rapid and Versatile Cloning Method for Functional Genomics Studies. *Appl Environ Microbiol* **78**: 5440–5443.
- Johnston, D.S., and Nüsslein-Volhard, C. (1992) The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell* **68**: 201–219.
- Kaihami, G.H., Almeida, J.R.F. de, Santos, S.S. dos, Netto, L.E.S., Almeida, S.R. de, and Baldini, R.L. (2014) Involvement of a 1-Cys Peroxiredoxin in Bacterial Virulence. *PLoS Pathog* **10**: e1004442.
- Kaneko, T., Yano, T., Aggarwal, K., Lim, J.-H., Ueda, K., Oshima, Y., *et al.* (2006) PGRP-LC and PGRP-LE have essential yet distinct functions in the *drosophila* immune response to monomeric DAP-type peptidoglycan. *Nat Immunol* **7**: 715–723.
- Kilmury, S.L.N., and Burrows, L.L. (2016) Type IV pilins regulate their own expression via direct intramembrane interactions with the sensor kinase PilS. *Proc Natl Acad Sci* **113**: 6017–6022.
- Kim, S.-H., Park, S.-Y., Heo, Y.-J., and Cho, Y.-H. (2008) *Drosophila melanogaster*-based screening for multihost virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 and identification of a virulence-attenuating factor, HudA. *Infect Immun* **76**: 4152–62.
- Kisala, J.M., Ayala, A., Stephan, R.N., and Chaudry, I.H. (1993) A model of pulmonary

- atelectasis in rats: activation of alveolar macrophage and cytokine release. *Am J Physiol* **264**: R610-4.
- Klose, K.E., Weiss, D.S., and Kustu, S. (1993) Glutamate at the Site of Phosphorylation of Nitrogen-regulatory Protein NTRC Mimics Aspartyl-Phosphate and Activates the Protein. *J Mol Biol* **232**: 67–78.
- Kong, W., Chen, L., Zhao, J., Shen, T., Surette, M.G., Shen, L., and Duan, K. (2013) Hybrid sensor kinase PA1611 in *Pseudomonas aeruginosa* regulates transitions between acute and chronic infection through direct interaction with RetS. *Mol Microbiol* **88**: 784–797.
- Koo, I.C., Walthers, D., Hefty, P.S., Kenney, L.J., and Stephens, R.S. (2006) ChxR is a transcriptional activator in Chlamydia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 750–755.
- Kooguchi, K., Hashimoto, S., Kobayashi, A., Kitamura, Y., Kudoh, I., Wiener-Kronish, J., and Sawa, T. (1998) Role of alveolar macrophages in initiation and regulation of inflammation in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Infect Immun* **66**: 3164–9.
- Korgaonkar, A., Trivedi, U., Rumbaugh, K.P., and Whiteley, M. (2013) Community surveillance enhances *Pseudomonas aeruginosa* virulence during polymicrobial infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 1059–64.
- Krahn, T., Gilmour, C., Tilak, J., Fraud, S., Kerr, N., Lau, C.H.-F., and Poole, K. (2012) Determinants of intrinsic aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **56**: 5591–602.
- Kreamer, N.N., Costa, F., and Newman, D.K. (2015) The ferrous iron-responsive BqsRS two-component system activates genes that promote cationic stress tolerance. *MBio* **6**: e02549.
- Kuchma, S.L., Connolly, J.P., and O’Toole, G.A. (2005) A three-component regulatory system regulates biofilm maturation and type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **187**: 1441–54.
- Kulasakara, H., Lee, V., Brencic, A., Liberati, N., Urbach, J., Miyata, S., *et al.* (2006) Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3’-5’)-cyclic-GMP in virulence. *Proc Natl Acad Sci* **103**: 2839–2844.
- Kulasekara, H.D., Ventre, I., Kulasekara, B.R., Lazdunski, A., Filloux, A., and Lory, S. (2004) A novel two-component system controls the expression of *Pseudomonas aeruginosa* fimbrial cup genes. *Mol Microbiol* **55**: 368–380.
- Laskowski, M.A., and Kazmierczak, B.I. (2006) Mutational Analysis of RetS, an Unusual Sensor Kinase-Response Regulator Hybrid Required for *Pseudomonas aeruginosa* Virulence. *Infect Immun* **74**: 4462–4473.
- Laskowski, M.A., Osborn, E., and Kazmierczak, B.I. (2004) A novel sensor kinase-response regulator hybrid regulates type III secretion and is required for virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **54**: 1090–103.
- Lau, G.W., Goumnerov, B.C., Walendziewicz, C.L., Hewitson, J., Xiao, W., Mahajan-Miklos, S., *et al.* (2003) The *Drosophila melanogaster* toll pathway participates in resistance to infection by the gram-negative human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **71**: 4059–66.
- Lau, G.W., Ran, H., Kong, F., Hassett, D.J., and Mavrodi, D. (2004) *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice. *Infect Immun* **72**: 4275–8.
- Laub, M.T., and Goulian, M. (2007) Specificity in two-component signal transduction pathways. *Annu Rev Genet* **41**: 121–45.
- Lee, J.-S., Heo, Y.-J., Lee, J.K., and Cho, Y.-H. (2005) KatA, the major catalase, is critical for osmoprotection and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Infect Immun* **73**: 4399–403.
- Lee, J.-Y., and Ko, K.S. (2014) Mutations and expression of PmrAB and PhoPQ related with colistin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* **78**:

271–276.

- Leeper-Woodford, S.K., Carey, P.D., Byrne, K., Fisher, B.J., Blocher, C., Sugerman, H.J., and Fowler, A.A. (1991) Ibuprofen attenuates plasma tumor necrosis factor activity during sepsis-induced acute lung injury. *J Appl Physiol* **71**: 915–23.
- Lemaitre, B., and Hoffmann, J. (2007) The Host Defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol* **25**: 697–743.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.-M., and Hoffmann, J.A. (1996) The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette *spätzle/Toll/cactus* Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults. *Cell* **86**: 973–983.
- Lemaitre, B., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1997) *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 14614–9.
- LeRoux, M., Kirkpatrick, R.L., Montauti, E.I., Tran, B.Q., Peterson, S.B., Harding, B.N., *et al.* (2015) Kin cell lysis is a danger signal that activates antibacterial pathways of *Pseudomonas aeruginosa*. *Elife* **4**.
- Lesic, B., Starkey, M., He, J., Hazan, R., and Rahme, L.G. (2009) Quorum sensing differentially regulates *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion locus I and homologous loci II and III, which are required for pathogenesis. *Microbiology* **155**: 2845–2855.
- Li, W., and Lu, C.-D. (2007) Regulation of Carbon and Nitrogen Utilization by CbrAB and NtrBC Two-Component Systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **189**: 5413–5420.
- Liberati, N.T., Urbach, J.M., Miyata, S., Lee, D.G., Drenkard, E., Wu, G., *et al.* (2006) An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 2833–8.
- Lin, C.-T., Huang, Y.-J., Chu, P.-H., Hsu, J.-L., Huang, C.-H., and Peng, H.-L. (2006) Identification of an HptB-mediated multi-step phosphorelay in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Res Microbiol* **157**: 169–175.
- Linnane, S.J., Keatings, V.M., Costello, C.M., Moynihan, J.B., O’Connor, C.M., FITZGERALD, M.X., and McLoughlin, P. (1998) Total Sputum Nitrate plus Nitrite Is Raised during Acute Pulmonary Infection in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **158**: 207–212.
- Liu, B., Yuan, J., Yiu, S.-M., Li, Z., Xie, Y., Chen, Y., *et al.* (2012) COPE: an accurate k-mer-based pair-end reads connection tool to facilitate genome assembly. *Bioinformatics* **28**: 2870–2874.
- Liu, Y.-F., Liao, C.-T., Song, W.-L., Hsu, P.-C., Du, S.-C., Lo, H.-H., and Hsiao, Y.-M. (2013) GsmR, a response regulator with an HD-related output domain in *Xanthomonas campestris*, is positively controlled by Clp and is involved in the expression of genes responsible for flagellum synthesis. *FEBS J* **280**: 199–213.
- 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.
- Lizewski, S.E., Lundberg, D.S., and Schurr, M.J. (2002) The transcriptional regulator AlgR is essential for *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Infect Immun* **70**: 6083–93.
- Lohrmann, J., and Harter, K. (2002) Plant Two-Component Signaling Systems and the Role of Response Regulators. *PLANT Physiol* **128**: 363–369.
- Lopez, C.A., Rivera-Chávez, F., Byndloss, M.X., and Bäumlner, A.J. (2015) The Periplasmic Nitrate Reductase NapABC Supports Luminal Growth of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium during Colitis. *Infect Immun* **83**: 3470–3478.
- Lyczak, J.B., Cannon, C.L., and Pier, G.B. (2000) Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect* **2**: 1051–1060.

- Macfarlane, E.L., Kwasnicka, A., Ochs, M.M., and Hancock, R.E. (1999) PhoP-PhoQ homologues in *Pseudomonas aeruginosa* regulate expression of the outer-membrane protein OprH and polymyxin B resistance. *Mol Microbiol* **34**: 305–16.
- Magoc, T., Wood, D., and Salzberg, S.L. (2013) EDGE-pro: Estimated Degree of Gene Expression in Prokaryotic Genomes. *Evol Bioinform Online* **9**: 127–36.
- Mahajan-Miklos, S., Tan, M.-W., Rahme, L.G., and Ausubel, F.M. (1999) Molecular Mechanisms of Bacterial Virulence Elucidated Using a *Pseudomonas aeruginosa*–*Caenorhabditis elegans* Pathogenesis Model. *Cell* **96**: 47–56.
- Maule, A.F., Wright, D.D.P., Weiner, J.J., Han, L., Peterson, F.C., Volkman, B.F.B., *et al.* (2015) The Aspartate-Less Receiver (ALR) Domains: Distribution, Structure and Function. *PLoS Pathog* **11**: e1004795.
- McDaniel, T.K., DeWalt, K.C., Salama, N.R., and Falkow, S. (2001) New Approaches for Validation of Lethal Phenotypes and Genetic Reversion in *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* **6**: 15–23.
- McLaughlin, H.P., Caly, D.L., McCarthy, Y., Ryan, R.P., and Dow, J.M. (2012) An Orphan Chemotaxis Sensor Regulates Virulence and Antibiotic Tolerance in the Human Pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* **7**: e42205.
- McPhee, J.B., Bains, M., Winsor, G., Lewenza, S., Kwasnicka, A., Brazas, M.D., *et al.* (2006) Contribution of the PhoP-PhoQ and PmrA-PmrB two-component regulatory systems to Mg²⁺-induced gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **188**: 3995–4006.
- McPhee, J.B., Lewenza, S., and Hancock, R.E.W. (2003) Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, PmrA-PmrB, that regulates resistance to polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **50**: 205–17.
- Mern, D.S., Ha, S.W., Khodaverdi, V., Gliese, N., and Gorisch, H. (2010) A complex regulatory network controls aerobic ethanol oxidation in *Pseudomonas aeruginosa*: indication of four levels of sensor kinases and response regulators. *Microbiology* **156**: 1505–1516.
- 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.
- Mikkelsen, H., Hui, K., Barraud, N., and Filloux, A. (2013) The pathogenicity island encoded PvrSR/RcsCB regulatory network controls biofilm formation and dispersal in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Mol Microbiol* **89**: 450–63.
- Morissette, C., Francoeur, C., Darmond-Zwaig, C., and Gervais, F. (1996) Lung phagocyte bactericidal function in strains of mice resistant and susceptible to *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **64**: 4984–92.
- Morris, E.R., Hall, G., Li, C., Heeb, S., Kulkarni, R. V, Lovelock, L., *et al.* (2013) Structural rearrangement in an RsmA/CsrA ortholog of *Pseudomonas aeruginosa* creates a dimeric RNA-binding protein, RsmN. *Structure* **21**: 1659–71.
- Moscoso, J.A., Jaeger, T., Valentini, M., Hui, K., Jenal, U., and Filloux, A. (2014) The Diguanylate Cyclase SadC Is a Central Player in Gac/Rsm-Mediated Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **196**: 4081–4088.
- Moscoso, J.A., Mikkelsen, H., Heeb, S., Williams, P., and Filloux, A. (2011) The *Pseudomonas aeruginosa* sensor RetS switches Type III and Type VI secretion via c-di-GMP signalling. *Environ Microbiol* **13**: 3128–3138.
- Moskowitz, S.M., Ernst, R.K., and Miller, S.I. (2004) PmrAB, a two-component regulatory system of *Pseudomonas aeruginosa* that modulates resistance to cationic antimicrobial peptides and addition of aminoarabinose to lipid A. *J Bacteriol* **186**: 575–9.

- Mota, L.J., and Cornelis, G.R. (2005) The bacterial injection kit: Type III secretion systems. *Ann Med* **37**: 234–249.
- Mulcahy, H., O’Callaghan, J., O’Grady, E.P., Macia, M.D., Borrell, N., Gomez, C., *et al.* (2008) *Pseudomonas aeruginosa* RsmA Plays an Important Role during Murine Infection by Influencing Colonization, Virulence, Persistence, and Pulmonary Inflammation. *Infect Immun* **76**: 632–638.
- Muller, C., Plésiat, P., and Jeannot, K. (2011) A two-component regulatory system interconnects resistance to polymyxins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and β -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **55**: 1211–21.
- Nakamoto, M., Moy, R.H., Xu, J., Bambina, S., Yasunaga, A., Shelly, S.S., *et al.* (2012) Virus Recognition by Toll-7 Activates Antiviral Autophagy in *Drosophila*. *Immunity* **36**: 658–667.
- Netea, M.G., Quintin, J., and Meer, J.W.M. van der (2011) Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell Host Microbe* **9**: 355–61.
- 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.
- 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 Lett* **301**: 115–123.
- Noriega, C.E., Lin, H.-Y., Chen, L.-L., Williams, S.B., and Stewart, V. (2010) Asymmetric cross-regulation between the nitrate-responsive NarX-NarL and NarQ-NarP two-component regulatory systems from *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* **75**: 394–412.
- O’Callaghan, J., Reen, F.J., Adams, C., Casey, P.G., Gahan, C.G.M., and O’Gara, F. (2012) A novel host-responsive sensor mediates virulence and type III secretion during *Pseudomonas aeruginosa*-host cell interactions. *Microbiology* **158**: 1057–1070.
- Okkotsu, Y., Little, A.S., and Schurr, M.J. (2014) The *Pseudomonas aeruginosa* AlgZR two-component system coordinates multiple phenotypes. *Front Cell Infect Microbiol* **4**: 82.
- Overhage, J., Lewenza, S., Marr, A.K., and Hancock, R.E.W. (2007) Identification of Genes Involved in Swarming Motility Using a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Mini-Tn5-lux Mutant Library. *J Bacteriol* **189**: 2164–2169.
- Padmanabha, D., and Baker, K.D. (2014) *Drosophila* gains traction as a repurposed tool to investigate metabolism. *Trends Endocrinol Metab* **25**: 518–527.
- Parkins, M.D., Ceri, H., and Storey, D.G. (2001) *Pseudomonas aeruginosa* GacA, a factor in multihost virulence, is also essential for biofilm formation. *Mol Microbiol* **40**: 1215–26.
- Persat, A., Inclan, Y.F., Engel, J.N., Stone, H.A., and Gitai, Z. (2015) Type IV pili mechanochemically regulate virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci* **112**: 7563–7568.
- Pessi, G., Williams, F., Hindle, Z., Heurlier, K., Holden, M.T., Cámara, M., *et al.* (2001) The global posttranscriptional regulator RsmA modulates production of virulence determinants and N-acylhomoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **183**: 6676–83.
- Petrova, O.E., Cherny, K.E., and Sauer, K. (2014) The *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclase GcbA, a homolog of *P. fluorescens* GcbA, promotes initial attachment to surfaces, but not biofilm formation, via regulation of motility. *J Bacteriol* **196**: 2827–41.
- Petrova, O.E., and Sauer, K. (2009) A Novel Signaling Network Essential for Regulating *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development. *PLoS Pathog* **5**: e1000668.
- Petrova, O.E., and Sauer, K. (2010) The novel two-component regulatory system BfiSR regulates biofilm development by controlling the small RNA rsmZ through CafA. *J Bacteriol* **192**: 5275–88.

- Petrova, O.E., and Sauer, K. (2011) SagS contributes to the motile-sessile switch and acts in concert with BfiSR to enable *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *J Bacteriol* **193**: 6614–28.
- Pflock, M., Bathon, M., Schar, J., Muller, S., Mollenkopf, H., Meyer, T.F., and Beier, D. (2007) The Orphan Response Regulator HP1021 of *Helicobacter pylori* Regulates Transcription of a Gene Cluster Presumably Involved in Acetone Metabolism. *J Bacteriol* **189**: 2339–2349.
- Potvin, E., Lehoux, D.E., Kukavica-Ibrulj, I., Richard, K.L., Sanschagrin, F., Lau, G.W., and Levesque, R.C. (2003) In vivo functional genomics of *Pseudomonas aeruginosa* for high-throughput screening of new virulence factors and antibacterial targets. *Environ Microbiol* **5**: 1294–308.
- Rahme, L.G., Ausubel, F.M., Cao, H., Drenkard, E., Goumnerov, B.C., Lau, G.W., et al. (2000) Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 8815–21.
- 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**: 1899–902.
- Rahme, L.G., Tan, M.W., Le, L., Wong, S.M., Tompkins, R.G., Calderwood, S.B., and Ausubel, F.M. (1997) Use of model plant hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 13245–50.
- Ramphal, R., Balloy, V., Jyot, J., Verma, A., Si-Tahar, M., and Chignard, M. (2008) Control of *Pseudomonas aeruginosa* in the Lung Requires the Recognition of Either Lipopolysaccharide or Flagellin. *J Immunol* **181**: 586–592.
- Rao, J., Elliott, M.R., Leitinger, N., Jensen, R. V., Goldberg, J.B., and Amin, A.R. (2011) RahU: An inducible and functionally pleiotropic protein in *Pseudomonas aeruginosa* modulates innate immunity and inflammation in host cells. *Cell Immunol* **270**: 103–113.
- Raoust, E., Balloy, V., Garcia-Verdugo, I., Touqui, L., Ramphal, R., and Chignard, M. (2009) *Pseudomonas aeruginosa* LPS or Flagellin Are Sufficient to Activate TLR-Dependent Signaling in Murine Alveolar Macrophages and Airway Epithelial Cells. *PLoS One* **4**: e7259.
- Reimmann, C., Beyeler, M., Latifi, A., Winteler, H., Foglino, M., Lazdunski, A., and Haas, D. (1997) The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer N-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase. *Mol Microbiol* **24**: 309–19.
- Ritchings, B.W., Almira, E.C., Lory, S., and Ramphal, R. (1995) Cloning and phenotypic characterization of fleS and fleR, new response regulators of *Pseudomonas aeruginosa* which regulate motility and adhesion to mucin. *Infect Immun* **63**: 4868–76.
- Robinson, M.D., McCarthy, D.J., and Smyth, G.K. (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**: 139–140.
- Ruiz, D., Salinas, P., Lopez-Redondo, M.L., Cayuela, M.L., Marina, A., and Contreras, A. (2008) Phosphorylation-independent activation of the atypical response regulator NblR. *Microbiology* **154**: 3002–3015.
- Ryan, R.P., Fouhy, Y., Garcia, B.F., Watt, S.A., Niehaus, K., Yang, L., et al. (2008) Interspecies signalling via the *Stenotrophomonas maltophilia* diffusible signal factor influences biofilm formation and polymyxin tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **68**: 75–86.
- Ryan, R.P., Lucey, J., O'Donovan, K., McCarthy, Y., Yang, L., Tolker-Nielsen, T., and Dow, J.M. (2009) HD-GYP domain proteins regulate biofilm formation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* **11**: 1126–1136.
- Salinas, P., Ruiz, D., Cantos, R., Lopez-Redondo, M.L., Marina, A., and Contreras, A. (2007)

- The regulatory factor SipA provides a link between NblS and NblR signal transduction pathways in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Mol Microbiol* **0**: 071120025032002–???
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1990) Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harb Lab* **61**: 17–18.
- Sarkar, M.K., Paul, K., and Blair, D. (2010) Chemotaxis signaling protein CheY binds to the rotor protein FliN to control the direction of flagellar rotation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci* **107**: 9370–9375.
- Schreiber, K., Krieger, R., Benkert, B., Eschbach, M., Arai, H., Schobert, M., and Jahn, D. (2007) The anaerobic regulatory network required for *Pseudomonas aeruginosa* nitrate respiration. *J Bacteriol* **189**: 4310–4.
- Schulz, S., Eckweiler, D., Bielecka, A., Nicolai, T., Franke, R., Dötsch, A., *et al.* (2015) Elucidation of Sigma Factor-Associated Networks in *Pseudomonas aeruginosa* Reveals a Modular Architecture with Limited and Function-Specific Crosstalk. *PLoS Pathog* **11**: e1004744.
- Syednasrollah, F., Laiho, A., and Elo, L.L. (2015) Comparison of software packages for detecting differential expression in RNA-seq studies. *Brief Bioinform* **16**: 59–70.
- Silversmith, R.E., Wang, B., Fulcher, N.B., Wolfgang, M.C., and Bourret, R.B. (2016) Phosphoryl Group Flow within the *Pseudomonas aeruginosa* Pil-Chp Chemosensory System: Differential function of the eight phosphotransferase and three receiver domains. *J Biol Chem* **291**: 17677–91.
- Simon, R., Priefer, U., and Pühler, A. (1983) A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Bio/Technology* **1**: 784–791.
- Sivaneson, M., Mikkelsen, H., Ventre, I., Bordi, C., and Filloux, A. (2011) Two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*: an intricate network mediating fimbrial and efflux pump gene expression. *Mol Microbiol* **79**: 1353–1366.
- Skurnik, D., Roux, D., Aschard, H., Cattoir, V., Yoder-Himes, D., Lory, S., and Pier, G.B. (2013) A Comprehensive Analysis of In Vitro and In Vivo Genetic Fitness of *Pseudomonas aeruginosa* Using High-Throughput Sequencing of Transposon Libraries. *PLoS Pathog* **9**: e1003582.
- Snyderman, R., Pike, M.C., Fischer, D.G., and Koren, H.S. (1977) Biologic and biochemical activities of continuous macrophage cell lines P388D1 and J774.1. *J Immunol* **119**: 2060–6.
- Soscia, C., Hachani, A., Bernadac, A., Filloux, A., and Bleves, S. (2007) Cross talk between type III secretion and flagellar assembly systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **189**: 3124–32.
- Stock, A.M., Robinson, V.L., and Goudreau, P.N. (2000) Two-Component Signal Transduction. *Annu Rev Biochem* **69**: 183–215.
- Tan, M.-W., Rahme, L.G., Sternberg, J.A., Tompkins, R.G., and Ausubel, F.M. (1999) *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors. *Proc Natl Acad Sci* **96**: 2408–2413.
- Tan, M.W., Mahajan-Miklos, S., and Ausubel, F.M. (1999) Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 715–20.
- Tatke, G., Kumari, H., Silva-Herzog, E., Ramirez, L., and Mathee, K. (2015) *Pseudomonas aeruginosa* MifS-MifR Two-Component System Is Specific for α -Ketoglutarate Utilization. *PLoS One* **10**: e0129629.
- Teitzel, G.M., Geddie, A., Long, S.K. De, Kirisits, M.J., Whiteley, M., and Parsek, M.R. (2006) Survival and growth in the presence of elevated copper: transcriptional profiling of copper-

- stressed *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **188**: 7242–56.
- Tian, Z.-X., Yi, X.-X., Cho, A., O’Gara, F., and Wang, Y.-P. (2016) CpxR Activates MexAB-OprM Efflux Pump Expression and Enhances Antibiotic Resistance in Both Laboratory and Clinical nalB-Type Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog* **12**: e1005932.
- Trunk, K., Benkert, B., Quäck, N., Münch, R., Scheer, M., Garbe, J., *et al.* (2009) Anaerobic adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: definition of the Anr and Dnr regulons. *Environ Microbiol* **12**: 1719–1733.
- Tsai, J.W., and Alley, M.R. (2000) Proteolysis of the McpA chemoreceptor does not require the *Caulobacter major* chemotaxis operon. *J Bacteriol* **182**: 504–7.
- Turner, K.H., Everett, J., Trivedi, U., Rumbaugh, K.P., and Whiteley, M. (2014) Requirements for *Pseudomonas aeruginosa* Acute Burn and Chronic Surgical Wound Infection. *PLoS Genet* **10**: e1004518.
- Ulich, T.R., Watson, L.R., Yin, S.M., Guo, K.Z., Wang, P., Thang, H., and Castillo, J. del (1991) The intratracheal administration of endotoxin and cytokines. I. Characterization of LPS-induced IL-1 and TNF mRNA expression and the LPS-, IL-1-, and TNF-induced inflammatory infiltrate. *Am J Pathol* **138**: 1485–96.
- Valentini, M., Laventie, B.-J., Moscoso, J., Jenal, U., and Filloux, A. (2016) The Diguanylate Cyclase HsbD Intersects with the HptB Regulatory Cascade to Control *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm and Motility. *PLoS Genet* **12**: e1006354.
- Valentini, M., Storelli, N., and Lapouge, K. (2011) Identification of C(4)-dicarboxylate transport systems in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* **193**: 4307–16.
- Valverde, C., Heeb, S., Keel, C., and Haas, D. (2003) RsmY, a small regulatory RNA, is required in concert with RsmZ for GacA-dependent expression of biocontrol traits in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol Microbiol* **50**: 1361–79.
- Vasil, M.L., and Ochsner, U.A. (1999) The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics, biochemistry and virulence. *Mol Microbiol* **34**: 399–413.
- Ventre, I., Goodman, A.L., Vallet-Gely, I., Vasseur, P., Soscia, C., Molin, S., *et al.* (2006) Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 171–6.
- Wagner, V.E., and Iglewski, B.H. (2008) *P. aeruginosa* Biofilms in CF Infection. *Clin Rev Allergy Immunol* **35**: 124–134.
- Wagner, V.E., Li, L.-L., Isabella, V.M., and Iglewski, B.H. (2007) Analysis of the hierarchy of quorum-sensing regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Anal Bioanal Chem* **387**: 469–479.
- Wang, D., Seeve, C., Pierson, L.S., and Pierson, E.A. (2013) Transcriptome profiling reveals links between ParS/ParR, MexEF-OprN, and quorum sensing in the regulation of adaptation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Genomics* **14**: 618.
- Wang, Y., Ha, U., Zeng, L., and Jin, S. (2003) Regulation of membrane permeability by a two-component regulatory system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 95–101.
- Whitchurch, C.B., Alm, R.A., and Mattick, J.S. (1996) The alginate regulator AlgR and an associated sensor FimS are required for twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 9839–43.
- Whitchurch, C.B., Leech, A.J., Young, M.D., Kennedy, D., Sargent, J.L., Bertrand, J.J., *et al.* (2004) Characterization of a complex chemosensory signal transduction system which controls twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **52**: 873–893.
- Winsor, G.L., Griffiths, E.J., Lo, R., Dhillon, B.K., Shay, J.A., and Brinkman, F.S.L. (2016) Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the

- Pseudomonas genome database. *Nucleic Acids Res* **44**: D646–D653.
- Wolfgang, M.C., Lee, V.T., Gilmore, M.E., and Lory, S. (2003) Coordinate regulation of bacterial virulence genes by a novel adenylate cyclase-dependent signaling pathway. *Dev Cell* **4**: 253–63.
- Wozniak, D.J., and Ohman, D.E. (1991) *Pseudomonas aeruginosa* AlgB, a two-component response regulator of the NtrC family, is required for algD transcription. *J Bacteriol* **173**: 1406–13.
- Wretlind, B., and Pavlovskis, O.R. *Pseudomonas aeruginosa* elastase and its role in pseudomonas infections. *Rev Infect Dis* **5 Suppl 5**: S998-1004.
- Xu, L., Venkataramani, P., Ding, Y., Liu, Y., Deng, Y., Yong, G.L., *et al.* (2016) A Cyclic di-GMP-binding Adaptor Protein Interacts with Histidine Kinase to Regulate Two-component Signaling. *J Biol Chem* **291**: 16112–16123.
- Yakhnina, A.A., McManus, H.R., and Bernhardt, T.G. (2015) The cell wall amidase AmiB is essential for *Pseudomonas aeruginosa* cell division, drug resistance and viability. *Mol Microbiol* **97**: 957–973.
- Yang, Z., and Lu, C.-D. (2007) Functional genomics enables identification of genes of the arginine transaminase pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **189**: 3945–53.
- Yeung, A.T.Y., Bains, M., and Hancock, R.E.W. (2011) The sensor kinase CbrA is a global regulator that modulates metabolism, virulence, and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **193**: 918–31.
- Yeung, A.T.Y., Janot, L., Pena, O.M., Neidig, A., Kukavica-Ibrulj, I., Hilchie, A., *et al.* (2014) Requirement of the *Pseudomonas aeruginosa* CbrA Sensor Kinase for Full Virulence in a Murine Acute Lung Infection Model. *Infect Immun* **82**: 1256–1267.
- Zamorano, L., Moyà, B., Juan, C., Mulet, X., Blázquez, J., and Oliver, A. (2014) The *Pseudomonas aeruginosa* CreBC two-component system plays a major role in the response to β -lactams, fitness, biofilm growth, and global regulation. *Antimicrob Agents Chemother* **58**: 5084–95.

7. Anexo

Anexo I



Universidade de São Paulo
Instituto de Química

CERTIFICADO Nº 17/2015

Certifico que o Projeto "Envolvimento do Regulador de resposta atípico atvR (PA14_26570) na virulência de Pseudomonas aeruginosa PA14", desenvolvido sob responsabilidade da **Profa. Dra. Regina Lúcia Baldini**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA), do IQ-USP, em 25/03/2015.

We attest that the project entitled "Envolvimento do Regulador de resposta atípico atvR (PA14_26570) na virulência de Pseudomonas aeruginosa PA14", developed under the responsibility of Dr. **Regina Lúcia Baldini**, is in agreement with the National Council for Control of Animal Experimentation and has been approved by the Internal Animal Care and Use Committee of the Institute of Chemistry, University of São Paulo, on 3/25/2015.

São Paulo, 25 de março de 2015



Profa. Dra. Nadja Cristhina de Souza Pinto
Coordenadora CEUA

Tabela Anexo II. Genes regulados positivamente em PA14/pAtvR x PA14/pJN105

PA14 locus	PAO1 locus	gene	logF C	FDR	Operon
PA14_00820	PA0070	tagQ1	1,07	1,37E-02	PA14_00820;PA14_00830;PA14_00850;PA14_00860;PA14_00875;PA14_00890;PA14_00900;PA14_00910
PA14_01030	PA0085	hcp1	1,08	1,04E-02	
PA14_01170	PA0096		1,22	3,53E-02	PA14_01160; PA14_01170 ;PA14_01180;PA14_01190;PA14_01200;PA14_01220;PA14_01230
PA14_01490	PA0122	rahU	1,07	4,83E-03	
PA14_02200	PA0175	cheR2	1,57	5,58E-04	PA14_02180;PA14_02190; PA14_02200;PA14_02220;PA14_02230;PA14_02250;PA14_02260
PA14_02220	PA0176	aer2	1,76	4,65E-06	PA14_02180;PA14_02190; PA14_02200;PA14_02220;PA14_02230;PA14_02250;PA14_02260
PA14_02230	PA0177	cheW	1,67	2,42E-05	PA14_02180;PA14_02190; PA14_02200;PA14_02220;PA14_02230;PA14_02250;PA14_02260
PA14_02250	PA0178	cheA	1,66	6,67E-06	PA14_02180;PA14_02190; PA14_02200;PA14_02220;PA14_02230;PA14_02250;PA14_02260
PA14_02260	PA0179		1,43	1,62E-04	PA14_02180;PA14_02190; PA14_02200;PA14_02220;PA14_02230;PA14_02250;PA14_02260
PA14_03510	PA0270		1,30	3,63E-03	PA14_03490; PA14_03510 ;PA14_03520
PA14_04650	PA0355	pfpI	1,07	1,31E-02	
PA14_05820	PA0446		1,54	1,81E-04	
PA14_05840	PA0447	gcdH	1,54	7,31E-04	
PA14_06000	PA0459	clpC	1,73	7,87E-04	
PA14_06650	PA0509	nirN	2,54	9,36E-13	PA14_06650;PA14_06660;PA14_06670;PA14_06680;PA14_06690;PA14_06700;PA14_06710;PA14_06720;PA14_06730;PA14_06740;PA14_06750
PA14_06660	PA0510	nirE	3,25	3,31E-18	PA14_06650;PA14_06660;PA14_06670;PA14_06680;PA14_06690;PA14_06700;PA14_06710;PA14_06720;PA14_06730;PA14_06740;PA14_06750
PA14_06670	PA0511	nirJ	2,85	1,77E-17	PA14_06650;PA14_06660;PA14_06670;PA14_06680;PA14_06690;PA14_06700;PA14_06710;PA14_06720;PA14_06730;PA14_06740;PA14_06750
PA14_06680	PA0512	nirH	2,55	6,84E-13	PA14_06650;PA14_06660;PA14_06670;PA14_06680;PA14_06690;PA14_06700;PA14_06710;PA14_06720;PA14_06730;PA14_06740;PA14_06750
PA14_06690	PA0513	nirG	2,34	1,20E-10	PA14_06650;PA14_06660;PA14_06670;PA14_06680;PA14_06690;PA14_06700;PA14_06710;PA14_06720;PA14_06730;PA14_06740;PA14_06750

PA14_0670 0	PA051 4	nirL	2,17	7,12E-10	PA14_06650;PA14_06660;PA14_06670;PA14_06680;PA14_06690;PA14_06700;PA14_06710;PA14_06720;PA14_06730;PA14_06740;PA14_06750
PA14_0671 0	PA051 5	nirD	1,93	1,70E-08	PA14_06650;PA14_06660;PA14_06670;PA14_06680;PA14_06690;PA14_06700;PA14_06710;PA14_06720;PA14_06730;PA14_06740;PA14_06750
PA14_0672 0	PA051 6	nirF	1,69	5,17E-07	PA14_06650;PA14_06660;PA14_06670;PA14_06680;PA14_06690;PA14_06700;PA14_06710;PA14_06720;PA14_06730;PA14_06740;PA14_06750
PA14_0673 0	PA051 7	nirC	1,98	6,73E-08	PA14_06650;PA14_06660;PA14_06670;PA14_06680;PA14_06690;PA14_06700;PA14_06710;PA14_06720;PA14_06730;PA14_06740;PA14_06750
PA14_0674 0	PA051 8	nirM	2,19	2,06E-09	PA14_06650;PA14_06660;PA14_06670;PA14_06680;PA14_06690;PA14_06700;PA14_06710;PA14_06720;PA14_06730;PA14_06740;PA14_06750
PA14_0675 0	PA051 9	nirS	1,69	1,62E-04	PA14_06650;PA14_06660;PA14_06670;PA14_06680;PA14_06690;PA14_06700;PA14_06710;PA14_06720;PA14_06730;PA14_06740;PA14_06750
PA14_0677 0	PA052 0	nirQ	1,50	1,50E-05	PA14_06770;PA14_06790;PA14_06800
PA14_0679 0	PA052 1	nirO	1,27	1,04E-02	PA14_06770;PA14_06790;PA14_06800
PA14_0681 0	PA052 3	norC	2,61	6,17E-05	PA14_06810;PA14_06830;PA14_06840
PA14_0683 0	PA052 4	norB	2,90	7,34E-06	PA14_06810;PA14_06830;PA14_06840
PA14_0686 0	PA052 6		1,32	3,59E-02	PA14_06860;PA14_06870
PA14_0743 0	PA057 2		1,10	1,11E-02	
PA14_0766 0	PA058 7	yeaH	1,17	8,46E-03	PA14_07650;PA14_07660;PA14_07680
PA14_0768 0	PA058 8	yeaG	1,40	1,52E-03	PA14_07650;PA14_07660;PA14_07680
PA14_0915 0	PA423 6	katA	1,22	8,40E-03	
PA14_0940 0	PA421 7	phzS	1,89	4,95E-06	
PA14_0941 0	PA421 6	phzG1	2,84	2,68E-12	PA14_09410;PA14_09420;PA14_09440;PA14_09450;PA14_09460
PA14_0942 0	PA421 5	phzF1	2,24	7,07E-07	PA14_09410;PA14_09420;PA14_09440;PA14_09450;PA14_09460
PA14_0944 0	PA421 4	phzE1	2,56	1,94E-10	PA14_09410;PA14_09420;PA14_09440;PA14_09450;PA14_09460
PA14_0945 0	PA421 3	phzD1	2,67	1,05E-08	PA14_09410;PA14_09420;PA14_09440;PA14_09450;PA14_09460
PA14_0946 0	PA421 2	phzC1	3,19	1,74E-12	PA14_09410;PA14_09420;PA14_09440;PA14_09450;PA14_09460

PA14_0947 0	PA421 1	phzB1	3,31	2,10E-14	
PA14_0948 0	PA421 0	phzA1	2,61	2,85E-07	
PA14_0949 0	PA420 9	phzM	1,43	3,19E-04	
PA14_0950 0	PA420 8	opmD	1,27	2,91E-03	PA14_09500;PA14_09520;PA14_09530;PA14_09540
PA14_1036 0	PA414 1		1,01	1,74E-02	
PA14_1047 0	PA413 6	sur/bcr	1,29	3,02E-02	
PA14_1049 0	PA413 4		2,96	2,43E-13	PA14_10490;PA14_10500
PA14_1050 0	PA413 3	cytN/cc oN/fixN	3,61	2,76E-12	PA14_10490;PA14_10500
PA14_1053 0	PA413 2		2,99	1,75E-11	
PA14_1054 0	PA413 1		3,54	3,59E-09	
PA14_1055 0	PA413 0		2,48	2,39E-07	PA14_10550;PA14_10560
PA14_1056 0	PA412 9		2,54	1,52E-10	PA14_10550;PA14_10560
PA14_1057 0	PA412 8	hpcH	2,18	5,17E-07	PA14_10570;PA14_10590;PA14_10600
PA14_1059 0	PA412 7	hpcG	1,37	9,43E-04	PA14_10570;PA14_10590;PA14_10600
PA14_1179 0	PA402 3	eutP	1,01	2,66E-02	PA14_11760;PA14_11770;PA14_11790
PA14_1181 0	PA402 2	hdhA	2,05	2,44E-08	
PA14_1303 0	PA393 0	cioA	1,07	7,56E-03	PA14_13030;PA14_13040;PA14_13050
PA14_1313 0	PA392 3		1,05	3,01E-02	PA14_13130;PA14_13140
PA14_1314 0	PA392 2		1,40	2,57E-03	PA14_13130;PA14_13140
PA14_1326 0	PA391 5	moaB1	3,35	1,15E-21	PA14_13260;PA14_13280
PA14_1328 0	PA391 4	moeA1	3,37	2,34E-20	PA14_13260;PA14_13280

PA14_1332 0	PA391 1	yhbT	1,29	4,86E-04	PA14_13290;PA14_13300;PA14_13320
PA14_1375 0	PA387 7	narK1	1,86	1,71E-04	PA14_13750;PA14_13770;PA14_13780;PA14_13800;PA14_13810;PA14_13830;PA14_13840;PA14_13850
PA14_1377 0	PA387 6	narK2	2,44	7,78E-11	PA14_13750;PA14_13770;PA14_13780;PA14_13800;PA14_13810;PA14_13830;PA14_13840;PA14_13850
PA14_1378 0	PA387 5	narG	3,35	9,51E-13	PA14_13750;PA14_13770;PA14_13780;PA14_13800;PA14_13810;PA14_13830;PA14_13840;PA14_13850
PA14_1380 0	PA387 4	narH	3,42	3,54E-09	PA14_13750;PA14_13770;PA14_13780;PA14_13800;PA14_13810;PA14_13830;PA14_13840;PA14_13850
PA14_1381 0	PA387 3	narJ	3,18	6,77E-08	PA14_13750;PA14_13770;PA14_13780;PA14_13800;PA14_13810;PA14_13830;PA14_13840;PA14_13850
PA14_1383 0	PA387 2	narI	3,27	7,62E-10	PA14_13750;PA14_13770;PA14_13780;PA14_13800;PA14_13810;PA14_13830;PA14_13840;PA14_13850
PA14_1384 0	PA387 1		2,12	7,34E-06	PA14_13750;PA14_13770;PA14_13780;PA14_13800;PA14_13810;PA14_13830;PA14_13840;PA14_13850
PA14_1385 0	PA387 0	moaA	1,44	2,08E-02	PA14_13750;PA14_13770;PA14_13780;PA14_13800;PA14_13810;PA14_13830;PA14_13840;PA14_13850
PA14_1507 0	PA379 0	oprC	1,02	1,43E-02	PA14_15070;PA14_15080
PA14_1625 0	PA372 4	lasB	1,15	2,67E-03	
PA14_1637 0	PA371 2		1,03	1,06E-02	
PA14_1663 0	PA369 2	lptF	1,16	2,17E-03	PA14_16630;PA14_16640
PA14_1664 0	PA369 1		1,26	5,20E-04	PA14_16630;PA14_16640
PA14_1748 0	PA362 2	rpoS	1,32	1,52E-03	
PA14_1812 0	PA357 0	mmsA	1,40	8,83E-03	PA14_18120;PA14_18140
PA14_1814 0	PA356 9	mmsB	1,44	2,37E-02	PA14_18120;PA14_18140
PA14_1910 0	PA347 9	rhlA	1,38	1,62E-04	
PA14_2019 0	PA339 3	nosD	2,01	2,08E-02	PA14_20150;PA14_20170;PA14_20180;PA14_20190;PA14_20200;PA14_20230
PA14_2020 0	PA339 2	nosZ	2,91	1,26E-03	PA14_20150;PA14_20170;PA14_20180;PA14_20190;PA14_20200;PA14_20230
PA14_2092 0	PA333 5		2,50	3,01E-11	

PA14_2094 0	PA333 4		2,65	1,14E-10	PA14_20940;PA14_20950;PA14_20960;PA14_20970;PA14_20980;PA14_21000;PA14_21010;PA14_21020
PA14_2095 0	PA333 3	fabH2	2,59	3,17E-10	PA14_20940;PA14_20950;PA14_20960;PA14_20970;PA14_20980;PA14_21000;PA14_21010;PA14_21020
PA14_2096 0	PA333 2		2,61	1,25E-10	PA14_20940;PA14_20950;PA14_20960;PA14_20970;PA14_20980;PA14_21000;PA14_21010;PA14_21020
PA14_2097 0	PA333 1	cyp23	2,60	2,34E-10	PA14_20940;PA14_20950;PA14_20960;PA14_20970;PA14_20980;PA14_21000;PA14_21010;PA14_21020
PA14_2098 0	PA333 0		2,96	1,52E-10	PA14_20940;PA14_20950;PA14_20960;PA14_20970;PA14_20980;PA14_21000;PA14_21010;PA14_21020
PA14_2100 0	PA332 9		2,59	6,24E-10	PA14_20940;PA14_20950;PA14_20960;PA14_20970;PA14_20980;PA14_21000;PA14_21010;PA14_21020
PA14_2101 0	PA332 8		2,51	1,13E-08	PA14_20940;PA14_20950;PA14_20960;PA14_20970;PA14_20980;PA14_21000;PA14_21010;PA14_21020
PA14_2102 0	PA332 7		2,20	5,66E-07	PA14_20940;PA14_20950;PA14_20960;PA14_20970;PA14_20980;PA14_21000;PA14_21010;PA14_21020
PA14_2103 0	PA332 6	clpP2	1,87	1,12E-06	
PA14_2122 0	PA330 9	uspK	1,13	3,12E-03	
PA14_2300 0	PA318 8	gltG	1,15	4,81E-03	PA14_22990;PA14_23000;PA14_23010;PA14_23030
PA14_2301 0	PA318 7	gltK	1,00	1,66E-02	PA14_22990;PA14_23000;PA14_23010;PA14_23030
PA14_2303 0	PA318 6	oprB	1,08	5,99E-03	PA14_22990;PA14_23000;PA14_23010;PA14_23030
PA14_2465 0	PA304 9	rmf	1,19	2,53E-02	
PA14_2474 0	PA304 2		1,49	1,61E-04	PA14_24740;PA14_24760;PA14_24770
PA14_2476 0	PA304 1	yqjE	1,58	7,68E-06	PA14_24740;PA14_24760;PA14_24770
PA14_2477 0	PA304 0	yqjD	1,40	9,44E-05	PA14_24740;PA14_24760;PA14_24770
PA14_2498 0	PA302 2		1,16	2,30E-03	
PA14_2602 0	PA293 9	pepB	1,18	5,51E-03	
PA14_2657 0	PA289 9	atvR	8,16	6,62E-79	PA14_26570;PA14_26580
PA14_2658 0	PA289 8		1,24	1,55E-02	PA14_26570;PA14_26580

PA14_2773 0	PA281 5	fadE	1,03	1,38E-02	
PA14_2805 0	PA278 8		1,72	6,39E-07	
PA14_2806 0	PA278 7	cpg2	1,74	9,72E-06	
PA14_2896 0	PA272 1		1,68	4,02E-02	
PA14_2933 0	-		1,01	4,19E-02	
PA14_3151 0	PA255 4		1,62	9,72E-06	PA14_31500;PA14_31510;PA14_31530;PA14_31540
PA14_3153 0	PA255 3		1,85	1,11E-07	PA14_31500;PA14_31510;PA14_31530;PA14_31540
PA14_3154 0	PA255 2	acdB	1,36	1,41E-03	PA14_31500;PA14_31510;PA14_31530;PA14_31540
PA14_3330 0	-		1,79	1,12E-07	PA14_33300;PA14_33310;PA14_33320;PA14_33330
PA14_3331 0	-		1,73	2,81E-06	PA14_33300;PA14_33310;PA14_33320;PA14_33330
PA14_3332 0	-		1,65	2,31E-04	PA14_33300;PA14_33310;PA14_33320;PA14_33330
PA14_3333 0	-		1,33	4,49E-03	PA14_33300;PA14_33310;PA14_33320;PA14_33330
PA14_3337 0	PA242 2		1,94	3,61E-02	
PA14_3387 0	PA238 1		1,47	2,17E-03	
PA14_3402 0	PA236 8	hsiF3	5,92	1,69E-02	PA14_33940;PA14_33960;PA14_33970;PA14_33980;PA14_33990;PA14_34000;PA14_34010;PA14_34020;PA14_34030;PA14_34050;PA14_34070
PA14_3482 0	PA230 4	ambC	2,02	7,55E-06	PA14_34810;PA14_34820;PA14_34830;PA14_34840;PA14_34850
PA14_3483 0	PA230 3	ambD	1,27	2,45E-03	PA14_34810;PA14_34820;PA14_34830;PA14_34840;PA14_34850
PA14_3484 0	PA230 2	ambE	1,57	1,04E-05	PA14_34810;PA14_34820;PA14_34830;PA14_34840;PA14_34850
PA14_3515 0	PA227 5	yahK	1,36	1,62E-04	
PA14_3549 0	PA225 0	lpdV	1,43	4,22E-05	PA14_35490;PA14_35500;PA14_35520;PA14_35530
PA14_3550 0	PA224 9	bkdB	1,36	2,64E-04	PA14_35490;PA14_35500;PA14_35520;PA14_35530

PA14_3552 0	PA224 8	bkdA2	1,31	9,47E-04	PA14_35490;PA14_35500;PA14_35520;PA14_35530
PA14_3553 0	PA224 7	bkdA1	1,17	1,14E-02	PA14_35490;PA14_35500;PA14_35520;PA14_35530
PA14_3578 0	-		1,31	2,26E-04	PA14_35780;PA14_35790
PA14_3579 0	-		1,17	1,87E-03	PA14_35780;PA14_35790
PA14_3631 0	PA219 5	hcnC	2,16	1,45E-06	PA14_36310;PA14_36320;PA14_36330
PA14_3632 0	PA219 4	hcnB	1,67	6,79E-05	PA14_36310;PA14_36320;PA14_36330
PA14_3633 0	PA219 3	hcnA	1,01	2,98E-02	PA14_36310;PA14_36320;PA14_36330
PA14_3656 0	PA216 6		1,05	3,60E-02	
PA14_3658 0	PA216 4		1,43	3,43E-02	PA14_36570; PA14_36580 ;PA14_36590;PA14_36605;PA14_36620;PA14_36630
PA14_3665 0	PA215 9		2,33	1,84E-02	PA14_36650 ;PA14_36660;PA14_36670;PA14_36680;PA14_36690;PA14_36700
PA14_3683 0	PA214 5		1,43	4,12E-02	
PA14_3708 0	PA212 6	cgrC	1,02	3,88E-02	
PA14_3709 0	PA212 5		1,01	2,81E-02	PA14_37090 ;PA14_37100
PA14_3774 5	PA206 9		1,79	8,05E-06	PA14_37745 ;PA14_37760;PA14_37770;PA14_37780
PA14_3802 0	PA204 8		1,22	2,16E-02	
PA14_3848 0	PA201 2	gnyA	1,61	2,30E-06	PA14_38440;PA14_38460;PA14_38470; PA14_38480;PA14_38490
PA14_3849 0	PA201 1	gnyL	1,50	2,11E-05	PA14_38440;PA14_38460;PA14_38470; PA14_38480;PA14_38490
PA14_3859 0	PA200 3	bdhA	1,46	4,79E-04	
PA14_3861 0	PA200 2	atoE	1,16	1,43E-02	
PA14_3863 0	PA200 1	atoB	1,74	2,42E-06	
PA14_3864 0	PA200 0	atoA	1,68	4,65E-06	PA14_38640;PA14_38660

PA14_3866 0	PA199 9	atoD	1,73	1,21E-04	PA14_38640;PA14_38660
PA14_3884 0	PA198 4	exaC	1,88	8,98E-07	PA14_38840;PA14_38850
PA14_3927 0	PA195 1	fapF	1,03	1,31E-02	
PA14_3928 0	PA195 0	rbsK	1,31	3,17E-04	PA14_39280;PA14_39300;PA14_39320;PA14_39330;PA14_39350
PA14_3956 0	PA193 0		1,16	4,80E-02	
PA14_3970 0	-		1,64	1,68E-04	PA14_39690;PA14_39700;PA14_39710
PA14_3971 0	PA191 9	nrdG	1,35	1,61E-03	PA14_39690;PA14_39700;PA14_39710
PA14_3988 0	PA421 6	phzG2	1,99	3,12E-06	PA14_39880;PA14_39890;PA14_39910;PA14_39925;PA14_39945;PA14_39960
PA14_3989 0	PA421 5	phzF2	2,24	7,07E-07	PA14_39880;PA14_39890;PA14_39910;PA14_39925;PA14_39945;PA14_39960
PA14_3991 0	PA421 4	phzE2	2,43	1,22E-08	PA14_39880;PA14_39890;PA14_39910;PA14_39925;PA14_39945;PA14_39960
PA14_3992 5	PA421 3	phzD2	2,70	2,50E-08	PA14_39880;PA14_39890;PA14_39910;PA14_39925;PA14_39945;PA14_39960
PA14_3994 5	PA421 2	phzC2	2,44	4,00E-10	PA14_39880;PA14_39890;PA14_39910;PA14_39925;PA14_39945;PA14_39960
PA14_3996 0	PA421 1	phzB2	2,72	7,51E-11	PA14_39880;PA14_39890;PA14_39910;PA14_39925;PA14_39945;PA14_39960
PA14_3997 0	PA421 0	phzA2	1,83	1,67E-03	
PA14_4030 0	PA187 0		1,15	5,00E-02	
PA14_4290 0	PA166 9	icmF2	1,13	2,72E-03	PA14_42880;PA14_42890;PA14_42900;PA14_42910;PA14_42920;PA14_42940;PA14_42950;PA14_42960;PA14_42970;PA14_42980;PA14_42990
PA14_4291 0	PA166 8	dotU2	1,45	7,57E-04	PA14_42880;PA14_42890;PA14_42900;PA14_42910;PA14_42920;PA14_42940;PA14_42950;PA14_42960;PA14_42970;PA14_42980;PA14_42990
PA14_4292 0	PA166 7	hsiJ2	1,07	6,75E-03	PA14_42880;PA14_42890;PA14_42900;PA14_42910;PA14_42920;PA14_42940;PA14_42950;PA14_42960;PA14_42970;PA14_42980;PA14_42990
PA14_4294 0	PA166 6	lip2.1	1,46	7,14E-04	PA14_42880;PA14_42890;PA14_42900;PA14_42910;PA14_42920;PA14_42940;PA14_42950;PA14_42960;PA14_42970;PA14_42980;PA14_42990
PA14_4295 0	PA166 5	fha2	1,88	1,82E-05	PA14_42880;PA14_42890;PA14_42900;PA14_42910;PA14_42920;PA14_42940;PA14_42950;PA14_42960;PA14_42970;PA14_42980;PA14_42990
PA14_4297 0	PA166 3	sfa2	1,24	1,46E-02	PA14_42880;PA14_42890;PA14_42900;PA14_42910;PA14_42920;PA14_42940;PA14_42950;PA14_42960;PA14_42970;PA14_42980;PA14_42990

PA14_4298 0	PA166 2	clpV2	1,32	2,89E-04	PA14_42880;PA14_42890;PA14_42900;PA14_42910;PA14_42920;PA14_42940;PA14_42950;PA14_42960;PA14_42970;PA14_42980;PA14_42990
PA14_4299 0	PA166 1	hsiH2	1,31	7,51E-04	PA14_42880;PA14_42890;PA14_42900;PA14_42910;PA14_42920;PA14_42940;PA14_42950;PA14_42960;PA14_42970;PA14_42980;PA14_42990
PA14_4300 0	PA166 0	hsiG2	1,37	1,83E-04	
PA14_4302 0	PA165 9		1,30	3,17E-03	PA14_43020;PA14_43030;PA14_43040;PA14_43050
PA14_4303 0	PA165 8	hsiC2	1,58	4,80E-06	PA14_43020;PA14_43030;PA14_43040;PA14_43050
PA14_4304 0	PA165 7	hsiB2	1,71	4,99E-07	PA14_43020;PA14_43030;PA14_43040;PA14_43050
PA14_4429 0	PA165 6	hsiA2	1,04	1,03E-02	
PA14_4434 0	PA155 7	ccoN2	1,16	2,39E-02	PA14_44340;PA14_44350
PA14_4435 0	PA155 6	ccoO2	1,80	2,31E-04	PA14_44340;PA14_44350
PA14_4436 0	PA155 5	ccoP2	1,89	1,25E-05	
PA14_4691 0	PA134 2	aatJ	1,17	5,01E-03	
PA14_4693 0	PA134 0	aatM	1,01	2,23E-02	PA14_46920;PA14_46930;PA14_46950
PA14_4697 0	PA133 7	ansB	1,88	1,45E-06	PA14_46970;PA14_46980;PA14_46990
PA14_4712 0	PA132 4		1,25	7,51E-04	PA14_47120;PA14_47130
PA14_4713 0	PA132 3		1,01	1,08E-02	PA14_47120;PA14_47130
PA14_4785 0	PA126 7		1,35	2,12E-02	PA14_47840;PA14_47850
PA14_4806 0	PA124 9	aprA	2,19	9,42E-11	
PA14_4809 0	PA124 8	aprF	1,32	2,35E-04	PA14_48090;PA14_48100;PA14_48115;PA14_48140
PA14_4810 0	PA124 7	aprE	1,12	1,06E-02	PA14_48090;PA14_48100;PA14_48115;PA14_48140
PA14_4811 5	PA124 6	aprD	1,18	4,07E-03	PA14_48090;PA14_48100;PA14_48115;PA14_48140
PA14_4876 0	PA120 2	ycaC	1,40	1,28E-03	

PA14_4921 0	PA117 7	napE	1,45	9,96E-03	PA14_49210;PA14_49220;PA14_49230;PA14_49250;PA14_49260;PA14_49270
PA14_4922 0	PA117 6	napF	1,60	1,91E-04	PA14_49210;PA14_49220;PA14_49230;PA14_49250;PA14_49260;PA14_49270
PA14_4923 0	PA117 5	napD	1,35	2,84E-02	PA14_49210;PA14_49220;PA14_49230;PA14_49250;PA14_49260;PA14_49270
PA14_4925 0	PA117 4	napA	1,17	3,08E-03	PA14_49210;PA14_49220;PA14_49230;PA14_49250;PA14_49260;PA14_49270
PA14_4985 0	PA117 3		2,13	7,12E-10	
PA14_4986 0	PA117 2		1,53	6,29E-04	
PA14_5088 0	PA104 1		1,50	2,04E-04	
PA14_5304 0	PA086 7	mliC	1,12	1,87E-03	
PA14_5374 0	PA081 4		1,18	3,60E-02	PA14_53740;PA14_53750
PA14_5454 0	PA075 4		1,16	1,06E-02	PA14_54520; PA14_54540 ;PA14_54550;PA14_54570;PA14_54580
PA14_5463 0	PA074 6		1,57	2,90E-04	PA14_54620; PA14_54630
PA14_5464 0	PA074 5		1,89	6,75E-08	PA14_54640 ;PA14_54660
PA14_5466 0	PA074 4		1,96	9,19E-09	
PA14_5467 0	PA074 3		1,67	4,28E-06	
PA14_5511 0	PA071 3		2,40	1,13E-05	
PA14_5579 0	PA429 4		1,44	3,11E-02	PA14_55780; PA14_55790
PA14_5655 0	PA434 9		1,08	4,80E-03	PA14_56510;PA14_56520;PA14_56530;PA14_56540; PA14_56550
PA14_5656 0	PA435 0	olsB	1,12	2,05E-02	PA14_56560 ;PA14_56570
PA14_5835 0	PA449 6	dppA1	1,20	2,11E-03	PA14_58350 ;PA14_58360
PA14_5977 0	-	rdsB	1,01	1,51E-02	PA14_59770 ;PA14_59780;PA14_59790;PA14_59800
PA14_6057 0	PA457 8		1,02	9,17E-03	PA14_60570 ;PA14_60580

PA14_6070 0	PA458 7	ccpR	2,71	1,29E-11	
PA14_6075 0	PA459 0	pra	1,08	5,66E-03	
PA14_6096 0	PA460 7		1,70	2,02E-06	
PA14_6268 0	PA473 8	yjbJ	1,23	1,43E-02	PA14_62680;PA14_62690
PA14_6269 0	PA473 9		1,13	1,80E-02	
PA14_6436 0	PA486 6		1,23	2,85E-02	PA14_64310;PA14_64320;PA14_64335;PA14_64350; PA14_64360 ;PA14_64370;PA14_64390
PA14_6826 0	PA516 7	dctP	1,24	1,06E-02	PA14_68260;PA14_68280;PA14_68290
PA14_6828 0	PA516 8	dctQ	1,21	4,60E-02	
PA14_6833 0	PA517 1	arcA	1,20	2,44E-02	PA14_68300; PA14_68330;PA14_68340;PA14_68350
PA14_6834 0	PA517 2	arcB	2,12	5,14E-09	PA14_68300; PA14_68330;PA14_68340;PA14_68350
PA14_6835 0	PA517 3	arcC	2,44	1,02E-12	PA14_68300; PA14_68330;PA14_68340;PA14_68350
PA14_6894 0	PA522 0		1,38	1,41E-04	PA14_68930; PA14_68940
PA14_7067 0	PA535 3	glcF	2,19	1,50E-05	PA14_70650; PA14_70670;PA14_70680;PA14_70690
PA14_7068 0	PA535 4	glcE	2,52	1,70E-06	PA14_70650; PA14_70670;PA14_70680;PA14_70690
PA14_7069 0	PA535 5	glcD	2,27	5,66E-07	PA14_70650; PA14_70670;PA14_70680;PA14_70690
PA14_7252 0	PA549 6	nrdJb	1,27	7,22E-03	PA14_72520;PA14_72540

Tabela Anexo III. Genes regulados negativamente em PA14/pAtvR x PA14/pJN105

PA14 locus	PAO1 locus	gene	logFC	FDR	Operon
PA14_02130	PA0170		-1,04	2,39E-02	PA14_02130;PA14_02140;PA14_02150
PA14_02140	PA0171		-1,19	7,56E-03	PA14_02130;PA14_02140;PA14_02150
PA14_02150	PA0172		-1,04	1,29E-02	PA14_02130;PA14_02140;PA14_02150
PA14_03770	PA0288	speB1	-1,08	2,97E-02	PA14_03760; PA14_03770 ;PA14_03780
PA14_04050	PA0310		-1,07	1,38E-02	
PA14_04060	PA0311		-1,32	8,83E-03	
PA14_06170	PA0471	fiuR	-1,49	4,35E-04	PA14_06170 ;PA14_06180
PA14_06870	PA0527	dnr	-1,07	9,80E-03	PA14_06860; PA14_06870
PA14_07290	PA0560	ygiP	-1,09	8,81E-03	PA14_07290 ;PA14_07300
PA14_07550	PA0578		-1,13	9,17E-03	PA14_07550 ;PA14_07560
PA14_08390	PA0654	speD	-1,10	4,21E-02	
PA14_12180	PA3990		-1,11	2,44E-02	PA14_12180 ;PA14_12200;PA14_12210
PA14_12550	PA3967		-1,49	7,87E-04	
PA14_16350	PA3714		-1,09	2,05E-02	
PA14_17000	PA3661		-1,44	4,60E-02	
PA14_17610	PA3610	potD	-1,78	1,70E-06	PA14_17610 ;PA14_17620; PA14_17630 ;PA14_17640
PA14_17630	PA3608	potB	-1,47	2,12E-03	PA14_17610 ;PA14_17620; PA14_17630 ;PA14_17640
PA14_19470	PA3452	mqaA	-1,52	6,62E-04	
PA14_19720	PA3428		-2,03	4,03E-02	

PA14_20070	PA3403		-1,31	7,56E-03	
PA14_26400	PA2912		-1,18	8,00E-03	PA14_26360;PA14_26390; PA14_26400 ;PA14_26420
PA14_31160	PA4076		-2,35	3,70E-06	PA14_31160;PA14_31170
PA14_31170	PA4077		-2,93	8,55E-08	PA14_31160;PA14_31170
PA14_33520	PA2411		-1,81	1,61E-03	PA14_33500;PA14_33510; PA14_33520
PA14_33530	PA2410		-2,91	1,26E-17	PA14_33530;PA14_33540;PA14_33550;PA14_33560
PA14_33540	PA2409		-3,17	1,84E-17	PA14_33530;PA14_33540;PA14_33550;PA14_33560
PA14_33550	PA2408		-3,15	2,28E-14	PA14_33530;PA14_33540;PA14_33550;PA14_33560
PA14_33560	PA2407		-3,26	8,93E-16	PA14_33530;PA14_33540;PA14_33550;PA14_33560
PA14_33570	PA2406		-2,70	1,80E-12	PA14_33570;PA14_33580;PA14_33590;PA14_33600
PA14_33580	PA2405		-2,61	2,11E-09	PA14_33570;PA14_33580;PA14_33590;PA14_33600
PA14_33590	PA2404		-3,17	4,57E-11	PA14_33570;PA14_33580;PA14_33590;PA14_33600
PA14_33600	PA2403		-1,97	3,91E-08	PA14_33570;PA14_33580;PA14_33590;PA14_33600
PA14_33680	PA2398	fpvA	-2,95	1,67E-12	
PA14_33770	PA2389	pvdR	-1,19	8,54E-03	
PA14_33810	PA2386	pvdA	-1,49	2,46E-04	
PA14_33830	PA2384		-2,87	9,19E-09	PA14_33830;PA14_33840
PA14_34170	PA2358		-1,28	1,17E-02	
PA14_35440	PA2253	ansA	-1,23	3,74E-03	
PA14_35460	PA2252		-2,95	1,12E-11	
PA14_38320	PA2026		-1,28	9,62E-04	

PA14_42640	PA1691	pscT	-1,09	9,96E-03	PA14_42570;PA14_42580;PA14_42600;PA14_42610;PA14_42620;PA14_42630; PA14_42640 ;PA14_42660
PA14_43380	PA1634	kdpB	-1,25	1,51E-02	PA14_43370; PA14_43380 ; PA14_43400 ;PA14_43405
PA14_43400	PA1633	kdpA	-1,37	3,17E-03	PA14_43370; PA14_43380 ; PA14_43400 ;PA14_43405
PA14_47150	PA1321	cyoE	-1,65	3,17E-03	PA14_47150 ;PA14_47160; PA14_47180 ;PA14_47190;PA14_47210
PA14_47180	PA1319	cyoC	-1,44	3,34E-04	PA14_47150 ;PA14_47160; PA14_47180 ;PA14_47190;PA14_47210
PA14_48400	PA1228		-1,29	3,77E-03	
PA14_48410	PA1227		-1,08	6,51E-03	
PA14_48830	PA1196		-1,75	7,26E-05	PA14_48810; PA14_48830
PA14_51680	PA0975		-1,06	6,71E-03	PA14_51670; PA14_51680
PA14_54850	-		-1,06	1,14E-02	
PA14_56840	PA4371		-1,13	1,74E-02	PA14_56840 ;PA14_56850;PA14_56870
PA14_61850	PA4675	chtA	-1,04	1,91E-02	
PA14_62880	PA4753	yhbY	-1,09	3,72E-03	
PA14_63080	PA4770	lldP	-2,61	1,52E-07	
PA14_63090	PA4771	lldD	-2,63	4,05E-09	PA14_63090 ;PA14_63100
PA14_63100	PA4772		-2,76	3,63E-10	PA14_63090 ;PA14_63100
PA14_64610	PA4888		-1,27	5,53E-03	PA14_64610 ;PA14_64620
PA14_64620	PA4889		-1,65	8,00E-04	PA14_64610 ;PA14_64620
PA14_69250	PA5244	yohD	-1,21	2,67E-03	
PA14_71330	PA5403		-1,11	1,17E-02	PA14_71320; PA14_71330 ;PA14_71340; PA14_71350 ;PA14_71360;PA14_71370
PA14_71350	PA5405		-1,05	2,71E-02	PA14_71320; PA14_71330 ;PA14_71340; PA14_71350 ;PA14_71360;PA14_71370

PA14_71750	PA5437		-1,01	1,55E-02	
PA14_72350	PA5480		-1,11	1,52E-02	

Anexo IV RNA-Seq

Para obter uma boa qualidade no sequenciamento assim como padronizar um fluxo desde o preparo das amostras até a análise de genes diferencialmente expressos, foi estabelecido o fluxo de trabalho. O fluxo de trabalho final para análise pode ser visualizado na **Figura 19**.

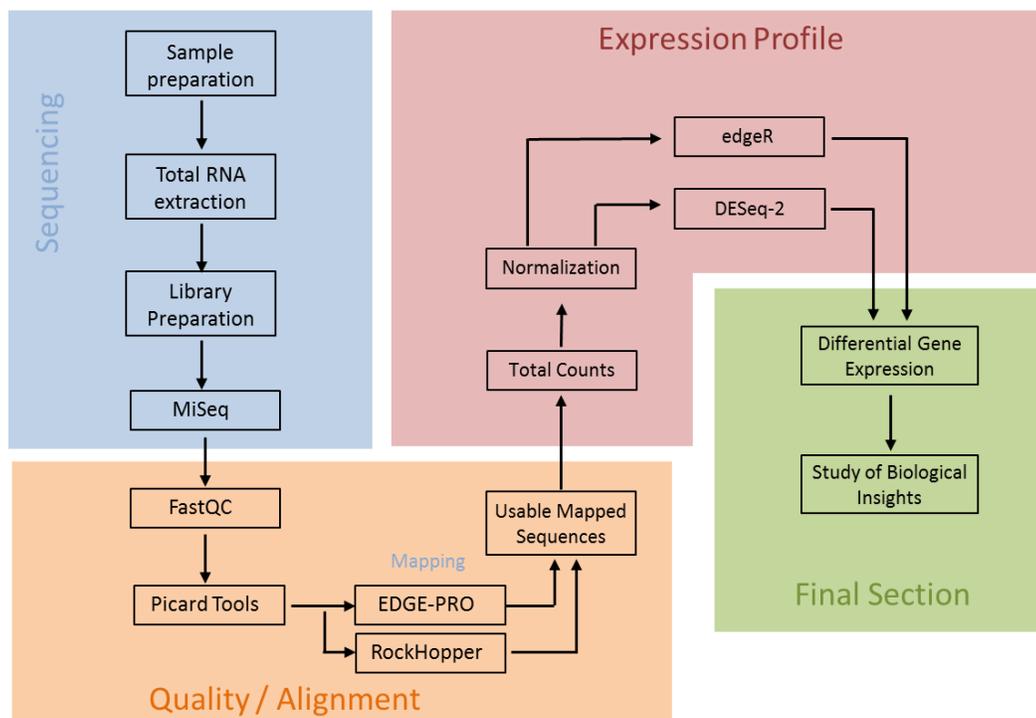


Figura 19. Fluxo de trabalho utilizado para a análise dos dados obtidos pelo RNA-seq. Inicialmente, as culturas foram analisadas em condições de superexpressão, o seu RNA total extraído, e em seguida a biblioteca de cDNA de cada amostra foi preparada. As bibliotecas foram agrupadas e sequenciadas no MiSeq (quadro em azul). Após a obtenção das sequências de cada biblioteca (fastq), a qualidade foi verificada utilizando-se o FastQC e o Picard Tools. O mapeamento foi realizado utilizando-se o EDGE-PRO e/ou o RockHopper (quadro em laranja). Em seguida, a contagem bruta de cada gene de cada biblioteca foi utilizada para a análise utilizando-se os pacotes de R Edge-R e DESeq-2 (quadro rosa). Os genes diferencialmente expressos foram então obtidos utilizando-se um FDR < 0,05 e os genes com interesse biológico serão validados por ensaios biológicos específicos (quadro verde).

As culturas bacterianas utilizadas neste trabalho foram cultivadas até a densidade óptica desejada (neste trabalho $DO_{600nm} = 1$). Após esse período, foi adicionado um igual volume de RNA protect a cultura bacteriana e o RNA total foi extraído utilizando-se o kit RNeasy de acordo com as recomendações do fabricante.

A qualidade do RNA foi acessada utilizando-se o chip RNA 6000 pico, em que as amostras demonstraram uma alta qualidade, com valores acima de 9,5 de RIN (do inglês, *RNA integrity number*) (**Figura 20A**).

Para depletar a amostra do RNA ribossomal (rRNA), foi utilizado inicialmente o kit MICROBExpress Bacterial mRNA Enrichment (Life Technologies). Relatos na literatura já descreviam o seu uso para a depleção de rRNA em *P. aeruginosa* (Dötsch *et al.*, 2012; Blanka *et al.*, 2014; Schulz *et al.*, 2015). Porém, este kit não foi capaz de depletar completamente o rRNA, evidenciado após análise utilizando-se o chip RNA 6000 Pico, em que é possível observar as duas bandas correspondentes ao rRNA (**Figura 20B**). Posteriormente, no artigo que refere esse kit para depleção do rRNA, foi feita uma reanálise dos dados disponíveis no banco de dados do NCBI (número SRR: SRR988256, SRR988257, SRR988258, SRR988259, SRR988260, SRR988261 e SRR988262) (Blanka *et al.*, 2014). Os dados foram reanalisados como descrito abaixo e confirmaram que as amostras sequenciadas, após depleção do rRNA com o MICROBExpress, apresentavam uma alta porcentagem de rRNA de 7,57 – 83,99%. Para conseguir dados de alta qualidade, foi decidido não utilizar o MICROBExpress para a depleção dos rRNAs, uma vez que a taxa de cobertura por gene é menor quando há baixa depleção dos rRNAs na amostra, necessitando um maior número de reads para obter a mesma taxa de cobertura em uma amostra com o rRNA depletados eficientemente. Interessantemente, há relatos na literatura que é necessário apenas de 2-3 milhões de reads por amostra, em uma amostra com uma alta taxa de depleção de rRNA, para obter uma alta significância estatística (Haas *et al.*, 2012). Nas amostras analisadas por Blanka *et al.*, referente ao transcriptoma do fator sigma ECF SigX, as amostras apresentaram uma baixa depleção de rRNAs e apenas 0,47 – 1,29 M de reads por amostra, que alinharam

a ORFs diferentes de rRNA (Blanka *et al.*, 2014), indicando um viés estatístico durante a análise desses transcriptomas.

Há relatos na literatura que o MICROBExpress é incapaz de depletar o rRNA de amostras com porcentagem de GC variável (baixo, médio e alto GC), em que bactérias que apresentam um alto conteúdo GC no genoma apresentaram a pior depleção de rRNA nas amostras (Giannoukos *et al.*, 2012). Nesse mesmo trabalho foi observado que o kit Ribo-Zero é capaz de depletar quase que completamente o rRNA, mesmo em bactérias com alto conteúdo GC, como é o caso de *P. aeruginosa*, além de oferecer uma alta reprodutibilidade entre as amostras (Giannoukos *et al.*, 2012). Por este motivo foi decidido utilizar o kit Ribo-Zero rRNA Removal kit (gram-negative bacteria), utilizando-se as recomendações do fabricante.

Utilizando-se essa estratégia, foi possível uma alta depleção dos rRNAs, em que os picos referente ao rRNA não foram mais observados na análise com o chip RNA 6000 Pico (**Figura 20C**).

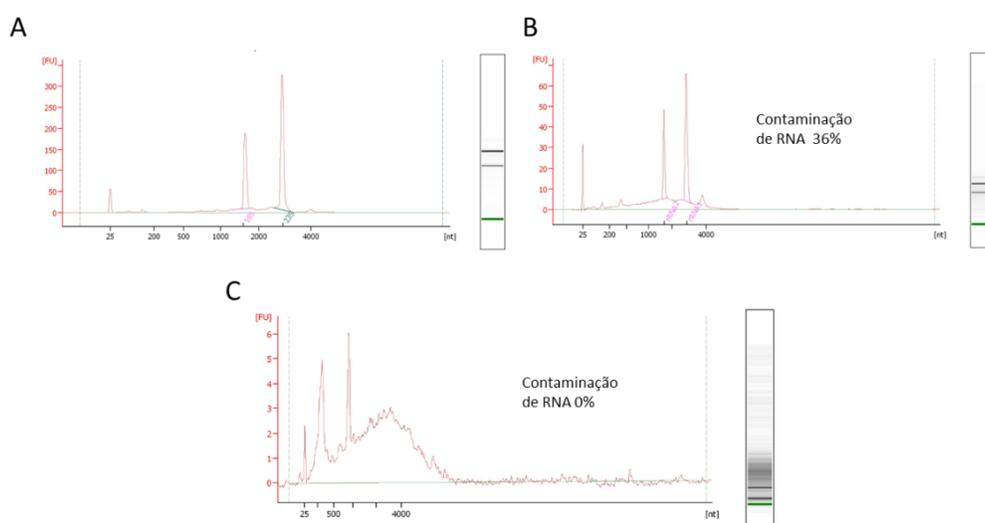


Figura 20. Obtenção do RNA total das amostras e a depleção utilizando-se os kits MICROBExpress ou Ribo-Zero. (A) Após a obtenção do RNA total com o kit RNeasy, a amostra foi analisada para verificar a integridade do RNA (RIN). **(B)** Após o primeiro passo de purificação, o mRNA foi enriquecido utilizando-se o kit MICROBExpress ou **(C)** Ribo-Zero. Notar que apenas o Ribo-Zero foi capaz de depletar

eficientemente o rRNA, como pode ser observado com a ausência dos picos referentes ao rRNA. FU, unidades de fluorescência.

Após a depleção dos rRNAs, as amostras foram utilizadas como molde para a construção das bibliotecas de cDNA para posterior corrida no MiSeq. Nessa etapa foi utilizado o kit TruSeq RNA Library Prep Kit v2 para a construção de uma biblioteca *paired-end*, de acordo com as recomendações do fabricante (Illumina). Após a última etapa de amplificação da biblioteca, uma alíquota foi utilizada para verificar o tamanho médio da biblioteca de cDNA, em que o tamanho médio dos fragmentos ficou em torno de 400-500 pb (**Figura 21**). O tamanho médio da biblioteca é importante para a normalização da sua concentração. As amostras foram quantificadas utilizando-se o kit KAPA Library Quantification, de acordo com as recomendações do fabricante (KapaBiosystems). Após a normalização de cada biblioteca, elas foram agrupadas, diluídas e desnaturadas. Para a corrida no MiSeq, foram injetados na flow-cell entre 8-10pm do pool de amostra. Utilizando-se esses parâmetros, foram obtidos cerca de 16-20 milhões de reads por corrida. Cada corrida constituiu de quatro amostras independentes, marcadas com índices diferentes.

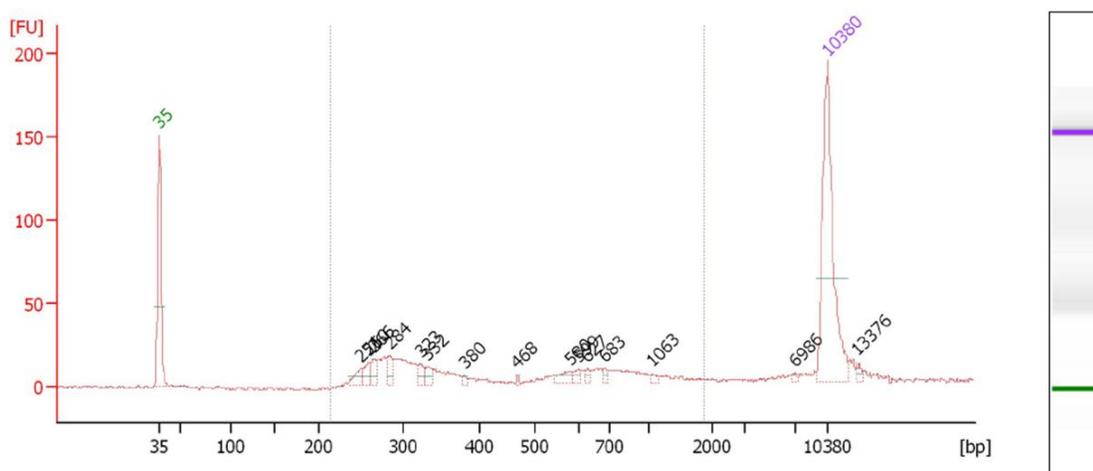


Figura 21. Perfil da biblioteca PA14/pJN105-1 de cDNA *paired-end* utilizada no RNA-seq. Após a amplificação da biblioteca de cDNAs obtido pelo TruSeq, uma alíquota foi utilizada para verificar o tamanho médio dos fragmentos obtidos usando o BioAnalyzer com um DNA chip. O Perfil mostrado é representativo de todas as bibliotecas utilizadas. FU, unidades de fluorescência.

Após a corrida foi feita o “demultiplexing”, utilizando-se os índices das amostras inseridas durante a construção da biblioteca. Em seguida, a qualidade dos reads foi determinada com o programa FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). O sequenciamento na plataforma Illumina ocasiona um erro não randômico ao longo da extensão do read, com aumento do erro de 5’ para 3’ (Liu *et al.*, 2012), sendo que a remoção das bases de baixa qualidade (*trimming*) pode aumentar a porcentagem de reads pareados corretamente no genoma, além de diminuir consideravelmente o tempo computacional (Del Fabbro *et al.*, 2013). É possível observar uma menor qualidade das bases conforme a extensão do read de 5’ para 3’, sendo que na segunda extremidade sequenciada (read 2) a sua qualidade é mais comprometida. Para diminuir o tempo computacional e melhorar a porcentagem de reads corretamente alinhados ao genoma, foi decidido aparar os reads até 100 bases (base de 1-100), excluindo-se as bases de 101-250, tanto no read 1 como no read 2. Essa decisão foi tomada após a análise da qualidade de base (Phred score) de todas as amostras até então sequenciadas em nosso laboratório, em que a qualidade cai após a base 100 do sequenciamento do read 2. As amostras foram aparadas (*trimmed*) nas suas extremidades 3’ com o programa FASTX-Toolkit (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/).

O programa EDGE-PRO (Estimated Degree of Gene Expression in PROkaryotes) foi escolhido, pois os programas normalmente utilizados para eucariotos, por exemplo o TopHat, contêm algoritmos específicos para a detecção de padrões de splicing, portanto são incapazes de alinhar corretamente e separar genes com sobreposição, comum em procariotos. Outro ponto é a capacidade do EDGE-PRO em separar a expressão de

genes duplicados ou com sobreposição oferecendo uma ferramenta um pouco mais acurada no estudo da expressão gênica em procariotos (Magoc *et al.*, 2013).

Os arquivos fastq gerados no sequenciamento foram alinhados no programa EDGE-PRO. Esse programa gera como arquivos de saída a contagem bruta de cada gene (*raw count*), além do RPKM (*reads per kilobase per million mapped reads*), uma tentativa de normalização da expressão gênica de acordo com o tamanho do gene e a quantidade de reads mapeados por gene. Após o alinhamento, foi confirmada a depleção significativa dos rRNAs, com uma contaminação de 0,0008-0,01%, indicando e confirmando a eficiência do RiboZero na depleção de rRNAs.

Os dados de alinhamento (arquivo sam) foram utilizados para verificar a saturação do sequenciamento. Não há programas específicos para bactérias, e os programas disponíveis apresentam um alto tempo de computação. Portanto foi gerado um script em Python para descobrir a taxa de saturação do sequenciamento. Resumidamente, o arquivo gff de *P. aeruginosa* PA14 foi particionado em sete listas menores, permitindo uma busca mais rápida a partir de um index. O arquivo sam do alinhamento gerado pelo EDGE-PRO foi utilizado como entrada. Nesse script, é utilizada a mesma lógica para a geração dos arquivos de contagem bruta de reads por gene, porém a cada read do arquivo sam ele verifica se esse read alinha a algum gene. Se for um alinhamento a um novo gene, ele contará como +1, caso o gene já tenha sido alinhado anteriormente a algum gene ele contará +0. Com esse script é possível obter um gráfico de saturação em que foi possível observar uma saturação a partir de dois milhões de reads em amostras com uma boa depleção dos rRNAs (**Figura 22**). Utilizando-se esse script, uma análise de uma amostra que apresentou uma baixa depleção dos rRNAs, em que é possível observar uma taxa de saturação mais lenta com o tamanho da biblioteca condizente com

dados anteriores (**Figura 22**, linha rosa) (Haas *et al.*, 2012). É importante notar que esse script determina pelo menos um read por gene, sendo que ele pode ser facilmente modificado para determinar a saturação com diferentes limiares de reads por gene.

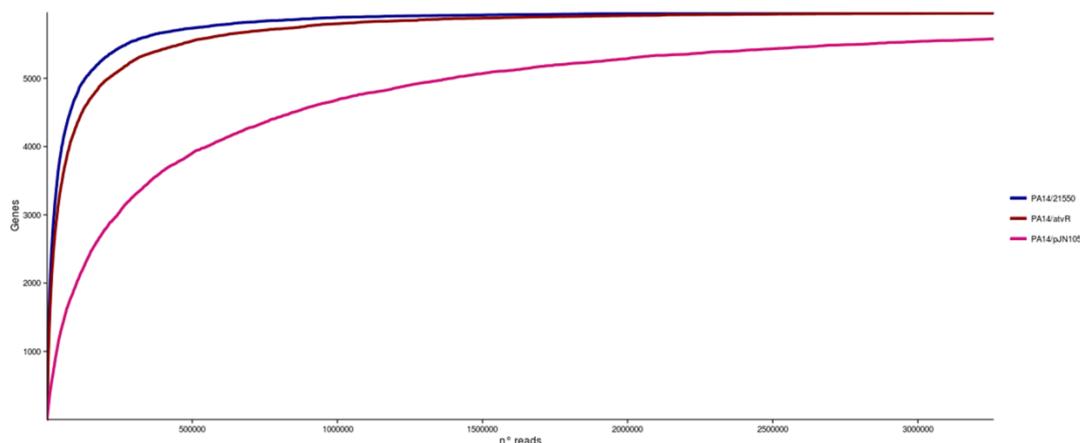


Figura 22. Exemplo de análise do grau de saturação dos transcriptomas. Nas duas amostras que apresentaram uma alta depleção de rRNA, é possível observar uma saturação de (pelo menos 1 read/gene) a partir de dois milhões de reads por amostra (linha azul, PA14/21500 e linha vermelha, PA14/patvR). Quando uma amostra teve baixa depleção dos rRNAs, a saturação não foi atingida (linha rosa, PA14/pJN105).

Os dados de contagem bruta de cada amostra (raw count) são facilmente extraídos do arquivo de saída do EDGE-PRO utilizando-se o script `edgeToDeseq.perl`. Esse script permite juntar os dados de contagem bruta das amostras de interesse de forma organizada, facilitando o uso da tabela gerada para a posterior análise de genes diferencialmente expressos.

Os dados de contagem bruta das amostras, neste trabalho, PA14/pJN105 e PA14/pAtvR, foram analisados utilizando-se o pacote de R EdgeR. O EdgeR utiliza um modelo de distribuição binomial negativa (também conhecido como distribuição gama-Poisson). Este pacote foi desenvolvido para permitir a análise de experimentos com um baixo número de réplicas. Ele utiliza um procedimento empírico de Bayes para moderar o grau de superdispersão (*overdispersion*) entre genes extraído a informação entre

genes. Um teste estatístico exato análogo ao teste exato de Fischer é utilizado, porém adaptado para amostras com superdispersão, para identificar a diferença de expressão para cada gene. Os valores de p foram posteriormente ajustados utilizando-se o procedimento de Benjamini-Hochberg para controlar o erro do tipo I (falso positivo) (Seyednasrollah *et al.*, 2015).

8. SÚMULA CURRICULAR

1. Dados Pessoais

Nome: Gilberto Hideo Kaihami

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: São Paulo, SP.

Data de nascimento: 23/08/1986

2. Formação

2.1 Pós-graduação

2010-2012 Mestrado em Bioquímica

Universidade de São Paulo

Instituto de Química – Departamento de Bioquímica

São Paulo, SP

Título: Envolvimento da peroxirredoxina LsfA na virulência de *Pseudomonas aeruginosa*.

Orientadora: Regina Lúcia Baldini

Bolsista do CNPq

2.2 Ensino Superior

2005 – 2010 Graduação em Farmácia-Bioquímica.

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

3. Ocupação

Bolsista Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE), CAPES, 2017

Bolsista de Doutorado, FAPESP, 2014-2017

Bolsista de Doutorado, CNPq, 2013-2014

Bolsista de Mestrado, CNPq, 2010-2012

4. Artigos publicados

Kaihami, GH; Breda, LCD; Almeida, JRF; Oliveira Pereira, T; Nicastro, GG; Boechat, AL; Almeida, SR; Baldini, RL. The atypical response regulator AtvR is a new player in *Pseudomonas aeruginosa* response to hypoxia and virulence. *Infection and Immunity*, p. IAI. 00207-17, 2017.

Jannuzzi, GP; Souza, NA; Françoso, KS; Pereira, RH; Santos, RP; **Kaihami, GH**; Almeida, JRF; Batista, WL; Amaral, AC; Maranhão, AQ; Almeida, SR; Ferreira, KS. Therapeutic treatment with scFv–PLGA nanoparticles decreases pulmonary fungal load in a murine model of paracoccidioidomycosis. *Microbes and Infection*, 2017.

Romera, LMD; **Kaihami, GH**; Jannuzzi, GP; Almeida, JRF; Almeida, SR. The Critical Role of Notch1–TLR 4 Signaling in the inflammatory and fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* strain Pb18. *Mycophatologia*, p 1-11, 2017.

Nicastro, GG; **Kaihami, GH**; Pulschen, AA; Hernandez-Montelongo, J; Boechat, AL; Pereira, TO; Stefanello, E; Colepicolo, P; Bordi, C; Baldini, RL. c-di-GMP-linked phenotypes are modulated by the interaction between a diguanylate cyclase and a polar hub protein. *BioRxiv*. 2017.

Almeida, JRF; Santiago, KL; **Kaihami, GH**; Maranhão, AQ; Brigido, MM; Almeida, SR. The efficacy of humanized antibody against the *Sporothrix* antigen, gp70, in promoting phagocytosis and reducing disease burden. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p. 345, 2017.

Jannuzzi, GP; Tavares, AHFP; **Kaihami, GH**; Almeida, JRF; Almeida, SR; Ferreira, KS. scFv from antibody that mimics gp43 modulates the cellular and humoral immune responses during experimental paracoccidioidomycosis. *PLoS ONE*, v. 10, p. e0129401, 2015.

Almeida, JRF; **Kaihami, GH**; Jannuzzi, GP; Almeida, SR. Therapeutic vaccine using a monoclonal antibody against a 70-kDa glycoprotein in mice infected with highly virulent *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. *Medical Mycology*, v. 53, p. 42–50, 2014.

Kaihami, GH; Almeida, JRF; Santos, SS; Netto, LES; Almeida, SR; Baldini, RL. Involvement of a 1-Cys peroxiredoxin in bacterial virulence. *PLoS Pathogens*, v. 10, p. e1004442, 2014.

Nicastro, GG; **Kaihami, GH**; Pereira, TO; Meireles, DA; Groleau, M; Déziel, E; Baldini, RL. Cyclic-di-GMP levels affect *Pseudomonas aeruginosa* fitness in the presence of imipenem. *Environmental Microbiology*, v. 16 p. 1321-1333, 2014.

Boechat, AL; **Kaihami, GH**; Politi, MJ; Lépine, F; Baldini, RL. A novel role for an ECF sigma factor in fatty acid biosynthesis and membrane fluidity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Plos One*, v.8 p. e84775, 2013.

Nicastro, GG; Boechat, AL; Abe, CM; **Kaihami, GH**; Baldini, RL. *Pseudomonas aeruginosa* PA14 cupD transcription is activated by the RcsB response regulator, but repressed by its putative cognate sensor RcsC. *FEMS Microbiology Letters*, v. 301, p. 115-123, 2009.