

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

RONALDO BERTOLUCCI JUNIOR

Expressão e localização celular da diguanilato ciclase DgcP em

*Pseudomonas aeruginosa*

Versão original da Dissertação

São Paulo

Data de depósito na SPG:

08/09/2021

RONALDO BERTOLUCCI JUNIOR

Expressão e localização celular da diguanilato ciclase DgcP em  
*Pseudomonas aeruginosa*

*Dissertação apresentada ao Instituto de  
Química da Universidade de São Paulo para  
a obtenção do Título de Mestre em Ciências  
Biológicas (Bioquímica)*

*Orientadora: Profa. Dra. Regina Lúcia Baldini*

São Paulo

2021

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

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

B482e	Bertolucci Junior, Ronaldo Expressão e localização celular da diguanilato ciclase DgcP em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> / Ronaldo Bertolucci Junior. - São Paulo, 2021. 76 p.
	Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica. Orientador: Baldini, Regina Lúcia
	1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . 2. c-di-GMP. 3. pilus tipo IV. 4. fatores de virulência. I. T. II. Baldini, Regina Lúcia, orientador.



*À minha mãe, com muito amor, por toda educação, carinho e apoio em todos esses anos. Você não me ensinou tudo, porém, me ensinou o principal.*

## Agradecimentos

À minha mãe, por me educar, me amar e me apoiar nesta jornada. Seu exemplo de vida me mostrou que eu teria forças para conquistar tudo o que eu desejasse. Muito obrigado por tudo.

Aos meus familiares: minha irmã, meu pai, meus avós maternos, meus tios e primos, pelo carinho e apoio, pelo interesse em meu trabalho, pelas risadas e pelas ótimas conversas. Amo vocês.

À minha Kell, minha vida, que me encheu de amor e me mostrou que eu seria capaz de continuar, até nos momentos mais difíceis. Obrigado por acreditar em mim e me incentivar.

À Professora Dra. Regina Baldini pela paciência, atenção e apoio ao longo destes dois anos. O interesse despertado em mim pelas discussões científicas que tivemos é devido ao seu ótimo trabalho como orientadora. Muito obrigado por ter me guiado até aqui.

Aos meus colegas de laboratório: Ana Laura, Gianluca, Caio, Mariana, Sandra, Alzira e Henrique, pelas ótimas conversas, científicas ou não, pelas risadas, companhia e ajuda na resolução de problemas experimentais. Vocês são incríveis. Um agradecimento especial para Sandra, pela alegria de sempre e pelos seus ótimos conselhos.

Aos amigos que fiz no Instituto de Química: Cafofo, Caio Klocke, Daniel Palma, Heitor Morgado, João Mattioni, Juliana Omiya, Leonardo Hasimoto, Luca Sihn, Lucas Correia, Megumi Ishibaru, Natasha Dietrich, Marcos Colombo e Rafael, pelas risadas, ótimas conversas, pelos *rolês*, pela amizade sincera.

À Professora Dra. Suely Lopes por dividir e disponibilizar o espaço em que trabalhei durante o mestrado.

Aos professores da minha banca de qualificação: Dr. Frederico Gueiros Filho, Dr. Sandro Roberto Marana e Dr. Alexander Henning Ulrich, pelas dicas e sugestões apresentadas. Em especial, agradeço ao Professor Frederico e seu aluno João pela ajuda com os ensaios de microscopia de fluorescência e por disponibilizar o microscópio que utilizei no trabalho.

Por fim, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo FAPESP nº 2019/18829-8, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento deste projeto.

## Resumo

Bertolucci Junior, R. **Expressão e localização celular da diguanilato ciclase DgcP em *Pseudomonas aeruginosa***, 2021. 76 p. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno oportunista frequentemente associado a vítimas de queimaduras graves ou indivíduos com fibrose cística, sendo os isolados resistentes a carbapenêmicos dessa espécie considerados pela OMS como uma das maiores ameaças ao controle de infecções. O estabelecimento da infecção por esse patógeno é dependente de uma série de fatores de virulência, entre eles o pilus tipo IV (T4P), que possui papel importante na adesão a superfícies e motilidade do tipo *twitching*, essenciais para a colonização do hospedeiro. Uma das moléculas importantes na diferenciação entre as formas sésil e planctônica de *P. aeruginosa* é o segundo mensageiro bis-(3',5')-di-guanosina monofosfato cíclico (c-di-GMP), cuja síntese é feita enzimaticamente por diguanilato ciclases (DGCs). DgcP é uma DGC localizada nos polos da célula, que tem sua atividade de síntese de c-di-GMP aumentada na presença da proteína FimV, essencial para a montagem do T4P em *P. aeruginosa*. Neste trabalho, ensaios de microscopia de fluorescência, organização e expressão gênica foram realizados com o objetivo de aumentar a compreensão sobre o papel de DgcP em relação a sua expressão e aos fatores que regulam o T4P de *P. aeruginosa*. A proteína DgcP em fusão com mNeonGreen no C-terminal, expressa a partir do locus cromossômico, se localiza de maneira predominantemente bipolar tanto na linhagem selvagem quanto nos mutantes  $\Delta pilA$ ,  $\Delta pilR$  e  $\Delta chpA$ , evidenciando que seu padrão de localização não depende dos sistemas de regulação Pil-Chp e PilS-PilR. Ensaios de RT-PCR

mostraram que *dgcP* se encontra em operon com PA14\_72430 e *dsbA1*, indicando um papel celular conjunto entre esses genes, até o momento, desconhecido. Por fim, ensaios de qRT-PCR revelaram que os níveis de mRNA de *dgcP* são invariáveis nas linhagens WT,  $\Delta pilA$ ,  $\Delta pilR$ ,  $\Delta chpA$  e  $\Delta fimV$ , cultivadas em meio líquido ou meio sólido. Os resultados aqui mostrados, combinados com trabalhos prévios do nosso e de outros grupos, sugerem que DgcP é uma diguanilato ciclase responsável por geração constante de c-di-GMP nos polos da célula, possivelmente, atuando na sinalização local dependente do dinucleotídeo cíclico, cuja localização e atividade não são dependentes dos sistemas de regulação que atuam sobre o T4P.

**Palavras-chave:** *Pseudomonas aeruginosa*, c-di-GMP, pilus tipo IV, fatores de virulência.

## Abstract

Bertolucci Junior, R. **Expression and cell localization of the diguanylate cyclase DgcP in *Pseudomonas aeruginosa***, 2021. 76 p. Masters Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The Gram-negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen often associated with severe burn victims or individuals with cystic fibrosis, which carbapenem-resistant isolates were classified by the World Health Organization as one of the greatest threats to infection control. The establishment of infection by this pathogen is dependent on a series of virulence factors, including the type IV pilus (T4P), which plays an important role in adhesion to surfaces and twitching motility, essential features for host colonization. Bis-(3',5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate (c-di-GMP) is a second messenger that is involved in processes of biofilm formation, motility, and virulence. The diguanylate cyclase DgcP synthesizes c-di-GMP and it is located at the cell poles, and its activity depends on the scaffold protein FimV, essential for T4P assembly in *P. aeruginosa*. By increasing c-di-GMP levels, DgcP decreases flagellum-dependent motility and increases biofilm formation. In this work, fluorescence microscopy, gene organization and expression assays were performed to understand whether DgcP localization and expression are under the control of T4P regulatory proteins. Fluorescence microscopy analysis showed that DgcP localizes predominantly at both cell poles in  $\Delta pilA$ ,  $\Delta pilR$ , and  $\Delta chpA$  mutants, showing that its localization pattern does not depend on the Pil-Chp and PilS-PilR systems. Furthermore, RT-PCR assays showed that *dgcP* is found in an operon with PA14\_72430 and *dsbA1*, indicating an unknown putative related cellular role for these genes. Finally, qRT-PCR assays indicated that DgcP expression is invariant in  $\Delta pilA$ ,  $\Delta pilR$ ,  $\Delta chpA$ , and  $\Delta fimV$  mutants, either in liquid or solid medium. The results shown

here, combined with previous work by ours and other groups, suggest that DgcP is a diguanylate cyclase responsible for constant generation of c-di-GMP at the cell poles, possibly acting in local signaling dependent on the cyclic dinucleotide, but that is not under the control of the known T4P regulatory systems.

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*, c-di-GMP, type IV pilus, virulence factors.

## Sumário

<b>1. Introdução</b> .....	12
1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	12
1.2. O segundo mensageiro c-di-GMP .....	13
1.3. O pilus tipo IV .....	17
1.4. Regulação da biossíntese do pilus tipo IV .....	20
1.5. O papel das DGCs nas alterações fenotípicas e a função de DgcP .....	23
<b>2. Objetivos</b> .....	28
<b>3. Material e Métodos</b> .....	29
3.1. Linhagens, plasmídeos e condições de cultivo .....	29
3.2. Técnicas básicas de Biologia Molecular .....	29
3.3. Construção das linhagens recombinantes de <i>P. aeruginosa</i> .....	32
3.3.1. Linhagens recombinantes contendo mNeonGreen .....	32
3.3.2. Linhagens repórteres <i>lacZ</i> .....	32
3.4. Curvas de crescimento .....	33
3.5. Ensaio de motilidade .....	33
3.5.1. <i>Swimming</i> .....	33
3.5.2. <i>Swarming</i> .....	33
3.5.3. <i>Twitching</i> .....	34
3.6. Ensaio de microscopia de luz e fluorescência .....	34
3.7. Ensaio de formação de biofilme .....	35
3.8. Reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR) e reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR) .....	36
3.9. Ensaio de $\beta$ -galactosidase .....	37
3.10. Análises estatísticas .....	37
<b>4. Resultados e Discussão</b> .....	39
4.1. Localização de DgcP é polar e depende da proteína FimV, entretanto, independe dos sistemas Pil-Chp e PilS-PilR .....	39
4.2. Estudo da organização gênica de DgcP .....	54
4.3. Estudo da expressão gênica de DgcP .....	57
4.4. Considerações finais .....	59
<b>5. Conclusões</b> .....	62
<b>6. Referências Bibliográficas</b> .....	63
<b>Apêndice – Localização de DgcP-mNGr</b> .....	72

## 1. Introdução

### 1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

A preocupação da comunidade científica acerca dos microrganismos multirresistentes cresce a cada dia. O número de infecções causadas por esses patógenos tem aumentado rapidamente e, devido ao tratamento sem sucesso de suas infecções, cerca de 700.000 mortes acontecem por ano ao redor do mundo (O'NEILL, 2016). Diante desse grande problema sanitário, a busca de novos métodos de tratamento contra tais organismos é essencial e, por essa razão, em 2018, a Organização Mundial da Saúde (OMS) definiu a lista de organismos multirresistentes prioritários para o desenvolvimento de novas drogas efetivas (TACCONELLI *et al.*, 2018). O trabalho determinou que as *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos são um dos principais alvos da lista.

*P. aeruginosa* não é um patógeno primário para humanos, mas age como patógeno oportunista em algumas situações. Ela infecta, principalmente, pacientes com queimaduras graves e pacientes com fibrose cística, doença que causa o acúmulo de muco nos pulmões (LYCZAK; CANNON; PIER, 2000; MUTLU; WUNDERINK, 2006). *P. aeruginosa* ainda é capaz de colonizar superfícies abióticas, como tubos de ventilação e catéteres, e é comumente encontrada em infecções hospitalares (HIDRON *et al.*, 2008; KOLLEF *et al.*, 2014). O que causa preocupação, sobretudo, é o fato de o tratamento de suas infecções ser dificultado pela resistência a diversos tipos de antibióticos (HORCAJADA *et al.*, 2019) e pela formação natural de biofilmes, que consistem em comunidades bacterianas envolvidas por exopolissacarídeos, proteínas e DNA, cuja resistência a antibióticos e detergentes é ainda maior do que a encontrada em células planctônicas (LEE; YOON, 2017). A

versatilidade metabólica de *P. aeruginosa* dificulta o tratamento das infecções e permite que a bactéria viva facilmente nos mais diversos ambientes.

A facilidade de colonizar diferentes locais e a natural resistência a antibióticos são decorrentes do amplo repertório genético de *P. aeruginosa* (STOVER *et al.*, 2000). Com grande quantidade de genes que codificam proteínas de transdução de sinal, a bactéria é capaz de responder rapidamente a diferentes estímulos e mudar assim seu estilo de vida. Não é surpreendente, portanto, que *P. aeruginosa* viva na água e no solo, em associação com plantas e animais (GREEN *et al.*, 1974).

A primeira linhagem de *P. aeruginosa* a ter seu genoma sequenciado foi a linhagem PA01 (STOVER *et al.*, 2000). Entretanto, entre os principais modelos de estudo de *P. aeruginosa*, a linhagem UCBPP-PA14 (ou PA14) merece destaque. Essa linhagem, isolada de queimadura humana, é patogênica em diferentes modelos, como camundongos e plantas (RAHME *et al.*, 1995) e, frequentemente, isolados de PA14 são encontrados em pacientes com fibrose cística (CRAMER *et al.*, 2011). Além disso, vale ressaltar que PA14 e PA01 possuem grande similaridade genômica, apesar de diferenças na virulência, sendo PA14 significativamente mais virulenta do que PA01 (LEE, D. G. *et al.*, 2006). Essas características fazem de PA14 um importante modelo de estudo da patogenicidade e virulência de *P. aeruginosa*.

## 1.2. O segundo mensageiro c-di-GMP

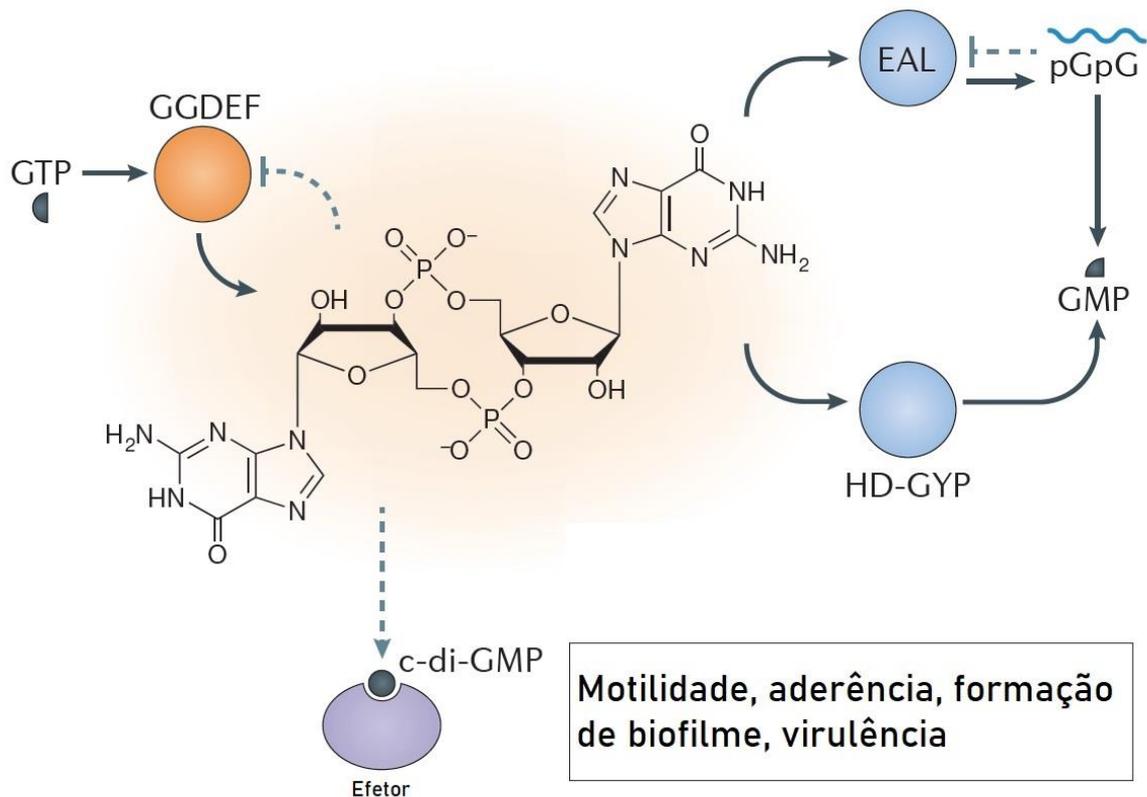
A alta adaptabilidade de *P. aeruginosa* demanda uma rápida capacidade de mudar seus estilos de vida nos mais diferentes ambientes. Sentir, reagir e se adaptar a mudanças ambientais e condições de estresse requer sensores moleculares e processos de transdução de sinal que resultam em mudanças metabólicas (HENGGE, 2021). Atualmente, sabe-se que tais variações metabólicas, rápidas e eficientes, ocorrem através de uma complexa rede de sinalização, e a concentração celular do

segundo mensageiro bis-(3',5')-di-guanosina monofosfato cíclico (c-di-GMP) tem papel chave nas mudanças de estilo de vida em *P. aeruginosa* e outras bactérias (JENAL; REINDERS; LORI, 2017).

O c-di-GMP (Figura 1) foi descoberto como um ativador alostérico da celulose sintase em *Gluconacetobacter xylinus* (ROSS *et al.*, 1987). Suas funções, porém, são muito mais abrangentes. A transição entre estilos de vida sésil e móvel em *P. aeruginosa*, por exemplo, está relacionada com os níveis intracelulares de c-di-GMP, sendo altos níveis associados à sessilidade e baixos níveis, à maior motilidade (FANG; GOMELSKY, 2010; SIMM *et al.*, 2004). O segundo mensageiro ainda está envolvido em processos de patogenicidade (ROMLING; GALPERIN; GOMELSKY, 2013), formação de biofilme (HA, D.-G.; O'TOOLE, 2015), regulação do pilus tipo IV (*type four pilus* - T4P, em inglês) e, conseqüentemente, motilidade *twitching*, tipo especial de motilidade que faz uso do T4P e não depende de flagelo (KAZMIERCZAK; LEBRON; MURRAY, 2006). Esses processos, assim como outros, dependem da concentração intracelular de c-di-GMP, cujo controle é feito enzimaticamente.

A síntese de c-di-GMP ocorre a partir de duas moléculas de GTP por ação de enzimas chamadas diguanilato ciclases (DGCs), que apresentam o domínio GGDEF. O nome do domínio é devido à presença dos aminoácidos Gly-Gly-(Asp ou Glu)-Glu-Phe no sítio ativo da enzima. As funções de cada resíduo do sítio ativo já foram elucidadas e sabe-se que as glicinas participam da ligação do GTP e o aspartato ou glutamato, no terceiro resíduo, são importantes para a catálise (CHAN *et al.*, 2004). A hidrólise de c-di-GMP, por outro lado, é catalisada por enzimas fosfodiesterases (PDEs, do inglês *phosphodiesterases*) (SCHMIDT; RYJENKOV; GOMELSKY, 2005), cujos domínios conservados são EAL ou HD-GYP. Enquanto o domínio EAL cliva c-di-GMP em pGpG (SCHMIDT; RYJENKOV; GOMELSKY, 2005), o domínio HD-GYP

cliva o c-di-GMP em 2 GMPs (DOW *et al.*, 2006; YAKUNIN *et al.*, 2004). Assim como o GGDEF, os nomes EAL e HD-GYP se referem aos aminoácidos presentes no sítio ativo das enzimas. Os domínios GGDEF e EAL também podem estar presentes em uma mesma proteína. Nesses casos, um dos domínios está enzimaticamente ativo, enquanto o outro domínio possui somente papel regulatório (HENGGE, 2016).



**Figura 1. Estrutura e sinalização por c-di-GMP.** A sinalização dependente de c-di-GMP está associada à motilidade, aderência, formação de biofilme, virulência, entre outros processos. Adaptado de (JENAL; REINDERS; LORI, 2017).

O mecanismo de ação do segundo mensageiro é a ligação ao alvo e a consequente mudança funcional da macromolécula efetora (proteína ou RNA). Domínios GGDEF e EAL degenerados são enzimaticamente inativos, mas podem ligar c-di-GMP e promover mudanças de função de determinadas proteínas. Em *Pseudomonas fluorescens*, o domínio degenerado EAL da proteína transmembranar

LapD, por exemplo, é capaz de ligar c-di-GMP e, somente mediante tal ligação, LapD pode interagir e assim inibir a protease LapG, cuja função é degradar proteínas que participam da adesão celular (CHATTERJEE *et al.*, 2014). Assim, em altos níveis intracelulares de c-di-GMP, a adesão celular aumenta.

Outro exemplo importante do mecanismo de ação de c-di-GMP é a ligação em proteínas PilZ. Os domínios PilZ, assim como os domínios GGDEF e EAL, podem ligar o dinucleotídeo cíclico e levar a uma mudança funcional na proteína. Em *Escherichia coli*, por exemplo, a ligação de c-di-GMP ao domínio PilZ da proteína YcgR resulta na diminuição da rotação flagelar pela interação de YcgR com a proteína da maquinaria flagelar MotA (BOEHM *et al.*, 2010). Desse modo, a bactéria é capaz de controlar a motilidade *swimming* (aquela que depende do flagelo em ambientes aquosos) pela concentração intracelular de c-di-GMP que, por sua vez, é controlada pelas DGCs e PDEs.

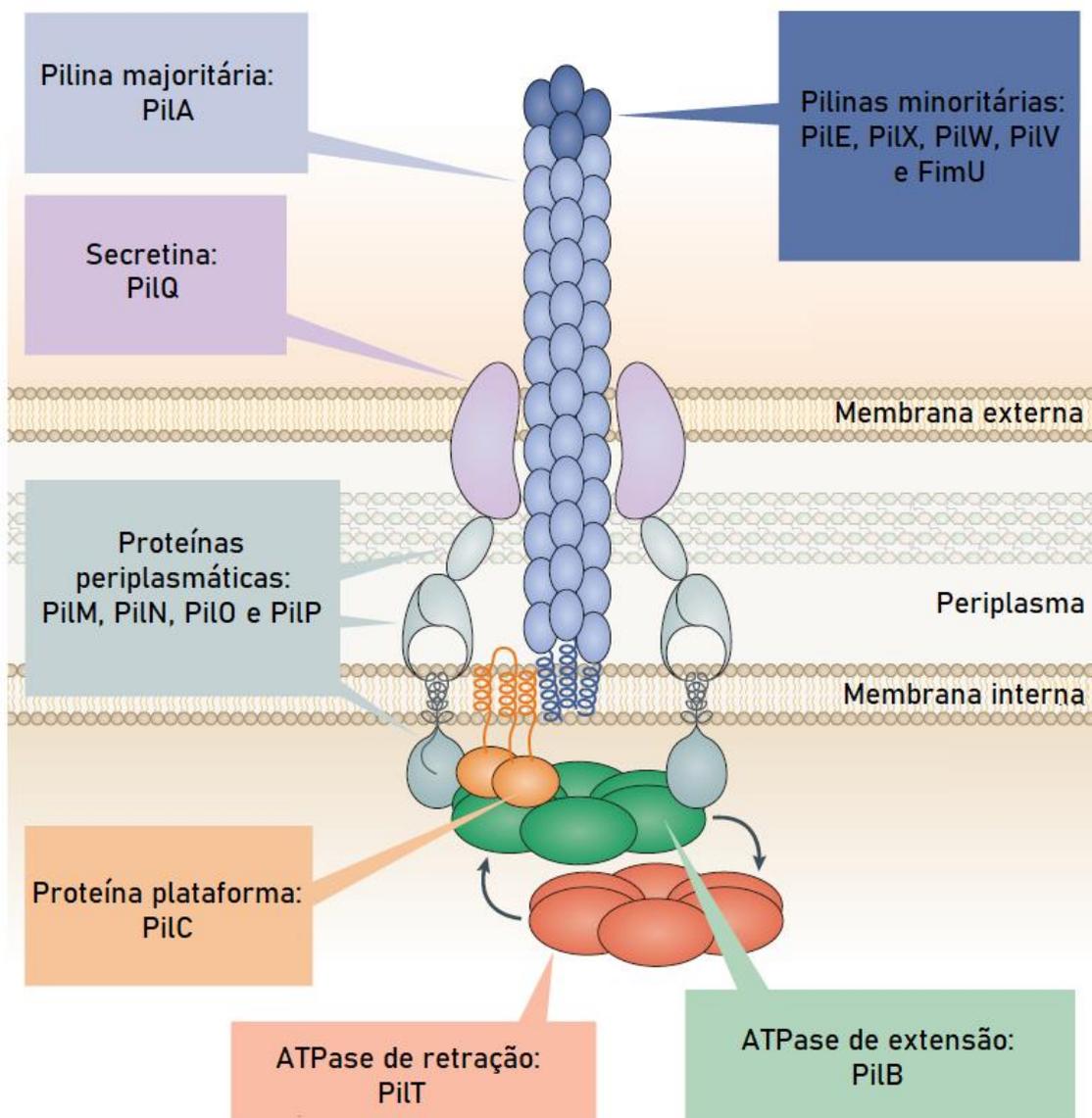
O c-di-GMP também é capaz de se ligar a fatores de transcrição e, assim, exercer um controle do início da transcrição por regulação alostérica. Um exemplo bem conhecido é a interação do segundo mensageiro com o fator FleQ de *P. aeruginosa*. FleQ regula positivamente a transcrição de genes flagelares e negativamente a transcrição de genes que codificam proteínas da síntese do exopolissacarídeo Pel, muito importante para a formação de biofilme. Quando ligado a c-di-GMP, o fator de transcrição perde atividade e, conseqüentemente, a expressão de genes de flagelo é diminuída (CLAUDINE; HARWOOD, 2013). Além disso, a ligação de c-di-GMP ao fator FleQ, normalmente ligado ao promotor do operon *pel*, faz com que se solte do DNA, permitindo a transcrição (HICKMAN; HARWOOD, 2008).

O papel regulatório de c-di-GMP ainda ocorre em proteínas de sistemas de dois componentes com domínios GGDEF e EAL (GALPERIN, 2006), o que possibilita que as redes regulatórias respondam à concentração do dinucleotídeo cíclico nas células. Em bactérias, um sistema de dois componentes de transdução de sinal canônico envolve a recepção do sinal por uma proteína histidina quinase (HK, do inglês *histidine kinase*) com domínio sensor, geralmente extracitoplasmático, que leva à autofosforilação a partir de ATP em um resíduo de histidina. Posteriormente, a HK transfere o fosfato para um resíduo de aspartato em outra proteína, com domínio regulatório, chamada regulador de resposta (STOCK; ROBINSON; GOUDREAU, 2000). Entretanto, os sistemas variam muito em estrutura, podendo somente uma proteína possuir domínios de histidina quinase e regulador de resposta ou ainda o domínio sensor se encontrar separado da HK, em outra proteína. A título de exemplo, o sistema quimiossensorial Wsp em *P. aeruginosa* é um sistema de dois componentes que está envolvido na alteração dos níveis intracelulares de c-di-GMP. A proteína sensora WspA sente o sinal (crescimento em superfície) e transmite para a HK WspE a qual, por sua vez, fosforila e ativa o regulador de resposta WspR. WspR é uma DGC que aumenta a concentração intracelular de c-di-GMP mediante o sinal sentido por WspA e resulta na diminuição da expressão de genes flagelares e aumento da formação de biofilme (FRANCIS; STEVENSON; PORTER, 2017).

### 1.3. O pilus tipo IV

A formação de biofilme, a aderência a superfícies e a motilidade *twitching* são processos que se relacionam com uma estrutura celular, já mencionada nesse trabalho, conhecida como pilus tipo IV (T4P) (Figura 2) (LEIGHTON *et al.*, 2015). O T4P é uma estrutura polimérica polar e dinâmica, que possui a característica única de extensão e retração, a qual confere à célula a competência de se mover em

superfícies sólidas ou incorporar DNA (BURROWS, 2012; NOLAN *et al.*, 2020), sendo muito importante para as etapas iniciais de colonização de superfícies (CRAIG; FOREST; MAIER, 2019). Ademais, o pilus é um importante fator de patogenicidade em *P. aeruginosa* e mutantes incapazes de produzir o T4P são menos infecciosos (FARINHA *et al.*, 1994). Suas características tornam o T4P um importante alvo para a criação de terapias antimicrobianas alternativas ao uso de antibióticos convencionais que atuam em alvos essenciais para a viabilidade da bactéria.



**Figura 2. Estrutura do pilus tipo IV em *P. aeruginosa*.** O filamento polimérico, composto por PilA e pilinas minoritárias, é polimerizado/despolimerizado pela ação das ATPases. As proteínas periplasmáticas alinham as proteínas PilM e PilC à secretina PilQ, cujo papel é abrir um canal na membrana externa por onde o filamento sai da célula. Adaptado de (CRAIG; FOREST; MAIER, 2019).

O T4P em *P. aeruginosa* é composto por mais de 10 proteínas distintas. A secretina PilQ possui função de formar um poro por onde o pilus atravessa a membrana externa da célula (LEIGHTON *et al.*, 2015). As proteínas periplasmáticas PilN, PilO e PilP alinham a base do pilus à secretina PilQ (AYERS *et al.*, 2009). A proteína que se liga ao peptidoglicano FimV tem o papel de facilitar a formação de complexos de PilQ na membrana externa e ajudar na montagem do pilus (WEHBI *et al.*, 2011). Já a proteína plataforma PilC está presente na membrana interna e é essencial para a interação com as ATPases citoplasmáticas PilB e PilT que fornecem, respectivamente, a energia de polimerização e despolimerização das pilinas por meio da hidrólise de ATP (CRAIG; FOREST; MAIER, 2019; TAKHAR *et al.*, 2013). Além disso, o filamento polimérico é composto, majoritariamente, pelas subunidades da proteína PilA (a pilina majoritária) e pelas proteínas PilE, PilV, PilW, PilX e FimU (chamadas de pilinas minoritárias) (NGUYEN *et al.*, 2015). Todas as pilinas passam pela membrana interna da célula antes da polimerização.

O pilus participa da primeira etapa do desenvolvimento, ou maturação, do biofilme, em que a célula se adere à superfície e se prepara para a colonização. Nesse estágio reversível, o pilus e a produção de exopolissacarídeos são essenciais para a formação das comunidades microbianas (HICKMAN; HARWOOD, 2008; O'TOOLE; KOLTER, 1998). Após a adesão inicial, as células se aderem irreversivelmente, formam microcolônias e, posteriormente, macrocolônias envolvidas pela matriz extracelular (HA, D.-G.; O'TOOLE, 2015). Na forma madura, envolto por açúcares, DNA e proteínas, o biofilme se torna uma barreira que protege as células contra fagos, antibióticos e células de defesa (ROMLING; BALSALOBRE, 2012). Não é surpresa, portanto, que o biofilme maduro seja altamente persistente e, com frequência, seja encontrado em pacientes com infecções crônicas. Diante da dificuldade de tratar as

infecções de *P. aeruginosa* na forma de biofilme, o T4P se torna um alvo interessante visando à inibição do processo de formação dessas comunidades microbianas.

#### 1.4. Regulação da biossíntese do pilus tipo IV

Entender a regulação que determina a biossíntese do T4P é indispensável para planejar métodos de diminuição da adesão e formação de biofilmes de *P. aeruginosa*. Mudanças na osmolaridade, pH e composição do meio são detectadas pelos sistemas de dois componentes bacterianos e, de forma mais genérica, os sinais mecânicos (que dependem do pilus e de flagelo) contribuem para a rápida transição planctônico-séssil (GRAHAM; BURROWS, 2021).

A regulação da biossíntese do T4P envolve outro segundo mensageiro importante em *P. aeruginosa*, o monofosfato cíclico de adenosina (cAMP). Acredita-se que a regulação dependente de cAMP seja o primeiro nível de controle na transição para o estilo de vida séssil da bactéria (O'TOOLE; WONG, 2016). Os níveis de cAMP são controlados pelo sistema Pil-Chp, cuja resposta depende da extensão e retração do pilus (PERSAT *et al.*, 2015). Supõe-se que a proteína sensora do sistema, PilJ, muda de conformação quando em contato com Pila na membrana interna da célula. Porém, essa interação só ocorre posteriormente à retração do pilus, sugerindo que a pilina majoritária sofre mudanças conformacionais após o contato com a superfície, essenciais para interação com PilJ (PERSAT *et al.*, 2015). Em seguida ao sinal, PilJ promove a autofosforilação da HK ChpA que, então, pode fosforilar o regulador de resposta PilG (DARZINS, 1993; WHITCHURCH *et al.*, 2004). Quando fosforilado, PilG ativa a adenilato ciclase de membrana interna CyaB, o que eleva os níveis de cAMP intracelulares (FULCHER *et al.*, 2010). A atividade de PilG depende da interação e co-localização com outras duas proteínas: FimL e FimV (INCLAN *et al.*, 2016). O aumento dos níveis de cAMP ativa o fator de transcrição Vfr (do inglês, *virulence factor*

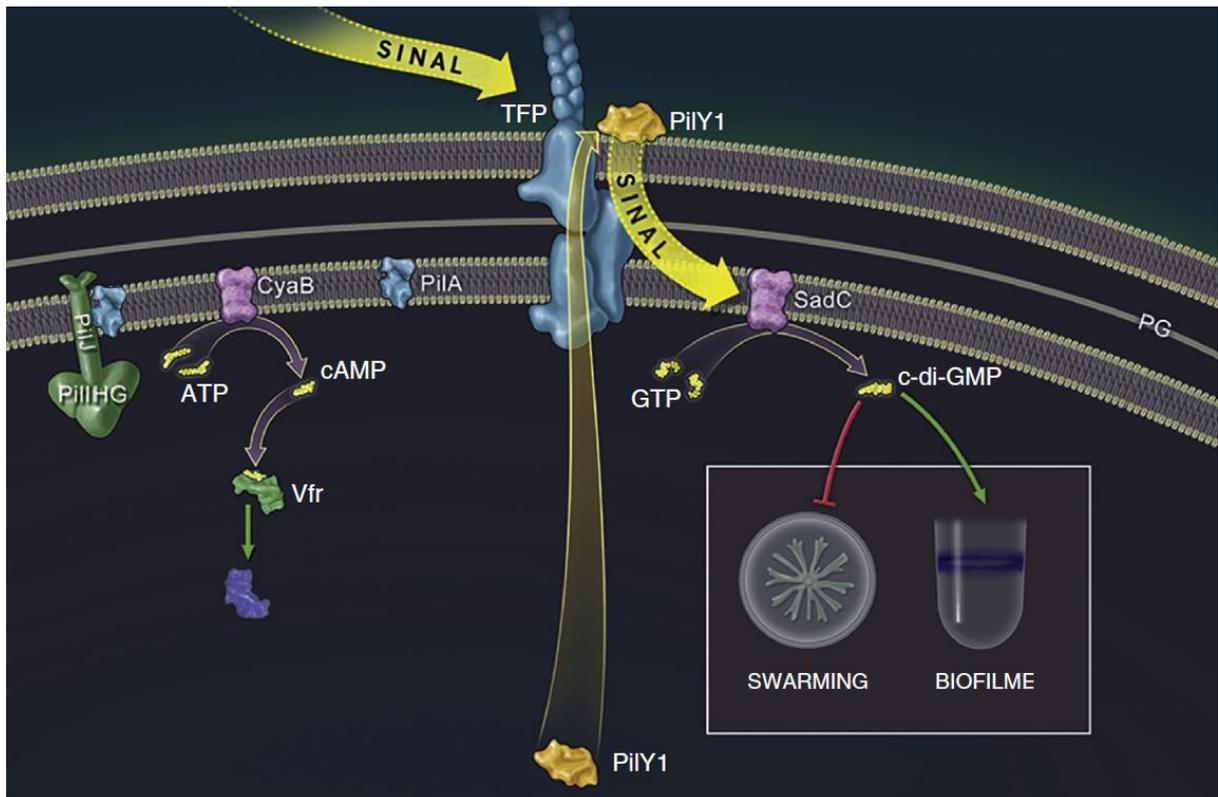
*regulator*), o qual eleva a expressão de diversos genes de fatores de virulência, inclusive da biossíntese do T4P (WOLFGANG *et al.*, 2003). Como as células planctônicas possuem T4P em baixos níveis, é proposto que a elevação dos níveis de cAMP seja o primeiro passo no aumento da expressão dos genes do pilus (O'TOOLE; WONG, 2016).

Entre os genes com a expressão aumentada pelo sistema Pil-Chp, está *pilY1*. PilY1 é uma adesina não-pilina, cujo gene está contido no operon das pilinas minoritárias (BELETE; LU; WOZNIAK, 2008). A proteína é encontrada no citosol, na membrana interna e na superfície da célula, e é proposto que seja uma adesina associada ao pilus (HEINIGER *et al.*, 2010; LUO *et al.*, 2015). PilY1 regula negativamente em *P. aeruginosa* a motilidade *swarming* (um tipo de motilidade social que depende de flagelo, pela qual as células se movem em uma superfície semi-sólida com a ajuda de biosurfactantes) (KUCHMA; GRIFFIN; O'TOOLE, 2012). Além disso, já foi mostrado que PilY1 é essencial ao sentir a adesão na superfície da célula e transmitir o sinal, via proteínas periplasmáticas do pilus, necessário para ativar a DGC de membrana interna SadC e, assim, elevar os níveis intracelulares de c-di-GMP, aumentando a formação de biofilme e diminuindo o *swarming* (LUO *et al.*, 2015; WEBSTER *et al.*, 2021).

A elevação dos níveis intracelulares de cAMP também resulta na ativação de outro sistema de dois componentes correlacionado com o T4P: o sistema PilS-PilR, o qual regula a quantidade de PilA na célula (KILMURY; BURROWS, 2016). PilS é uma HK de membrana interna capaz de interagir com a sequência altamente conservada de PilA presente na extremidade N-terminal da pilina. Em altos níveis de PilA, as interações entre PilS e a pilina ocorrem com maior frequência na membrana interna, ativando na HK sua conformação de fosfatase e, assim, impedindo que PilR (o

regulador de resposta do sistema) fique fosforilado e ativo (KILMURY; BURROWS, 2016). No entanto, quando os níveis de PilA estão baixos, PilS mantém sua atividade quinase e fosforila PilR, ativando-o. O regulador de resposta, ligado ao fator  $\sigma^{54}$ , promove a transcrição de *pilA* e de outros genes do regulon de PilR (KILMURY; BURROWS, 2016, 2018). Desse modo, quando ocorre o contato com uma superfície e há queda dos níveis de PilA pela polimerização do pilus, o sistema PilS-PilR atua no aumento da expressão de *pilA* e outros genes de fatores de virulência (GRAHAM; BURROWS, 2021).

A Figura 3 ilustra parcialmente o modelo proposto para regulação da biossíntese do T4P e a formação de biofilme em *P. aeruginosa*. Em um primeiro momento, o contato com a superfície providenciado pelo pilus de células planctônicas aumentaria os níveis de cAMP pelo sistema Pil-Chp e, conseqüentemente, a expressão dos genes da biossíntese do T4P, entre eles *pilY1*. Posteriormente, PilY1 sentiria o sinal de adesão, o que resultaria na elevação dos níveis de c-di-GMP, via SadC, e o aumento da formação de biofilme (O'TOOLE; WONG, 2016). Entretanto, ainda existe muita discussão sobre o assunto, pois a montagem do pilus em si depende da elevação dos níveis de c-di-GMP. Mesmo células planctônicas ou recém-aderidas a uma superfície necessitam de um sinal proveniente do dinucleotídeo cíclico para a síntese do T4P. Essa dependência é evidenciada pela proteína que liga c-di-GMP em sua forma ativa, FimX, cuja interação com a ATPase PilB é requerida para a formação do T4P e para a motilidade *twitching* (JAIN; SLIUSARENKO; KAZMIERCZAK, 2017; KAZMIERCZAK; LEBRON; MURRAY, 2006). Dessa forma, c-di-GMP deve estar *upstream* ao cAMP na regulação da biossíntese do T4P. Isso mostra que parte da sinalização envolvida nesses processos ainda é desconhecida.



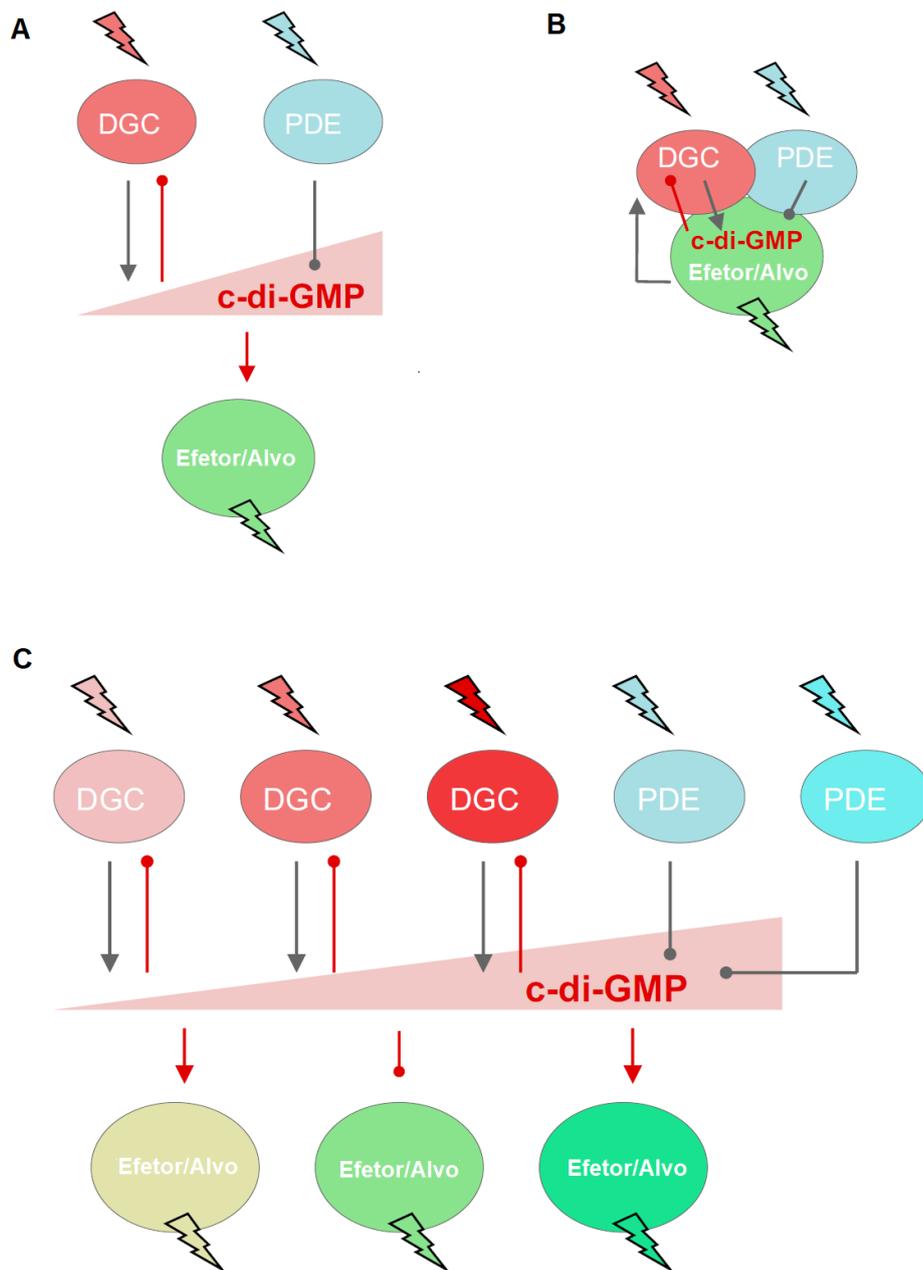
**Figura 3. Regulação da biossíntese do pilus tipo IV e formação de biofilme em *P. aeruginosa*.** O sinal de adesão é sentido, em um primeiro momento, pelo sistema Pil-Chp, o que eleva os níveis de cAMP na célula e, conseqüentemente, aumenta a expressão de *pilY1*. A adesina na superfície da célula, então, transmite o sinal de adesão para a DGC SadC, o que eleva os níveis intracelulares de c-di-GMP, aumentando a formação de biofilme e diminuindo a motilidade *swarming*. O modelo, porém, ainda está em discussão, visto que c-di-GMP estaria *upstream* ao cAMP na biossíntese do pilus. Ao contrário do mostrado neste esquema, a interação de PilJ com PilH e PilG não é direta, mas todas participam do mesmo sistema de sinalização. Adaptado de (O'TOOLE; WONG, 2016).

### 1.5. O papel das DGCs nas alterações fenotípicas e a função de DgcP

A sinalização de c-di-GMP relacionada com fenótipos de motilidade, virulência e formação de biofilme possui uma grande multiplicidade de sinais de ativação com certa redundância de função em proteínas do metabolismo de c-di-GMP. A linhagem PA14, por exemplo, possui dezessete genes que codificam proteínas com domínios GGDEF, seis genes que codificam proteínas com domínios EAL, dezesseis genes para proteínas que possuem ambos GGDEF e EAL e três genes para proteínas com HD-GYP (LEE, D. G. *et al.*, 2006). Entre as proteínas com domínios GGDEF, sabe-se que algumas delas, de forma redundante, são importantes para a formação de biofilme

e motilidade *twitching* (HUANGYUTITHAM; GÜVENER; HARWOOD, 2013; MERRITT *et al.*, 2007; NICASTRO *et al.*, 2020).

Mas como diferentes enzimas e efetores, com vias de sinalização atuando paralelamente, respondem a uma concentração global de c-di-GMP? Além disso, como DGCs e PDEs distintas, às vezes, produzem respostas altamente específicas, enquanto outras enzimas co-expressas e co-ativas parecem atuar parcialmente em determinado fenótipo? A explicação para esses comportamentos está conectada a uma possível sinalização local dependente de c-di-GMP (HENGGE, 2021; KUNZ; GRAUMANN, 2020). No modelo de sinalização local, alguns fatores devem ser considerados: 1) a maioria das DGCs apresentam inibição pelo seu produto, ou seja, c-di-GMP é capaz de se ligar a um sítio específico da enzima (o sítio I) e inibir sua atividade (CHRISTEN, B. *et al.*, 2006); 2) as diferentes afinidades dos sítios I ( $K_i$ ) combinadas com as diferentes afinidades dos sítios de ligação de c-di-GMP dos efetores ( $K_d$ ) resultam em limiares de resposta específicos; 3) existe a formação de complexos de interação, muitas vezes localizados, entre DGCs, PDEs e seus alvos; 4) ocorrência de sinalização global em conjunto com as sinalizações locais, e ativação ou alta expressão de uma DGC ou PDE com a capacidade de alterar os níveis globais de c-di-GMP (HENGGE, 2021). A Figura 4 ilustra os modelos de sinalização local e global que controlam os níveis de c-di-GMP nas células.



**Figura 4. Sinalização local e global dependentes de c-di-GMP.** (A) Modelo global simplificado no qual uma DGC e uma PDE (altamente expressas) controlam antagonicamente a concentração celular de c-di-GMP. O aumento dos níveis intracelulares de c-di-GMP leva ao *feedback* que inibe a DGC. O segundo mensageiro, nesse modelo, alcança seu alvo por difusão. (B) Modelo de sinalização local no qual efetor, DGC e PDE atuam em conjunto em complexos proteicos. A produção/degradação local do segundo mensageiro não muda os níveis globais e o c-di-GMP pode facilmente encontrar seu alvo pela proximidade. (C) Modelo global complexo em que várias DGCs e PDEs controlam a concentração celular de c-di-GMP. A transição de baixos níveis para altos níveis globais permite que diferentes efetores (com diferentes valores de  $K_d$ ) possam ser ativados ou inibidos, à medida que algumas DGCs vão sendo inibidas, consecutivamente, em função dos valores de  $K_i$ , o que possibilita uma grande quantidade de respostas/fenótipos. Acredita-se que os três modelos podem ocorrer simultaneamente. Setas representam ativação e símbolos com círculos representam inibição. Raios indicam sinais regulatórios de entrada e saída. Adaptado de (HENGGE, 2021).

O modelo de sinalização local prevê que, para exercer sua função, um efetor dependente da ligação a c-di-GMP poderá fazê-la mediante altas concentrações globais do segundo mensageiro ou, ainda, em condições de baixos níveis globais de c-di-GMP, desde que ocorra a sinalização pela proximidade com uma DGC ativa. Essa DGC local, por exemplo, em condições de baixos níveis do segundo mensageiro, não contribui para o aumento da concentração global de c-di-GMP, pois os níveis do dinucleotídeo cíclico são mantidos baixos por uma ou mais PDEs. Mesmo assim, a transdução de sinal e a resposta local podem ocorrer. Entretanto, o que aumenta a quantidade de fenótipos observáveis e, conseqüentemente, a complexidade da sinalização por c-di-GMP é a transição de baixos níveis para altos níveis globais do segundo mensageiro, a qual permite que diferentes efetores (com diferentes valores de  $K_d$ ) possam ser ativados ou inibidos, à medida que algumas DGCs vão sendo inibidas, consecutivamente, em função dos valores de  $K_i$  (HENGGE, 2021). Em virtude disso, certas enzimas do metabolismo de c-di-GMP parecem ser mais importantes para observação de determinados fenótipos, enquanto outras parecem não interferir com igual magnitude nas mesmas características.

A diguanilato ciclase DgcP, cujo gene é altamente conservado em *Pseudomonas* (ARAGON *et al.*, 2015; WEI *et al.*, 2019) é um exemplo de DGC que não é determinante para os fenótipos de adesão, mas atua parcialmente em processos ligados à sessilidade. Em um alinhamento feito por nosso grupo (NICASTRO, não publicado) foram encontrados ortólogos de *dgcP* em 75 espécies, incluindo 32 outras proteobactérias, como Vibrionales e Alteromonadales. Já foi mostrado que a deleção de *dgcP* diminui a formação de biofilme e a motilidade *twitching* em *P. aeruginosa* (ARAGON *et al.*, 2015; NICASTRO *et al.*, 2020; WEI *et al.*,

2019) e experimentos de duplo híbrido bacteriano mostraram que DgcP interage com a proteína FimV pelo domínio GGDEF, sendo sua localização polar e atividade de diguanilato ciclase dependentes de tal interação (NICASTRO *et al.*, 2020). Mesmo não sendo essencial para a formação de biofilme, DgcP é um importante alvo de estudo da transição de estilos de vida de *P. aeruginosa* e da regulação envolvida na biossíntese do T4P, visto que interage diretamente com uma proteína da montagem do pilus.

Foi demonstrado que, em resposta ao contato a uma superfície, um aumento rápido de c-di-GMP intracelular em *P. aeruginosa* pode favorecer a diferenciação das células em *strickers*, que se mantêm aderidas e expressam o T4P, e células *spreaders* flageladas que se disseminam no ambiente (LAVENTIE *et al.*, 2019), em um comportamento análogo à diferenciação de *Caulobacter crescentus* (CHRISTEN, M. *et al.*, 2010). Laventie *et al.* demonstraram que uma proteína com domínio receptor de c-di-GMP localizada no polo, denominada FimW, ativa a função do T4P de forma ainda desconhecida, favorecendo a sessilidade da bactéria. Baseada em dados preliminares, uma hipótese atraente é que DgcP possa ser a DGC responsável pela sinalização local dependente de c-di-GMP no polo celular. Portanto, é de grande importância verificar a regulação da expressão de DgcP, se ela também interage com outras proteínas e se tal fato interfere em comportamentos ligados à motilidade e formação de biofilme.

## 2. Objetivos

Analisar a localização e a expressão de DgcP em *P. aeruginosa*.

### Objetivos específicos

- Obter linhagens em que a fusão de DgcP com uma proteína fluorescente seja expressa a partir do locus cromossômico original.
- Determinar as condições em que DgcP se localiza nos polos da célula e a dependência de proteínas da montagem e regulação do T4P, usando uma abordagem genética.
- Estudar a organização no genoma e a expressão de *dgcP*.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Linhagens, plasmídeos e condições de cultivo

Culturas de *E. coli*, DH5 $\alpha$  e S17-1, e *P. aeruginosa* PA14 foram cultivadas rotineiramente em meio LB, a 37°C (SAMBROOK, J, FRITSCH, E. F., MANIATIS, 1989), acrescido de antibióticos, quando necessário, nas seguintes concentrações: para culturas de *E. coli*, ampicilina 100  $\mu\text{g/mL}$  ou gentamicina 10  $\mu\text{g/mL}$  e, para *P. aeruginosa*, ácido nalidíxico 20  $\mu\text{g/mL}$  ou gentamicina 50  $\mu\text{g/mL}$ . Para os ensaios de motilidade *swimming* e *swarming*, *P. aeruginosa* foi cultivada em meio M9 modificado (20 mM NH<sub>4</sub>Cl, 12 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 22 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,6 mM NaCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub> e 0,5% casaminoácidos) (TREMBLAY *et al.*, 2007). Para os ensaios de microscopia, *P. aeruginosa* foi cultivada em meio M63 (15mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,8 $\mu\text{M}$  FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 1 mM MgSO<sub>4</sub> e 2% succinato) (ELBING; BRENT, 2002). As linhagens e plasmídeos utilizados no trabalho encontram-se na Tabela 1.

#### 3.2. Técnicas básicas de Biologia Molecular

Isolamento de DNA plasmidial, digestão, reação de polimerase em cadeia (PCR), transformações e outras técnicas básicas de Biologia Molecular foram realizadas de acordo com metodologias padrão, descritas em manuais de referência (AUSUBEL *et al.*, 2001; SAMBROOK, J, FRITSCH, E. F., MANIATIS, 1989). Os oligonucleotídeos utilizados no trabalho encontram-se na Tabela 2.

Tabela 1. Linhagens e Plasmídeos

Nome	Descrição	Referência
<b><i>E. coli</i></b>		
DH5 $\alpha$	<i>supE44 lacU169 (80 lacZM15) hsdR17 recA1 endA11 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Invitrogen
S17-1	<i>Pro thi recA hsdR (r- m+)</i> Tpr Smr Kms [ $\Omega$ RP4-2-Tc::Um-Km::Tn7]	(SIMON; PRIEFER; PÜHLER, 1983)
<b><i>P. aeruginosa</i></b>		
PA14	Linhagem selvagem <i>P. aeruginosa</i> UCBPP-PA14	(RAHME <i>et al.</i> , 1995)
$\Delta fimV$	Deleção de <i>fimV</i> em PA14	(NICASTRO <i>et al.</i> , 2020)
$\Delta pilA$	Deleção de <i>pilA</i> em PA14	(HERNANDEZ-MONTELONGO <i>et al.</i> , 2021)
$\Delta chpA$	Deleção de <i>chpA</i> em PA14 usando o plasmídeo pJB116	Este trabalho
$\Delta pilR$	Deleção de <i>pilR</i> em PA14	(KAIHAMI, 2018)
RBJ030	Integração da sequência regulatória de <i>dsbA1</i> fusionada ao <i>lacZ</i> em PA14	Este trabalho
RBJ031	Integração da sequência regulatória de <i>dgcP</i> fusionada ao <i>lacZ</i> em PA14	Este trabalho
RBJ034	Integração do plasmídeo mini-CTX- <i>lacZ</i> em PA14	Este trabalho
PA14::CTX- <i>lacZ</i> lacP1	Integração da sequência regulatória de <i>lacP1</i> fusionada ao <i>lacZ</i> em PA14	Este trabalho
RBJ009	PA14 expressando <i>mNGr_dgcP</i> do locus cromossômico de <i>dgcP</i>	Este trabalho
RBJ011	PA14 expressando <i>dgcP_mNGr</i> do locus cromossômico de <i>dgcP</i>	Este trabalho
RBJ027	$\Delta chpA$ expressando <i>dgcP_mNGr</i> do locus cromossômico de <i>dgcP</i>	Este trabalho
RBJ050	$\Delta pilR$ expressando <i>dgcP_mNGr</i> do locus cromossômico de <i>dgcP</i>	Este trabalho
RBJ051	$\Delta fimV$ expressando <i>dgcP_mNGr</i> do locus cromossômico de <i>dgcP</i>	Este trabalho
RBJ052	$\Delta pilA$ expressando <i>dgcP_mNGr</i> do locus cromossômico de <i>dgcP</i>	Este trabalho
<b>Plasmídeo</b>		
pEX18Gm	Vetor de substituição alélica, <i>oriT<sup>+</sup> sacB</i> ; Gm <sup>R</sup>	(HOANG, T T <i>et al.</i> , 1998)
mini-CTX- <i>lacZ</i>	Vetor de integração auto proficiente derivado do mini-CTX1; Tc <sup>R</sup>	(HOANG, Tung T. <i>et al.</i> , 2000)
pEX_ <i>dgcP_mNGr</i>	Parte de <i>dgcP</i> fusionado ao gene para mNGr e a região à jusante de <i>dgcP</i> clonadas em pEX18Gm; Gm <sup>R</sup>	Este trabalho
pEX_ <i>mNGr_dgcP</i>	Parte de <i>dgcP</i> fusionado ao gene para mNGr e a região à montante de <i>dgcP</i> clonadas em pEX18Gm; Gm <sup>R</sup>	Este trabalho
pJB116	pJB100 carregando $\Delta chpA$ no fragmento Spel; subclonado de pJB4	(BERTRAND; WEST; ENGEL, 2010)
CTX- <i>lacZ</i> lacP1	Sequência regulatória de lacP1 fusionada ao <i>lacZ</i> no mini-CTX- <i>lacZ</i>	(FULCHER <i>et al.</i> , 2010)
CTX- <i>lacZ_pdsbA1</i>	Sequência regulatória de <i>dsbA1</i> fusionada ao <i>lacZ</i> no mini-CTX- <i>lacZ</i>	Este trabalho
CTX- <i>lacZ_pdgcP</i>	Suposta sequência regulatória de <i>dgcP</i> fusionada ao <i>lacZ</i> no mini-CTX- <i>lacZ</i>	Este trabalho

**Tabela 2.** Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho

<b>Código</b>	<b>Sequência (5'→3')</b>	<b>Utilização</b>	
RBJ001p	CGAATTCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCC	Linearização do vetor pEX18Gm	
RBJ002p	CAAGCTTGGCACTGGCCGTC		
RBJ003p	AAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGATCCAGGTCGGTATCAGCACCG	Fusão <i>mNGr_dgcP</i>	
RBJ004p	CTTTAGAGACCATACTCATGGCGGACTCCCGGC		
RBJ005p	TCCGCCATGAGTATGGTCTCTAAAGGTGAAGAAGATAATATGGC		
RBJ006p	GTCGCGACTCATTCCGCCTCCGCCTCCTTTAT		
RBJ007p	AGGCGGAGGCGGAATGAGTCGCGACGACGTCCA		
RBJ008p	AGCTATGACCATGATTACGAATTCGCCAGCGTCTCGCTAAAGCTC		
RBJ009p	AAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGTATACCGACGTGCTGGACAACG		Fusão <i>dgcP_mNGr</i>
RBJ010p	CGCCTCCGCCTCCGGCCACTTCCAGGCGGTC		
RBJ011p	CTGGAAGTGGCCGGAGGCGGAGGCGGAATG		
RBJ012p	GCTGGTCGCCCTTCATTTATACAATTCATCCATACCCATTACATCAGTA AAAGC		
RBJ013p	ATTGTATAAATGAAGGGCGACCAGCGCACAT		
RBJ014p	AGCTATGACCATGATTACGAATTCGGGTGGAGGTGTAGTGGAGGAC		
RBJ019p	GGGATCCTAACTAACTAG	Linearização do vetor mini-CTX	
RBJ020p	GGAATTCGATATCAAGCTTATC		
RBJ021p	TAAGCTTGATATCGAATTCCAAGCTGTGCAACAAGGAC	Amplificação do promotor de <i>dsbA1</i>	
RBJ022p	GCTAGTTAGTTAGGATCCCCTCAGGTTACGCATCGTTC		
RBJ025p	TAAGCTTGATATCGAATTCCACCACATCCTGCTCAGTTC	Amplificação do suposto promotor de <i>dgcP</i>	
RBJ026p	GCTAGTTAGTTAGGATCCCCCTGCTCGATGTTCTCCAG		
RBJ053p	GCCAAGAAGTAGGCAAGGTG	Confirmação da organização gênica por RT-PCR	
RBJ054p	GTCACAGGAGGGGTTCACTC		
RBJ055p	TGCGGACAAGGCCTTGGTC		
RBJ056p	CTGCTCGATGTTCTCCAGGT		
RBJ061p	AATACCTGCGCAACTCAAC	qRT-PCR de <i>dgcP</i>	
RBJ062p	TTGTCCAGCACGTCGGTATA		
nadB_upper	CTACCTGGACATCAGCCACA	qRT-PCR de <i>nadB</i>	
nadB_lower	GGTAATGTCGATGCCGAAGT		

### 3.3. Construção das linhagens recombinantes de *P. aeruginosa*

#### 3.3.1. Linhagens recombinantes contendo mNeonGreen

Para construção das linhagens contendo as fusões DgcP-mNeonGreen e mNeonGreen-DgcP foi utilizado um método de clonagem independente de sequência e ligação (SLIC, do inglês *sequence and ligation-independent cloning*) (ISLAM *et al.*, 2017; JEONG *et al.*, 2012). Os oligonucleotídeos foram desenhados de forma a conter regiões homólogas entre fragmentos e vetor (Tabela 2). Os fragmentos e o vetor foram amplificados por PCR usando a enzima Q5 DNA polimerase (NEB) e purificados com o kit GeneJET (Thermo). A reação de SLIC foi feita com a enzima T4 DNA polimerase (NEB) e os produtos de reação foram transformados em DH5 $\alpha$ . Os transformantes foram confirmados por PCR e os plasmídeos foram inseridos em S17-1. Os vetores foram então introduzidos em PA14 por conjugação. Como os vetores utilizados são suicidas, eles devem se integrar no cromossomo de PA14 para que as células possuam resistência à marca de seleção. Assim, colônias de PA14 foram selecionadas em meio contendo gentamicina com ácido nalidíxico. O segundo evento de recombinação (a saída do plasmídeo) ocorre de forma natural e foi selecionado utilizando sacarose como contra-seleção, devido a presença do gene *sacB* no vetor (HMELO *et al.*, 2015).

#### 3.3.2. Linhagens repórteres *lacZ*

Para a construção das linhagens repórteres, supostas regiões promotoras de *dsbA1* e *dgcP*, com possíveis sequências de ligação ao ribossomo, foram fusionadas ao gene *lacZ* e integradas ao cromossomo de PA14 no sítio *att* (HOANG, Tung T. *et al.*, 2000). Para isso, as sequências foram clonadas no vetor mini-CTX-*lacZ* por SLIC, conforme descrito no item 3.3.1. deste trabalho (ISLAM *et al.*, 2017; JEONG *et al.*, 2012). Após confirmação por PCR, o plasmídeo foi transferido para S17-1. A

construção foi então inserida em PA14 por conjugação e a seleção ocorreu com o uso de antibióticos (tetraciclina e ácido nalidíxico).

#### 3.4. Curvas de crescimento

As linhagens foram cultivadas em meio LB a 37°C *overnight*. No dia seguinte, as células foram diluídas para  $DO_{600} = 0,01$  e foram plaqueadas em triplicatas para cada linhagem (placa de 24 poços NEST®). As medidas de  $DO_{600}$  foram feitas por 20 horas em intervalos de 30 minutos no aparelho SpectraMax Paradigm® a 600 nm.

#### 3.5. Ensaio de motilidade

##### 3.5.1. *Swimming*

Os ensaios de *swimming* foram realizados de acordo com de Oliveira Pereira, 2018 (DE OLIVEIRA PEREIRA, 2018). Placas de M9 modificado, acrescido de cálcio e glicose, foram solidificadas com 0,3% de ágar (BD Difco). As placas foram preenchidas com 20 mL de meio e permaneceram abertas por 30 minutos no fluxo laminar para a solidificação. Então, 5 µL de cultura em fase exponencial tardia ( $DO_{600} = 3,0$ ) foram inoculados no centro da placa. As placas foram incubadas a 30 °C por 18 horas no interior de sacos plásticos para evitar a evaporação. Foram realizadas triplicatas para cada linhagem e os experimentos foram repetidos em duas ocasiões diferentes. A medida do diâmetro das colônias foi feita com o *software* ImageJ (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012)

##### 3.5.2. *Swarming*

Os ensaios de *swarming* foram realizados de acordo com de Oliveira Pereira, 2018 (DE OLIVEIRA PEREIRA, 2018). Placas de M9 modificado, acrescido de cálcio e glicose, foram solidificadas com 0,5% de ágar (BD Difco). As placas foram preenchidas com 20 mL de meio e permaneceram abertas no fluxo por 60 minutos para solidificação. 5 µL de cultura em fase exponencial tardia foram inoculados no

centro da placa. As placas foram então incubadas por 12h a 30 °C no interior de sacos plásticos para evitar a evaporação. Foram realizadas triplicatas para cada linhagem e os ensaios repetidos em duas ocasiões. A área de cobertura foi medida com o auxílio do *software* ImageJ (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012).

### 3.5.3. *Twitching*

Os ensaios de *twitching* foram adaptados de Filloux and Walker, 2014 (FILLOUX; WALKER, 2014). Placas de LB foram solidificadas com 1,0% de ágar (BD Difco). As placas foram preenchidas com 20 mL de meio, empilhadas e guardadas *overnight* para solidificação. No dia seguinte, uma colônia de cada linhagem foi inoculada no fundo da placa (entre o meio solidificado e a placa de poliestireno) com o auxílio de uma ponteira de 10 µL. As placas foram então incubadas a 37 °C por 18h. Para visualização das colônias, o meio foi retirado cuidadosamente e as placas foram coradas com cristal violeta 0,1% por 15 minutos. Foram realizadas 6 replicatas de cada linhagem em duas ocasiões. A área de cobertura foi medida com o auxílio do *software* ImageJ (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012).

### 3.6. Ensaios de microscopia de luz e fluorescência

Para verificar a localização das fusões, foi feita microscopia de fluorescência usando um microscópio Nikon Eclipse TiE com uma câmera 25-mm SmartShutter e Andor EMCCD i-Xon. Para microscopia de fluorescência e de contraste de fase, uma objetiva Plan APO  $\lambda$  OFN25 Nikon 100X (NA = 1,45) foi utilizada. Todos os ensaios de microscopia foram feitos com células imobilizadas em blocos de M63 com 1,5% agarose, conforme detalhado abaixo. Análise das imagens foi feita com os *softwares* ImageJ, (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012), NIS-Elements Viewer 4.50 e MicrobeJ (DUCRET; QUARDOKUS; BRUN, 2016).

As linhagens foram pré-inoculadas *overnight* em M63 líquido a 37 °C. Nos dias de experimento, células foram diluídas para  $DO_{600} = 0,1$  e crescidas em M63 líquido por 3h. Posteriormente ao crescimento por 3h, as células foram colocadas em M63 1,5% agarose (o bloco para microscopia) por tempos entre 5 min a 4h para verificar a dinâmica de localização de DgcP. As diferenças entre crescimento em meio líquido e sólido foram aqui determinadas levando em consideração que as células colocadas em M63 1,5% agarose por 5 minutos se comportariam ainda como se estivessem em meio líquido. Após determinar que a localização sempre ocorria, independentemente do tempo em meio sólido, todas as imagens foram feitas diretamente após retirar as células do meio líquido e imobilizá-las em M63 1,5% agarose por 5 minutos.

### 3.7. Ensaio de formação de biofilme

Os ensaios de formação de biofilme foram realizados de acordo com O'Toole, 2011 (O'TOOLE, 2011). As linhagens foram pré-inoculadas *overnight* em LB a 37 °C. No dia seguinte, foram inoculadas em LB com  $DO_{600} = 0,01$ . 100  $\mu$ L da diluição foram adicionados por poço em uma placa de 96 poços para incubação a 30 °C por 24h. Foram realizadas 8 replicatas de cada linhagem. Após a incubação, o meio foi retirado e a placa foi banhada com água para saída do meio residual. A placa foi então imersa em solução 0,1% cristal violeta e incubada a temperatura ambiente por 15 minutos. Após isso, o excesso de cristal violeta foi removido e a placa lavada por 4 vezes com água. Para a quantificação, foi utilizado ácido acético 30% com o intuito de solubilizar o cristal violeta aderido na placa e, assim, permitir a medida de absorbância em 550nm. Tais medidas foram realizadas no aparelho Spectramax Paradigm®.

### 3.8. Reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR) e reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

A organização gênica de *dgcP* foi investigada por RT-PCR. Foi realizada a extração do RNA total de PA14 com Trizol (Thermo Fisher) e o RNA foi tratado com DNase I (Thermo Fisher) com a finalidade de degradar todo DNA residual presente na amostra. Posteriormente, o RNA extraído foi usado para a síntese de DNA complementar (cDNA) pela enzima RevertAid M-Mulv Reverse Transcriptase (Thermo), a partir de oligonucleotídeo específico (RBJ056p). O cDNA foi então utilizado como molde para PCRs. As sequências dos oligonucleotídeos usados encontram-se na Tabela 2. DNA genômico e RNA foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente.

Para as análises de expressão por qRT-PCR, o RNA foi extraído de diferentes linhagens após atingirem  $DO_{600} = 1,0$  em meio líquido ou após uma hora de crescimento em meio sólido a partir de linhagens com  $DO_{600} = 1,0$  (300  $\mu$ L de cultura com  $DO_{600} = 1,0$  foram dispersos no meio sólido em 10 gotas de 30  $\mu$ L. Após 1h de crescimento, as células foram raspadas com o auxílio de uma alça de plástico e foram transferidas para o Trizol). O RNA foi então tratado com DNase I da mesma forma que o experimento de RT-PCR. A síntese do cDNA, entretanto, foi feita com oligos randômicos. O cDNA foi amplificado com SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), em triplicata técnica, com oligonucleotídeos específicos para os genes de interesse (Tabela 2) no aparelho StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). A expressão relativa foi calculada pelo método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e o gene *nadB* foi usado como normalizador. Os ensaios de qRT-PCR foram repetidos em três ocasiões, com resultados similares.

### 3.9. Ensaio de $\beta$ -galactosidase

Os ensaios de atividade de  $\beta$ -galactosidase foram adaptados de Miller, 1972 e Sambrook, J, *et al.*, 1989 (MILLER, 1972; SAMBROOK, J, FRITSCH, E. F., MANIATIS, 1989). Linhagens foram pré-inoculadas em meio LB por 16h a 37 °C. No dia seguinte, as culturas foram diluídas para  $DO_{600} = 0,1$  e incubadas a 37 °C até atingirem  $DO_{600}=0,6-1,0$ . 100  $\mu$ L das culturas foram separados em tubos eppendorf e ali foram adicionados 800  $\mu$ L de tampão Z ( $Na_2HPO_4$  8,51 g/L;  $NaH_2PO_4$  6,25 g/L; KCl 0,75 g/L;  $MgSO_4$  0,25 g/L;  $\beta$ -mercaptoetanol 2,7 ml/L). As células foram rompidas pela adição de 50  $\mu$ L de SDS 0,1% e 50  $\mu$ L de clorofórmio. Após o tempo de incubação de 5 min, foram adicionados 200  $\mu$ L de orto-nitrofenol D-galactopiranosídeo (ONPG) 4 mg/mL até o aparecimento de coloração amarela. Com o intuito de parar a reação, 400  $\mu$ L de  $Na_2CO_3$  1M foram adicionados à mistura após o aparecimento da cor. As amostras foram centrifugadas e a absorbância a 420 nm da fase aquosa foi medida no aparelho Nanodrop 2000c (Thermo). Os ensaios foram repetidos pelo menos duas vezes em triplicata e a atividade, em unidades Miller (U), foi medida segundo a fórmula abaixo:

$$U = \frac{1000 DO_{420nm}}{t v DO_{600nm}}$$

em que  $t$  é o tempo, em minutos, para o aparecimento da coloração amarelada e  $v$  é o volume de cultura em mL.

### 3.10. Análises estatísticas

Os *softwares* GraphPad PRISM 8 e Excel foram utilizados para determinar os valores médios e os desvios-padrão dos dados. Todos os gráficos foram feitos no GraphPad PRISM 8 e as barras de erro representam os respectivos desvios-padrão. O teste estatístico utilizado para determinar as diferenças entre os grupos foi o

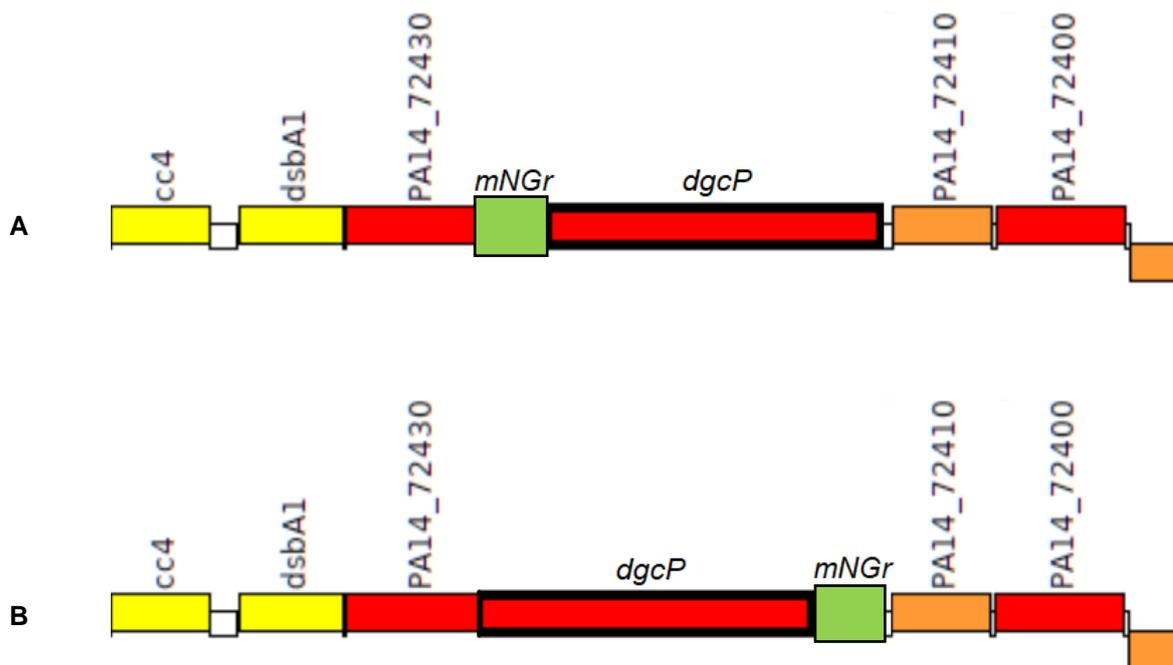
ANOVA, feito no GraphPad PRISM 8. Demais informações estão contidas nas legendas de cada figura.

#### 4. Resultados e Discussão

4.1. Localização de DgcP é polar e depende da proteína FimV, entretanto, independe dos sistemas Pil-Chp e PilS-PilR

Com o objetivo de determinar a localização de DgcP em diferentes condições e possíveis interações com proteínas de regulação da biossíntese do T4P, foram criadas linhagens recombinantes de PA14 contendo a fusão entre a proteína fluorescente mNeonGreen (mNGr) e DgcP. Nosso grupo já possuía uma linhagem expressando, a partir do vetor pJN105, DgcP fusionada à GFP (NICASTRO *et al.*, 2020). Nesse plasmídeo, há uma superexpressão da fusão mesmo na ausência do indutor arabinose, que não permite que estudos da regulação em nível de transcrição ou tradução sejam conduzidos. A construção dessas novas linhagens, entretanto, é justificada pelo fato de poder expressar *dgcP* em seu locus cromossômico, obtendo assim uma situação mais próxima do natural. mNGr foi usada pela maior intensidade de fluorescência quando comparada à GFP (HOSTETTLER *et al.*, 2017).

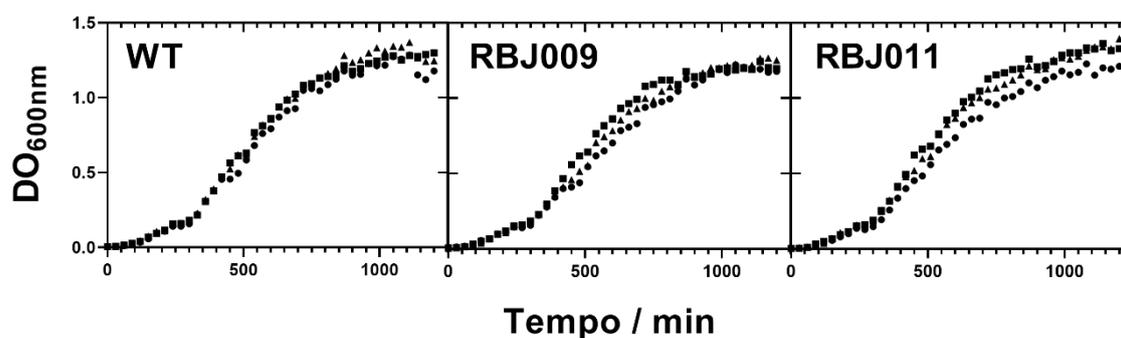
Utilizando o vetor pEX18Gm, foram construídas, a princípio, duas linhagens: PA14\_mNGr\_DgcP (RBJ009) e PA14\_DgcP\_mNGr (RBJ011), com a proteína fluorescente fusionada às extremidades N- e C-terminal de DgcP, respectivamente. A Figura 5 mostra a organização gênica nas proximidades de *dgcP* nas linhagens RBJ009 e RBJ011. As construções, em diferentes posições, foram feitas com o propósito de obter uma fusão cuja estabilidade fosse suficientemente boa para a visualização de DgcP e para tentar evitar que as interações de DgcP fossem prejudicadas por mNGr de acordo com sua posição.



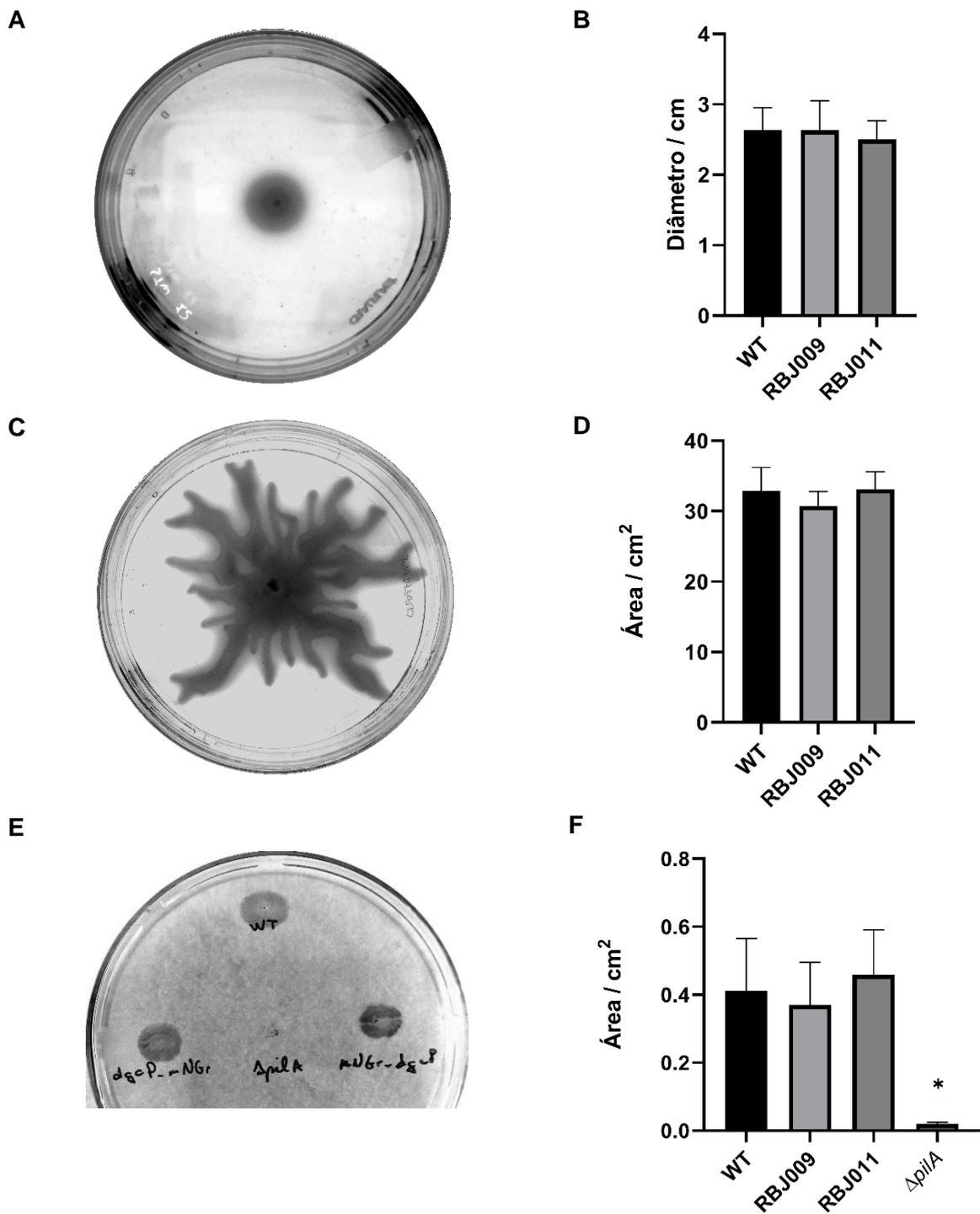
**Figura 5. Locus cromossômico de *dgcP* com a inserção de *mNeonGreen*.** Gene de *mNeonGreen* (*mNGr*) fusionado (A) a montante e (B) a jusante de *dgcP*, respectivamente, nas linhagens RBJ009 e RBJ011. Adaptado de [www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com).

Para o prosseguimento do trabalho, foi importante mostrar que as linhagens RBJ009 e RBJ011 não sofreram alterações fenotípicas de crescimento, motilidade e formação de biofilme, ou seja, mostrar que a fusão de *mNGr* não prejudicou as interações e a atividade de *DgcP* e outras eventuais proteínas parceiras. Primeiramente, foram realizadas curvas de crescimento com PA14 selvagem (WT, do inglês *wild type*), RBJ009 e RBJ011. A Figura 6 mostra que as três linhagens apresentam o mesmo padrão de crescimento, indicando que as fusões não atrapalham tal processo. Além disso, foi necessário realizar experimentos de motilidade e de formação de biofilme com o intuito de verificar se, apesar do crescimento normal em meio líquido, as células com *mNGr* ainda eram capazes de se movimentar normalmente e colonizar superfícies. A Figura 7 mostra os resultados referentes aos fenótipos de motilidade. Não foi possível perceber diferença significativa nos ensaios de *swimming*, *swarming* e *twitching* entre as linhagens WT,

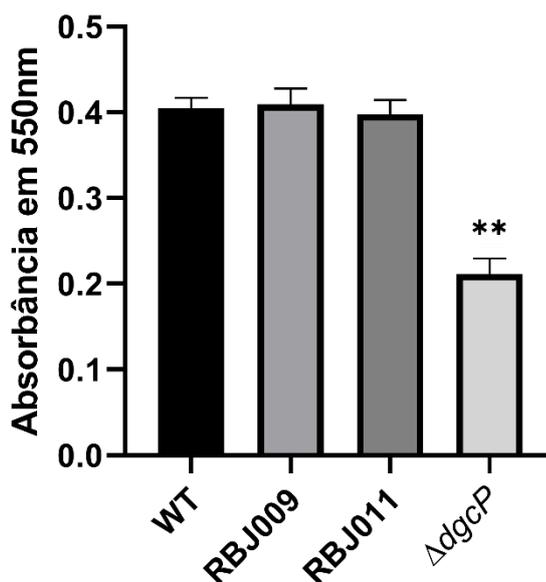
RBJ009 e RBJ011 nas condições dos experimentos. Os ensaios de motilidade evidenciaram que as fusões com mNGr parecem não interferir na função de DgcP, já que é notório que mutantes *dgcP* apresentam menor motilidade *twitching* e maior motilidade *swimming* quando comparados à linhagem selvagem (ARAGON *et al.*, 2015; NICASTRO *et al.*, 2020). No ensaio de *twitching*, a linhagem  $\Delta pilA$  foi usada como controle negativo, pois é incapaz de realizar tal motilidade (MATTICK; WHITCHURCH; ALM, 1996). Por fim, a produção de biofilme de RBJ009 e RBJ011 igualmente não foi alterada com a inserção de mNGr (Figura 8). Como controle adicional para o ensaio de biofilme, foi utilizada a linhagem  $\Delta dgcP$ . A Figura 8 mostra que somente a linhagem com a deleção apresentou menor formação de biofilme quando comparado à linhagem WT, em um comportamento já demonstrado em trabalho prévio do nosso grupo (NICASTRO *et al.*, 2020). Tais resultados indicam que a fusão entre mNGr e DgcP parece não interferir na atividade, função e interações da diguanilato ciclase em processos de crescimento, motilidade e adesão à superfície nas linhagens RBJ009 e RBJ011, permitindo assim a análise da localização da fusão por ensaios de microscopia de fluorescência.



**Figura 6.** O padrão de crescimento das linhagens WT, RBJ009 e RBJ011 é o mesmo em LB a 37°C. A densidade óptica em 600 nm (DO<sub>600</sub>) foi medida durante 20 horas em intervalos de 30 minutos.



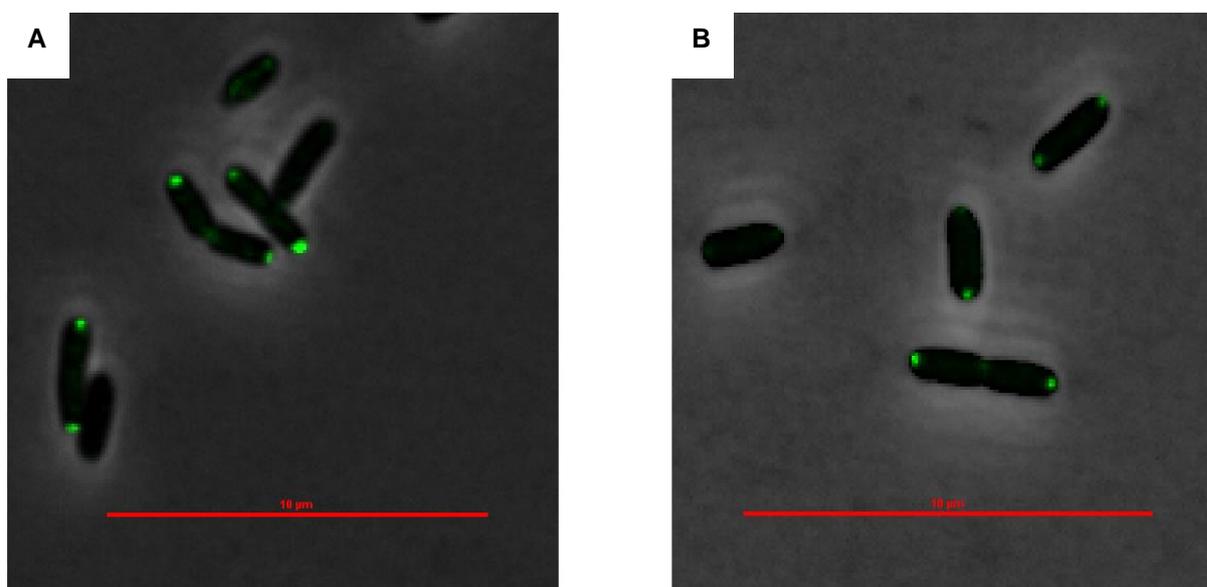
**Figura 7. Não há diferença nos fenótipos de motilidade entre a linhagem selvagem e as linhagens contendo as fusões.** (A) Motilidade *swimming* de PA14 WT em meio M9 0,3% ágar. (B) Média de triplicatas do diâmetro de *swimming* para cada linhagem. (C) Motilidade *swarming* de PA14 WT em meio M9 0,5% ágar. (D) Média de triplicatas da área de *swarming* para cada linhagem. (E) Motilidade *twitching* em LB 1% ágar. (F) Média das áreas de seis replicatas para cada linhagem. Para medida das áreas de *twitching*, as células foram coradas com cristal violeta. \*O controle negativo apresenta diferença significativa em relação à WT com  $p < 0,0001$ . Todas as medidas foram feitas no *software* ImageJ.



**Figura 8. As linhagens RBJ009 e RBJ011 não apresentam diferença na formação de biofilme quando comparadas à WT.** Os experimentos foram feitos em placas de poliestireno de 96 poços em oito replicatas para cada linhagem. Após o período de 24h, as células aderidas à placa foram coradas e o cristal violeta foi, então, solubilizado com ácido acético 30%. O gráfico mostra a média da absorbância do cristal violeta em 550nm com o respectivo desvio-padrão das replicatas. \*\* $\Delta dgcP$  apresenta diferença significativa em relação à WT com  $p < 0,001$ .

Os ensaios de microscopia de fluorescência mostraram que DgcP se localiza na linhagem RBJ011 de forma majoritariamente bipolar, quando as células são cultivadas em meio líquido (Figura 9A) ou quando cultivadas em meio sólido (Figura 9B). O cultivo em condições diferentes foi feito com o objetivo de verificar se o padrão de localização seria alterado caso as células estivessem previamente em estilos de vida diferentes (sésil vs planctônico). A técnica utilizada aqui não possibilitou verificar transições rápidas (0-300 segundos) na localização de DgcP-mNGr. Para isso, seriam necessários ensaios de microfluidica, em que uma célula eventualmente se adere a uma superfície e a localização proteica é acompanhada em tempo real por fluorescência. O método utilizado neste trabalho é capaz de verificar transições de localização que ocorram em tempo maiores que 5 minutos. Nossos resultados, entretanto, não mostraram que a localização de DgcP é alterada entre 5 min e 4h em

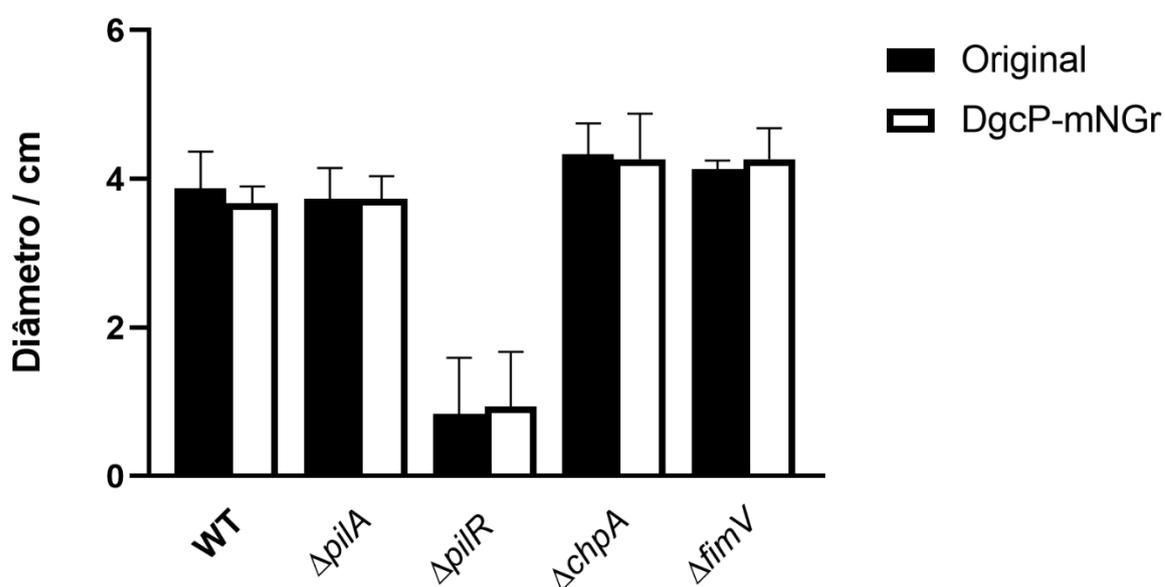
células cultivadas em M63 1,5% agarose. Além disso, os ensaios de microscopia de fluorescência não foram capazes de determinar a posição de mNGr-DgcP na linhagem RBJ009 devido a baixa fluorescência da fusão, indicando um possível problema com a estabilidade de mNGr na posição N-terminal, visto que a diguanilato ciclase parece estar funcional nessa linhagem.



**Figura 9. DgcP se localiza majoritariamente nos polos da linhagem RBJ011.** Comportamento ocorre quando cultivada em (A) meio líquido ou quando cultivada em (B) meio sólido por 3 horas. Mesmo as células cultivadas em meio líquido foram immobilizadas em meio sólido (M63 1,5% agarose) por 5 min. As imagens de microscopia de contraste de fase e de fluorescência foram sobrepostas no *software* NIS-Elements para melhor visualização. A escala (barra vermelha presente nas imagens) é de 10  $\mu$ m.

Nosso grupo já havia mostrado que DgcP se localiza nos polos em linhagens com superexpressão (NICASTRO *et al.*, 2020), o que foi confirmado aqui com a expressão direta do locus nativo de *dgcP* em PA14. Como a linhagem RBJ011 se comportou de forma semelhante aos resultados prévios obtidos por nosso grupo e devido aos problemas com a localização e intensidade da fusão mNGr-DgcP, a construção DgcP-mNGr foi escolhida para o prosseguimento do trabalho, com a inserção da fusão em mutantes de genes importantes para o funcionamento do T4P.

Com o objetivo de verificar se a localização de DgcP era dependente dos sistemas Pil-Chp e PilS-PilR, a fusão *dgcP\_mNGr* foi inserida nas linhagens  $\Delta pilA$ ,  $\Delta pilR$  e  $\Delta chpA$ , originando, respectivamente, as linhagens PA14\_ $\Delta pilA$  *dgcP\_mNGr* (RBJ052), PA14\_ $\Delta pilR$  *dgcP\_mNGr* (RBJ050) e PA14\_ $\Delta chpA$  *dgcP\_mNGr* (RBJ027). Além disso, com o intuito de confirmar a dependência de FimV na localização de DgcP, *dgcP\_mNGr* foi inserida em  $\Delta fimV$ , resultando na linhagem PA14\_ $\Delta fimV$  *dgcP\_mNGr* (RBJ051). Assim como foi feito anteriormente, ensaios de motilidade e formação de biofilme foram realizados para verificar se a inserção de mNGr não alterou os fenótipos originais. As Figuras 10, 11 e 12 mostram, respectivamente, os resultados dos ensaios de *swimming*, *swarming* e *twitching* para todas as linhagens. As linhagens originais foram agrupadas com as respectivas linhagens contendo DgcP-mNGr.



**Figura 10. Não há diferença na motilidade *swimming* entre as linhagens originais e as linhagens contendo a fusão DgcP-mNGr.** O gráfico mostra a média de triplicatas do diâmetro de *swimming* em meio M9 0,3% ágar para cada linhagem. Não há diferença significativa entre os pares (original x fusão) com  $p = 0,05$ .

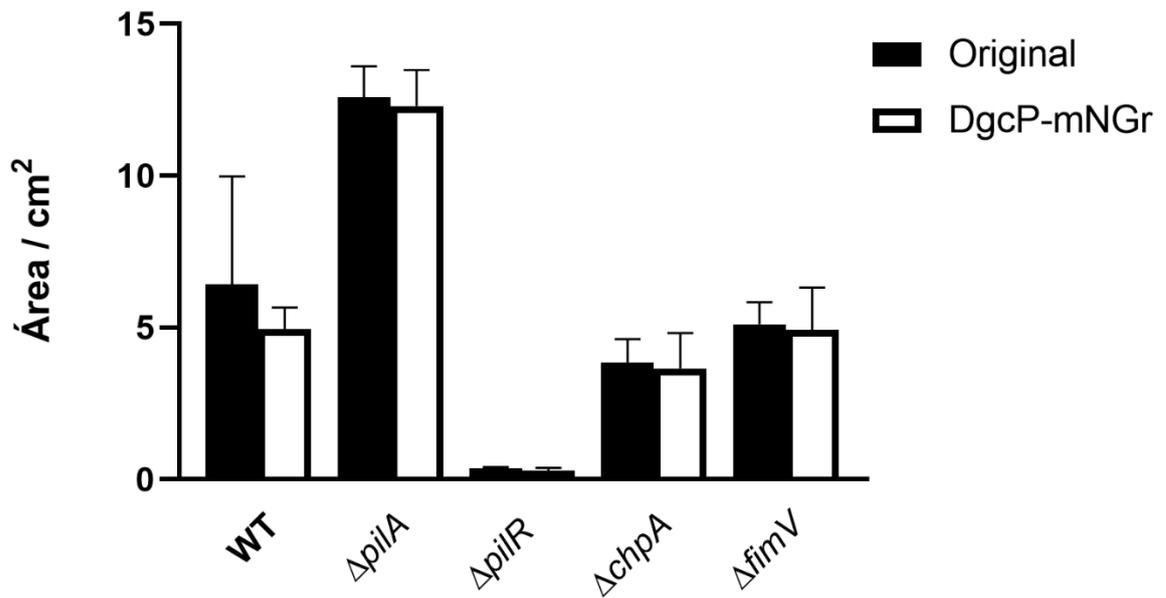


Figura 11. Não há diferença na motilidade *swarming* entre as linhagens originais e as linhagens contendo a fusão DgcP-mNGr. O gráfico mostra a média de triplicatas da área de *swarming* em meio M9 0,5% ágar para cada linhagem. Não há diferença significativa entre os pares (original x fusão) com  $p = 0,05$ .

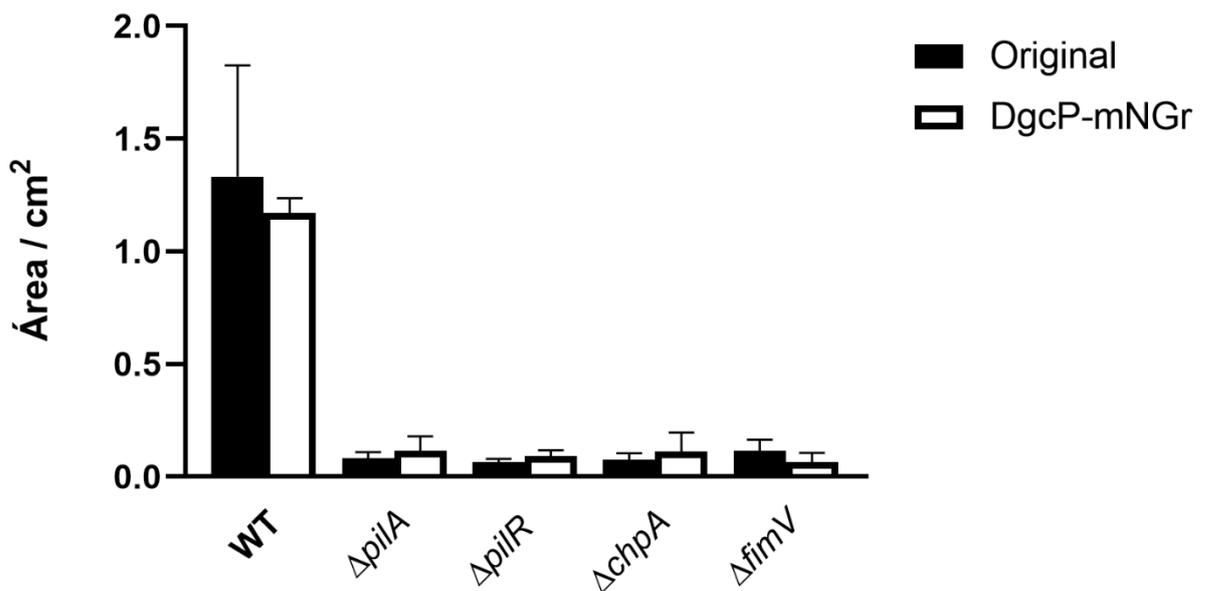
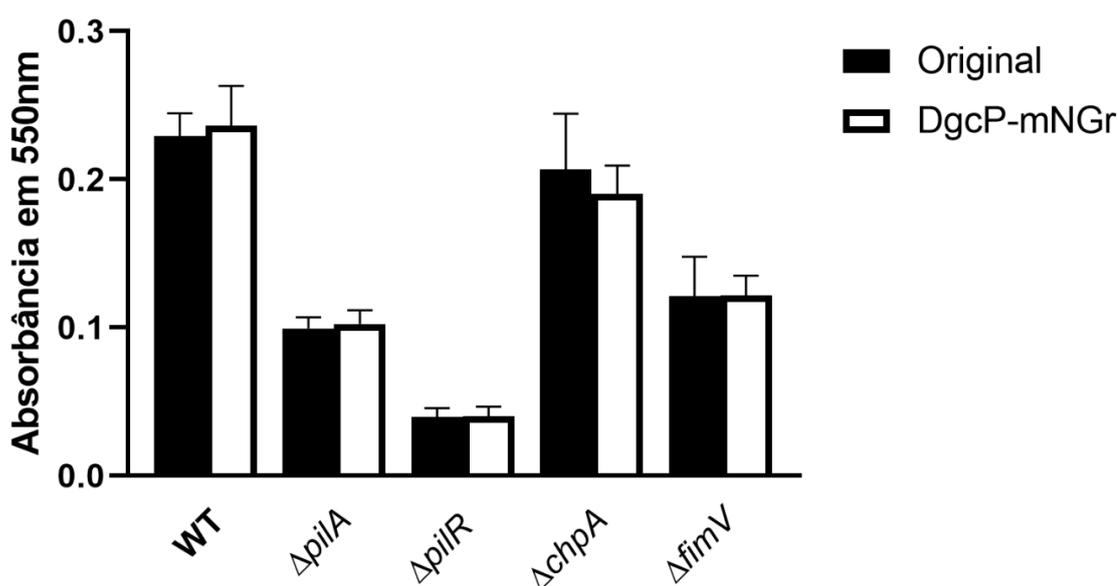


Figura 12. Não há diferença na motilidade *twitching* entre as linhagens originais e as linhagens contendo a fusão DgcP-mNGr. O gráfico mostra a média de seis replicatas da área de *twitching* em meio LB 1% ágar para cada linhagem. Não há diferença significativa entre os pares (original x fusão) com  $p = 0,05$ .

As diferenças de fenótipos de motilidade observadas entre a linhagem selvagem e as linhagens com deleção nas Figuras 10, 11 e 12 já haviam sido descritas na literatura para *P. aeruginosa* PAK e/ou PA01. Mutantes em *pilA*, *chpA* e *fimV* realizam *swimming* equiparavelmente à linhagem selvagem, já que esta motilidade não depende de T4P (BARKEN *et al.*, 2008; NICASTRO *et al.*, 2020). Mutantes *pilR* tem o *swimming* prejudicado devido à diminuição dos níveis de *fleSR*, genes regulados por PilR que controlam positivamente a expressão de genes flagelares (KILMURY; BURROWS, 2018). Além disso, já havia sido demonstrado que os mutantes em *pilA*, *pilR*, *chpA* e *fimV* são impossibilitados de realizar *twitching*, já que este depende diretamente do T4P funcional (KILMURY; BURROWS, 2018; LEECH; MATTICK, 2006; MATTICK; WHITCHURCH; ALM, 1996; SEMMLER *et al.*, 2000). Mutantes em *pilA* e *pilR*, aliás, apresentam comportamentos opostos em relação ao *swarming*, pois enquanto  $\Delta pilA$  tem motilidade aumentada,  $\Delta pilR$  tem o *swarming* diminuído em PA01 (KILMURY; BURROWS, 2018; SHROUT *et al.*, 2006). A deleção de *chpA*, por sua vez, não interfere nos fenótipos de *swarming* (LEECH; MATTICK, 2006), enquanto a deleção de *fimV* resulta em *swarming* aumentado em PA01. Dentre os resultados de motilidade, o comportamento de  $\Delta fimV$  no *swarming* foi o único que diferiu da literatura, o que pode ser devido à alta sensibilidade a mudanças de temperatura e umidade dos ensaios de *swarming*.

Assim como nos fenótipos de motilidade, a inserção da fusão não alterou a formação de biofilme nas linhagens  $\Delta pilA$ ,  $\Delta pilR$ ,  $\Delta chpA$  e  $\Delta fimV$  (Figura 13). Além disso, as linhagens mutantes se comportaram como esperado em relação à selvagem, pois previamente foi demonstrado que mutantes em *chpA* são capazes de formar biofilme em estruturas maduras (BARKEN *et al.*, 2008), enquanto os mutantes em *pilA*, *pilR* e *fimV* formam biofilme em menor extensão, em função do menor número

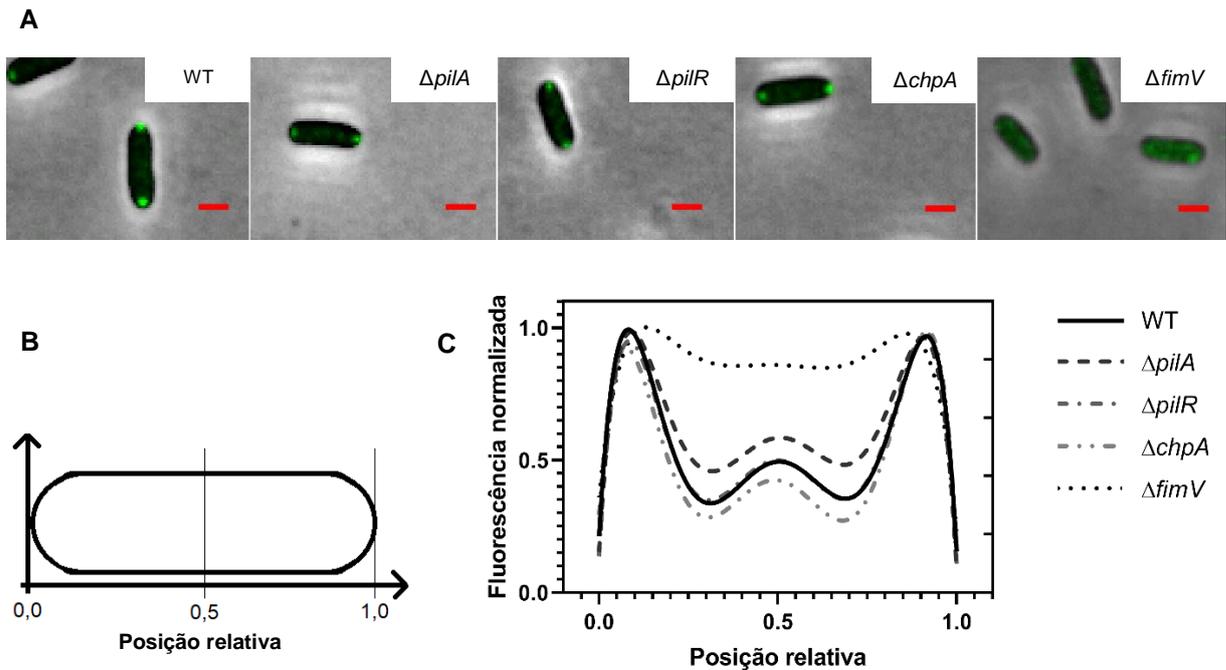
de pili ou por defeitos na montagem do T4P (BARKEN *et al.*, 2008; KILMURY; BURROWS, 2018; NICASTRO *et al.*, 2020; SEMMLER *et al.*, 2000). De qualquer forma, é interessante notar que a inserção da fusão DgcP-mNGr não provocou mudanças em fenótipos de motilidade e biofilme relativas às linhagens originais, demonstrando assim que a proteína DgcP com mNGr no C-terminal retém sua função e não altera funções relacionadas com os níveis de c-di-GMP.



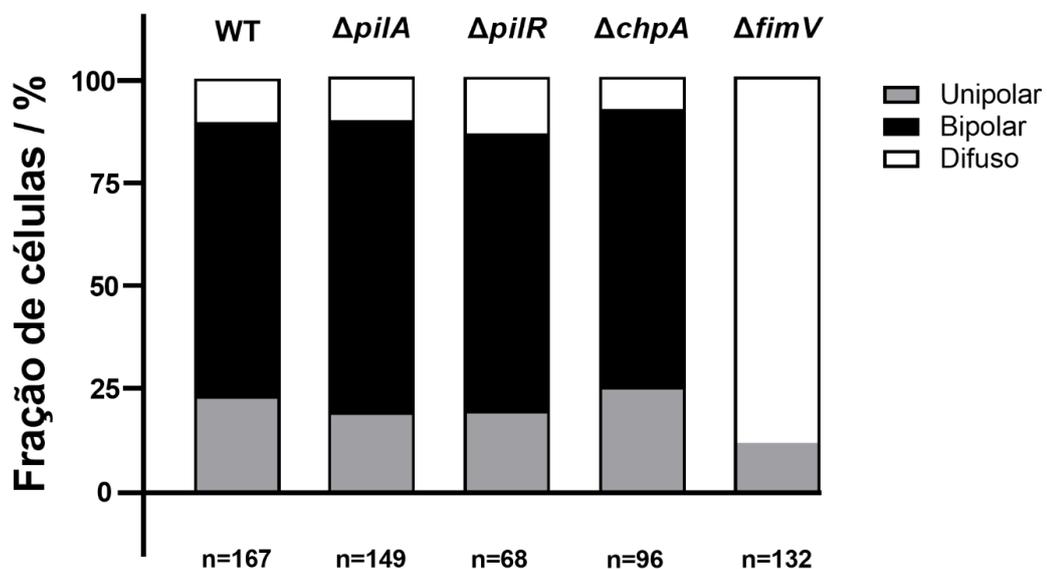
**Figura 13. As linhagens contendo a fusão DgcP-mNGr não apresentam diferença, em relação às linhagens originais, na formação de biofilme.** Os experimentos foram feitos em placas de poliestireno de 96 poços em oito replicatas para cada linhagem. O gráfico mostra a média da absorbância do cristal violeta em 550 nm com o respectivo desvio-padrão das replicatas. Não há diferença significativa entre os pares (original x fusão) com  $p = 0,05$ .

A confirmação de que as linhagens WT,  $\Delta pilA$ ,  $\Delta pilR$ ,  $\Delta chpA$  e  $\Delta fimV$  não sofreram alterações fenotípicas de motilidade e formação de biofilme pela inserção de mNGr em *dgcp* possibilitou o prosseguimento do trabalho e a verificação da localização de DgcP nos cinco *backgrounds* genéticos. A Figura 14A mostra a localização da fusão em cada linhagem. As Figuras A-1 a A-5 (no Apêndice) mostram a posição de DgcP-mNGr em um número maior de células por imagem. Todas as linhagens estão nomeadas de acordo com o *background* genético.

Como a localização da fusão não é homogênea na população, foi necessário quantificar a fluorescência em função da posição relativa de DgcP-mNGr na célula a partir de seu eixo longitudinal (Figura 14B). Com os dados obtidos, o padrão populacional médio de localização de DgcP nos diferentes *backgrounds* genéticos pôde ser calculado (Figura 14C). O padrão populacional mostrado na Figura 14C, entretanto, pode esconder um dado importante: a localização unipolar de DgcP, visto que o método aqui utilizado não diferenciou os polos 0 e 1 da célula de acordo com a intensidade de fluorescência. Em virtude disso, os dados contidos na Figura 14C tiveram de ser complementados a partir de um perfil populacional de localização das linhagens (Figura 15), pois ele mostra a fração de células em função do tipo de localização verificada: bipolar, unipolar ou difusa. O número de células analisadas na Figura 15 é menor, pois a análise foi feita com somente uma imagem de cada linhagem. Para construção da Figura 14C, porém, os dados contidos em várias imagens foram acumulados. Células com máximos de intensidade em locais incomuns, ou seja, fora dos polos, foram desconsideradas na Figura 15, pois representavam somente uma pequena parcela populacional, cerca de 1%, da linhagem RBJ051 ( $\Delta fimV$ ).



**Figura 14.** DgcP-mNGr está majoritariamente localizada nos polos das linhagens WT,  $\Delta pilA$ ,  $\Delta pilR$ ,  $\Delta chpA$ , porém, se encontra distribuída pela célula na linhagem  $\Delta fimV$ . (A) Localização de DgcP nos *backgrounds* WT,  $\Delta pilA$ ,  $\Delta pilR$ ,  $\Delta chpA$  e  $\Delta fimV$ . As imagens de microscopia de contraste de fase e de fluorescência foram sobrepostas no *software* NIS-Elements para melhor visualização. A escala presente nas imagens é de 1  $\mu$ m. (B) Para a quantificação da fluorescência, foi considerado somente o eixo longitudinal da célula, sendo os polos denominados 0 e 1. (C) Padrão populacional médio da localização de DgcP-mNGr. Para construção das curvas, o *software* MicrobeJ analisou a intensidade de fluorescência, ao longo do eixo longitudinal de 200-300 células de cada linhagem.



**Figura 15.** A localização bipolar de DgcP-mNGr depende de FimV, mas parece não necessitar dos sistemas Pil-Chp e PilS-PilR. Fração de células em função do tipo de localização de DgcP-mNGr. O perfil foi feito pelo *software* MicrobeJ com n = 68-167 células por linhagem.

As Figuras 14C e 15 mostram que a localização de DgcP-mNGr nos *backgrounds* WT,  $\Delta pilA$ ,  $\Delta pilR$  e  $\Delta chpA$  segue um padrão semelhante, predominantemente bipolar (67-71%). Nessas populações, também existem células com localização unipolar (18-25%) e com a proteína difusa (7-13%). A localização de DgcP-mNGr em  $\Delta fimV$ , por outro lado, apresenta um perfil diferente do restante das linhagens, com DgcP difusa em 88% das células. A falta de FimV afeta principalmente a localização bipolar de DgcP, comportamento ainda pouco claro para nós. Em suma, os resultados mostram que a localização da DGC não depende da funcionalidade dos sistemas Pil-Chp e PilS-PilR, ou seja, mesmo não havendo o aumento da expressão dos genes do pilus na regulação dependente de cAMP, ou não existindo filamento polimérico na maquinaria do T4P (como nas linhagens  $\Delta pilA$  e  $\Delta pilR$ ), DgcP ainda é capaz de se localizar, majoritariamente, nos polos da célula. Nosso grupo já havia demonstrado, em ensaios de superexpressão, que DgcP se mantém nos polos com a ajuda da proteína FimV (NICASTRO *et al.*, 2020), comportamento confirmado neste trabalho com a expressão de *dgcp\_mNGr* do locus cromossômico de *dgcp*.

Talvez o papel de DgcP na sinalização local esteja ligado a um efetor polar ainda não identificado que esteja interagindo com FimV, ou outra proteína da maquinaria do pilus, e cuja atividade dependa do c-di-GMP gerado no polo. Proteínas com domínios de ligação a c-di-GMP com localização polar e que participam da biossíntese do T4P são, portanto, potenciais candidatas a efetores.

A comparação entre os padrões de localização é importante para descobrir quais os efetores podem estar recebendo o c-di-GMP sintetizado por DgcP no polo. A variação populacional na localização também é observada em outras proteínas polares que participam da adesão à superfície e motilidade *twitching* (JAIN; SLIUSARENKO; KAZMIERCZAK, 2017; LAVENTIE *et al.*, 2019). A proteína FimX, já

mencionada neste trabalho, é uma proteína com domínios GGDEF/EAL degenerados, capaz de ligar c-di-GMP pelo domínio EAL (KAZMIERCZAK; LEBRON; MURRAY, 2006; NAVARRO *et al.*, 2009). FimX é necessária para a localização da ATPase PilB no polo, promovendo assim a montagem do T4P. Essa interação só ocorre, entretanto, quando FimX está apta a ligar c-di-GMP, com domínio EAL intacto (JAIN; SLIUSARENKO; KAZMIERCZAK, 2017). Células de *P. aeruginosa* PA103 em movimento de *twitching* apresentam FimX com localização unipolar em 78% das células, enquanto células estacionárias apresentam FimX nos dois polos celulares em 81% da população (JAIN; SLIUSARENKO; KAZMIERCZAK, 2017). O padrão de localização de FimX, porém, é alterado em mutantes *pilR* e *chpA*, nos quais FimX aparece majoritariamente difusa (JAIN; SLIUSARENKO; KAZMIERCZAK, 2017). Tais observações sugerem que DgcP e FimX são recrutadas para os polos de maneiras diferentes na célula, possivelmente não interagindo de forma direta. Entretanto, DgcP ainda pode estar fornecendo c-di-GMP à FimX quando co-localizadas. Ensaios de microscopia de fluorescência com células em movimento, para verificar a localização de DgcP nessa condição, e ensaios que permitam visualizar a localização de FimX e DgcP simultaneamente podem elucidar a dependência de função entre as duas proteínas.

Além de FimX, FimW é outra proteína capaz de se ligar a c-di-GMP com localização predominantemente bipolar em condições de menor motilidade. Sua alta afinidade na ligação ao segundo mensageiro ( $K_d = 50 \pm 3$  nM), por um domínio PilZ atípico, determina a localização no polo (LAVENTIE *et al.*, 2019). FimW é uma proteína que participa da montagem do T4P, não é importante para o *twitching*, mas é essencial para a adesão inicial a superfícies (LAVENTIE *et al.*, 2019). A localização de FimW, no entanto, é dirigida pela ação flagelar e não depende do T4P. Laventie *et*

*al.* propuseram que de maneira similar ao que ocorre em *C. crescentus* (CHRISTEN, M. *et al.*, 2010), a divisão celular de *P. aeruginosa*, em uma superfície, é assimétrica em relação aos níveis de c-di-GMP. Quando uma célula planctônica encontra a superfície, os níveis de c-di-GMP aumentam e FimW se localiza de forma bipolar. No polo flagelar, porém, a fosfodiesterase DipA diminui os níveis do segundo mensageiro, desativando e deslocalizando FimW (LAVENTIE *et al.*, 2019). A divisão dessa célula, portanto, gera uma célula capaz de colonizar a superfície (com FimW ativa) e outra capaz de se soltar e colonizar locais distantes. Apesar de não ser considerada uma potencial candidata (LAVENTIE *et al.*, 2019), DgcP pode ser a diguanilato ciclase que fornece c-di-GMP continuamente à FimW. Por estar majoritariamente localizada nos dois polos, DgcP pode receber um sinal ainda desconhecido e começar a produção local do segundo mensageiro, mantendo FimW no polo e possibilitando a transição planctônico-séssil.

Como já mencionado, a relação de função entre FimX, FimW ou outros potenciais parceiros de DgcP no polo, pode estar ocorrendo por interação direta com FimV e, conseqüentemente, por proximidade com DgcP. Apesar da baixa similaridade de sequência, FimV apresenta semelhança de domínios com HubP, proteína polar presente em *Vibrio cholerae* e *Shewanella putrefaciens* (ROSSMANN *et al.*, 2019; YAMAICHI *et al.*, 2012), cuja função está relacionada com a segregação do cromossomo. HubP e FimV possuem um domínio periplasmático N-terminal, que as mantém no polo, e regiões citoplasmáticas C-terminais que interagem com outras proteínas. HubP de *S. putrefaciens* recruta para o polo flagelar a PDE *dual domain* PdeB via domínio GGDEF, em um comportamento similar ao recrutamento de DgcP (NICASTRO *et al.*, 2020; ROSSMANN *et al.*, 2019). É razoável pensar, portanto, que

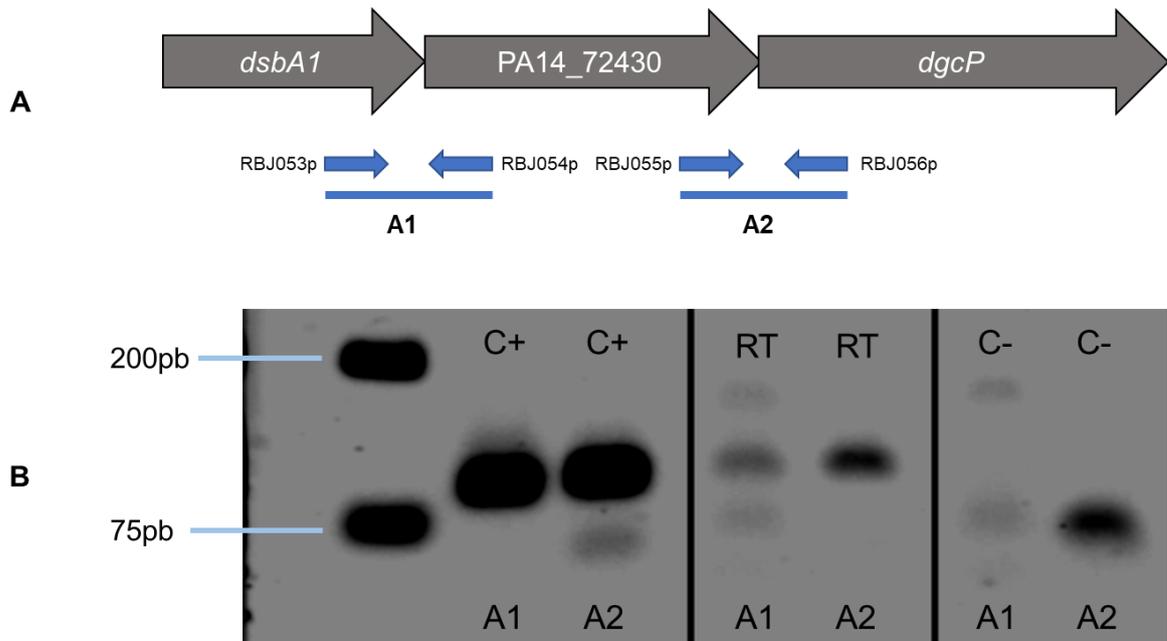
possa existir um comportamento análogo entre FimV e outras proteínas em *P. aeruginosa* que possuem domínios de ligação a c-di-GMP, como FimX e FimW.

#### 4.2. Estudo da organização gênica de DgcP

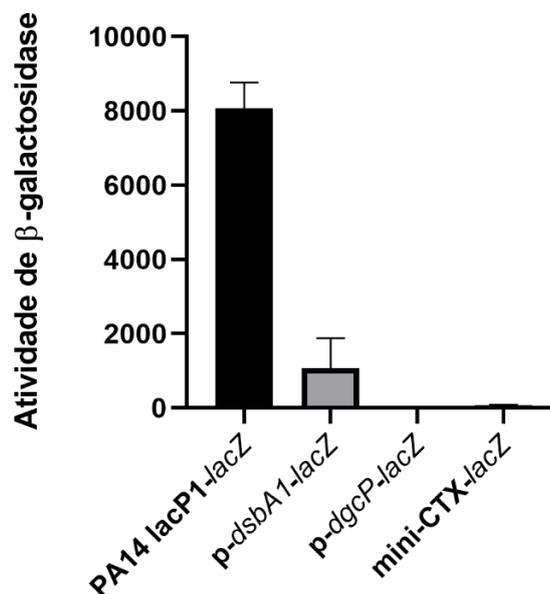
Para compreender o papel de DgcP em *P. aeruginosa* não basta somente verificar a localização proteica, também é necessário conhecer a organização e a expressão de seu gene. O gene *dgcP*, ou PA14\_72420, está localizado a jusante de outros dois genes: PA14\_72430 e *dsbA1* (Figura 16A), de modo que se acredita, por previsão de análises de sequência (MAO *et al.*, 2009), que o mesmo se encontra em um operon em PA14. Aragon *et al.* já demonstraram, por ensaios de RT-PCR (do inglês, *reverse transcription polymerase chain reaction*), a existência do operon na linhagem *P. aeruginosa* PAK, porém, tal fato ainda não foi confirmado em PA14. Diante disso, ensaios de RT-PCR foram realizados com a intenção de verificar se *dgcP* é co-transcrito com PA14\_72430 e *dsbA1* na linhagem PA14.

A Figura 16B mostra os fragmentos amplificados (ou amplicons) obtidos a partir dos controles e das amostras de DNA complementar (cDNA) sintetizado do RNA total extraído de PA14. Neste caso, o cDNA foi feito com um oligonucleotídeo específico (RBJ056p – Figura 16A) para obtenção de maior enriquecimento do fragmento desejado, visto que a reação com oligonucleotídeos randômicos não gerou uma quantidade de cDNA específico que pudesse ser detectada pelo método empregado. É possível perceber na Figura 16B que os fragmentos de tamanho esperado para um transcrito único foram amplificados no controle positivo e nas amostras de cDNA, mas não foram amplificados no controle negativo. Os ensaios de RT-PCR revelaram, portanto, que *dsbA1*, PA14\_72430 e *dgcP* se encontram em operon na linhagem PA14.

Com o propósito de confirmar os dados obtidos nos ensaios de RT-PCR e, ao mesmo tempo, verificar a possível existência de promotor interno para *dgcP*, linhagens repórteres foram construídas com fusões entre *lacZ* e supostas regiões promotoras a montante de *dgcP* e de *dsbA1* (p-*dgcP* e p-*dsbA1*, respectivamente) para, então, verificar a produção de beta-galactosidase sob o controle dessas regiões em culturas em meio líquido. A construção das linhagens foi realizada a partir do vetor mini-CTX-*lacZ*, que se integra no cromossomo de *P. aeruginosa* no sítio *att* (HOANG, Tung T. *et al.*, 2000). A linhagem RBJ034, PA14 com mini-CTX-*lacZ* no cromossomo, foi usada como controle negativo nos experimentos e, como controle positivo, foi utilizada a linhagem PA14 mini-CTX-*lacP1-lacZ* (FULCHER *et al.*, 2010). A Figura 17 mostra o resultado dos ensaios de atividade de beta-galactosidase. As linhagens repórteres RBJ030 e RBJ031, as quais continham, na devida ordem, p-*dsbA1* e p-*dgcP* fusionadas ao gene *lacZ* apresentaram comportamentos diferentes nos ensaios: somente p-*dsbA1* apresentou atividade promotora. Assim sendo, o resultado sugeriu a não existência de promotor interno para *dgcP* e, conseqüentemente, confirmou o que foi verificado nos ensaios de RT-PCR. Além disso, os valores absolutos para a atividade do repórter sugerem que a expressão endógena do operon é relativamente baixa nas condições do ensaio, comparando-se ao promotor forte *lacP1* utilizado como controle.



**Figura 16. *dgcP* se encontra em operon com *dsbA1* e *PA14\_72430* em *P.aeruginosa* PA14 .** (A) Organização gênica prevista para o operon em PA14. As setas cinzas representam os genes com suas respectivas orientações e as setas azuis ilustram os oligonucleotídeos usados para a amplificação dos fragmentos A1 e A2 (barras azuis) com, respectivamente, 99 e 103 pares de bases (pb). (B) Eletroforese em gel de agarose 1,5% com os amplicons obtidos. C+ é referente à amplificação utilizando DNA genômico de PA14 como molde (controle positivo), C- é referente à amplificação utilizando RNA (controle negativo) e RT é referente à amplificação utilizando cDNA, sintetizado a partir de amostras de RNA total de PA14. O oligonucleotídeo RBJ056p foi utilizado para a síntese do cDNA. O marcador de peso molecular utilizado foi o Gene Ruler 1kb Plus DNA Ladder. As bandas presentes em C- são referentes a dímeros de oligonucleotídeos ou amplicons inespecíficos.



**Figura 17. Somente a região a montante de *dsbA1* apresenta atividade promotora nas condições testadas.** Os experimentos foram realizados a partir de culturas em crescimento exponencial em meio LB ( $DO_{600}$  entre 0,6 e 0,8). Os valores de atividade estão representados em U, calculados de acordo com a seção 3.9. deste trabalho.

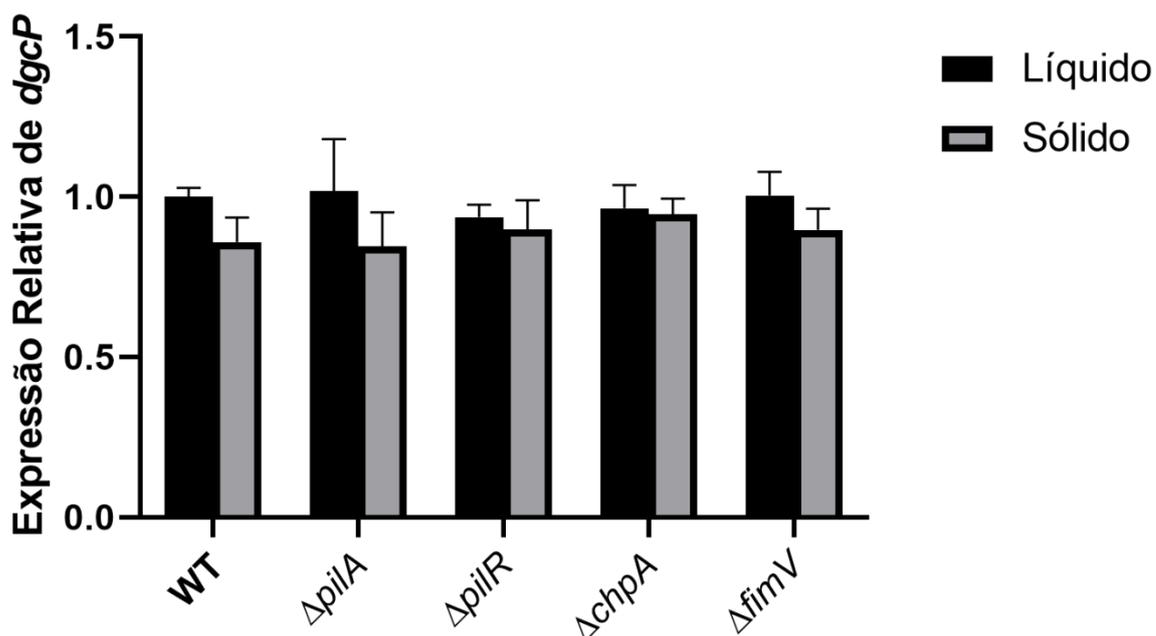
Análises de sequência já haviam mostrado que *dgcP* é altamente conservado entre diversas espécies de *Pseudomonas*, especialmente em conjunto com PA14\_72430 e *dsbA1* (WEI *et al.*, 2019), indicando que os três genes devem atuar juntos em processos celulares específicos. O mecanismo de ação conjunta de DgcP, PA14\_72430 e DsbA1, contudo, ainda não é conhecido. Como já mencionado, DgcP é uma diguanilato ciclase cuja função está relacionada com o aumento da formação de biofilme e motilidade *twitching* (ARAGON *et al.*, 2015; NICASTRO *et al.*, 2020; WEI *et al.*, 2019). Entretanto, PA14\_72430 é uma proteína hipotética com função ainda indefinida, ao passo que DsbA é uma enzima periplasmática com atividade de tiol:dissulfeto-oxidoreductase, cuja função é catalisar a formação de ligações de dissulfeto e participar do dobramento de proteínas (HA, U. H.; WANG; JIN, 2003). DsbA também é importante para motilidade *twitching*, de modo que mutantes *dsbA* em *P. aeruginosa* PA103 são incapazes de realizar tal motilidade, devido a uma provável dificuldade de retrair o pilus (HA, U. H.; WANG; JIN, 2003). Além disso, a expressão de *pilA* em mutantes *dsbA* é menor do que na linhagem selvagem, evidenciando que a enzima tem função ligada ao T4P (HA, U. H.; WANG; JIN, 2003). Esses resultados indicam que o operon em questão pode estar atuando diretamente na biossíntese/função do T4P, porém, ainda de maneira desconhecida.

#### 4.3. Estudo da expressão gênica de DgcP

Como DgcP e DsbA1 participam de processos que envolvem o T4P, é válido supor que a expressão do operon pode estar aumentada em condições de menor motilidade e adesão inicial à superfície. Ademais, mesmo sem mudanças na localização de DgcP-mNGr, a expressão gênica talvez esteja sendo alterada em mutantes do sistema Pil-Chp e PilS-PilR, ou ainda na linhagem  $\Delta fimV$ . Com o objetivo de elucidar, ao menos parcialmente, fatores que interferem na expressão do operon

de *dgcP*, foram realizados ensaios de expressão por qRT-PCR (do inglês *quantitative real-time polymerase chain reaction*).

As linhagens WT,  $\Delta pilA$ ,  $\Delta pilR$ ,  $\Delta chpA$  e  $\Delta fimV$  foram comparadas, em função da expressão relativa de *dgcP*, em condições de crescimento distintas. A expressão gênica foi verificada em células em fase exponencial ( $DO_{600} = 1,0$ ) cultivadas em meio líquido e em células retiradas do meio líquido e, posteriormente, cultivadas em meio sólido por uma hora. Essa última condição é ideal para verificar mudanças relacionadas à adaptação da bactéria ao meio sólido, ou seja, à adesão inicial. A Figura 18 mostra a expressão relativa de *dgcP*, em meio líquido e sólido, nas cinco linhagens testadas.



**Figura 18. A expressão de *dgcP* é invariável em células de PA14 cultivadas em meio sólido ou meio líquido.** Resultado de qRT-PCR de *dgcP* em células cultivadas em meio líquido ou meio sólido. O gráfico mostra as médias de triplicatas técnicas do ensaio. As barras de erro representam o desvio-padrão da média.

A expressão de *dgcP* é invariável em todas as condições testadas, ou seja, não depende dos sistemas Pil-Chp e PilS-PilR, de FimV, ou ainda da forma de cultivo

(Figura 18). Wei *et al.* demonstraram, por meta-análises de transcriptoma de *P. aeruginosa*, que os níveis de transcrição de *dgcP* não mudam em 162 condições distintas (incluindo diferentes temperaturas, meios de cultura, tratamento com antibióticos e estresses oxidativos). Ademais, Wei *et al.* mostraram por ensaios de expressão de *gfp* fusionado ao promotor do operon de *dgcP* que a transcrição em *P. aeruginosa* PA01 não apresenta diferenças significativas no tratamento com carbenecilina, presença de 10mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ou ainda em diferentes meios de cultura. Além disso, foi demonstrado no mesmo trabalho que a expressão de *dgcP* não é alterada em mutantes para reguladores transcricionais envolvidos na síntese da adesina CdrA, importante para formação da matriz extracelular do biofilme (BORLEE *et al.*, 2010), ou ainda em reguladores envolvidos em *quorum-sensing*, processo de regulação da expressão de alguns genes pela mudança na densidade de células (STRATEVA; MITOV, 2011). Tais resultados sugerem que a expressão de DgcP no nível transcricional é invariável em *P. aeruginosa*, inclusive em condições de baixa motilidade.

#### 4.4. Considerações finais

A complexidade da sinalização dependente de c-di-GMP em *P. aeruginosa* impede conclusões precipitadas da função de DgcP na célula. Neste trabalho, a localização proteica, organização e expressão gênica de DgcP foram investigadas. A expressão de *dgcP* foi invariável nas condições aqui testadas e a localização da fusão DgcP-mNGr, predominantemente bipolar, somente foi alterada na linhagem  $\Delta fimV$ , como previamente descrito (NICASTRO *et al.*, 2020).

Dado que *dgcP* é um gene com expressão invariável, o papel celular de DgcP pode estar associado à geração constante de c-di-GMP nos polos pela interação com FimV, permitindo assim a ativação de vias e processos locais. DgcP pode estar

fornecendo c-di-GMP a importantes proteínas relacionadas com a biossíntese do T4P. Conforme já discutido anteriormente, a maquinaria flagelar é responsável pela localização polar de FimW, uma proteína relevante para adesão inicial de *P. aeruginosa* à superfície (LAVENTIE *et al.*, 2019). Entretanto, Laventie *et al.* mostraram que as DGCs candidatas ao fornecimento de c-di-GMP para FimW são GcbA e SiaD, visto que mutantes em *gcbA* e *siaD* apresentam FimW menos localizada nos polos (LAVENTIE *et al.*, 2019). Tal comportamento, porém, não exclui a participação de DgcP na localização de FimW, uma vez que pode estar atuando após a proteína chegar ao polo, provendo o c-di-GMP que a mantém localizada.

Os fenótipos de menor motilidade são causados pela ação conjunta de muitas DGCs. SadC, proteína já mencionada neste trabalho, é uma DGC associada à membrana que controla a mudança entre estilos planctônico e sésil (MERRITT *et al.*, 2007, 2010). Recentemente, foi proposto que, após o contato, células planctônicas se aderem permanentemente à superfície pelo aumento da atividade de SadC (WEBSTER *et al.*, 2021). Webster *et al.* demonstraram que SadC tem sua atividade de DGC reduzida pela interação com a proteína da maquinaria do pilus PilO. A atividade de SadC só é aumentada após o contato com a superfície e a interação com a proteína da maquinaria flagelar MotC, comportamento demonstrado em outro trabalho do mesmo grupo (BAKER *et al.*, 2019). Webster *et al.* propõem, então, que mediante o contato com a superfície, provido pela maquinaria flagelar, a produção do T4P aumentaria a partir da atividade de SadC. O trabalho, contudo, não discute qual seria a DGC responsável pelo fornecimento do c-di-GMP necessário para ativação de FimX, montagem da maquinaria do T4P e a consequente localização de PilO. Uma suposição válida é que DgcP possa ser uma das DGCs responsáveis pela ativação de FimX.

As possíveis relações de função com FimX e FimW exigem que DgcP forneça constantemente c-di-GMP nos polos, mesmo em condições de baixa concentração do segundo mensageiro. Deste modo, os efetores ainda poderiam receber o sinal e exercer suas respectivas funções, que resultam na montagem do T4P e no aumento da adesão inicial. O sistema de dois componentes GacS/GacA, cuja função se relaciona à formação de biofilme e sessilidade em *P. aeruginosa* (MOSCOSO *et al.*, 2014), inibe indiretamente a expressão de inúmeros genes, entre eles *sadC* (BRENCIC; LORY, 2009). A expressão de *dgcP*, porém, não é alterada pelo sistema (BRENCIC; LORY, 2009). Nossos resultados também mostraram que a expressão de *dgcP* não muda em condições de baixa e alta mobilidade e a localização celular característica de DgcP somente desaparece na falta de seu parceiro de interação, FimV. Tais observações indicam que DgcP pode ser a DGC que mantém a produção de c-di-GMP constante nos polos ao se associar a FimV.

Para confirmar o papel conjunto de DgcP, FimX e FimW, contudo, seriam necessários ensaios que possibilitassem visualizar a co-localização dessas proteínas, principalmente, nos estágios iniciais da adesão, e se o comportamento seria alterado na falta de DgcP. Além disso, seria interessante investigar as relações de interação entre FimX, FimW, FimV e outras proteínas da maquinaria do T4P, visto que podem ajudar a elucidar o papel celular de DgcP.

## 5. Conclusões

- A localização de DgcP não depende dos sistemas Pil-Chp e PilS-PilR. Assim como verificado no *background* WT, a fusão DgcP-mNGr, expressa do locus cromossômico de *dgcP*, apresenta-se localizada nos polos de maneira predominantemente bipolar em linhagens  $\Delta pilA$ ,  $\Delta pilR$  e  $\Delta chpA$ .
- O comportamento na linhagem  $\Delta fimV$ , entretanto, é diferente, pois a fusão DgcP-mNGr se encontra majoritariamente difusa. Os resultados aqui apresentados, com a expressão a partir do locus cromossômico de *dgcP*, reafirmam o comportamento já verificado por ensaios de superexpressão utilizando o vetor pJN105, descartando um possível artefato de localização devido à superexpressão.
- O gene *dgcP* se encontra em operon com PA14\_72430 e *dsbA1*, indicando um papel celular conjunto, até o momento, desconhecido.
- Os níveis de mRNA de *dgcP* são invariáveis nas linhagens WT,  $\Delta pilA$ ,  $\Delta pilR$ ,  $\Delta chpA$  e  $\Delta fimV$ , independentemente se cultivadas em meio líquido ou se cultivadas em meio sólido.

## 6. Referências Bibliográficas

ARAGON, Isabel M. *et al.* Diguanylate cyclase DgcP is involved in plant and human *Pseudomonas spp.* infections. **Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 17, n. 11, p. 4332–4351, 2015.

AUSUBEL, Frederick M. *et al.* (org.). **Current Protocols in Molecular Biology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2001.

AYERS, M. *et al.* PilM/N/O/P Proteins Form an Inner Membrane Complex That Affects the Stability of the *Pseudomonas aeruginosa* Type IV Pilus Secretin. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 394, n. 1, p. 128–142, 2009.

BAKER, Amy E. *et al.* Flagellar Stators Stimulate c-di-GMP Production by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 201, n. 18, p. 4–5, 2019.

BARREN, Kim B. *et al.* Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 10, n. 9, p. 2331–2343, 2008.

BELETE, Belen; LU, Haiping; WOZNIAK, Daniel J. *Pseudomonas aeruginosa* AlgR Regulates Type IV Pilus Biosynthesis by Activating Transcription of the *fimU-pilVWXYZ1Y2E* Operon. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 190, n. 6, p. 2023–2030, 2008.

BERTRAND, Jacob J; WEST, Joyce T; ENGEL, Joanne N. Genetic Analysis of the Regulation of Type IV Pilus Function by the Chp Chemosensory System of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 192, n. 4, p. 994–1010, 2010.

BOEHM, Alex *et al.* Second Messenger-Mediated Adjustment of Bacterial Swimming Velocity. **Cell**, [s. l.], v. 141, n. 1, p. 107–116, 2010.

BORLEE, Bradley R. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 75, n. 4, p. 827–842, 2010.

BRENCIC, Anja; LORY, Stephen. Determination of the regulon and identification of novel mRNA targets of *Pseudomonas aeruginosa* RsmA. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 72, n. 3, p. 612–632, 2009.

BURROWS, Lori L. *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: Type IV Pili in Action. **Annual Review of Microbiology**, [s. l.], v. 66, n. 1, p. 493–520, 2012.

CHAN, Carmen *et al.* Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 101, n. 49, p. 17084–17089, 2004.

CHATTERJEE, Debashree *et al.* Mechanistic insight into the conserved allosteric regulation of periplasmic proteolysis by the signaling molecule cyclic-di-GMP. **eLife**,

[s. l.], v. 3, p. 1–29, 2014.

CHRISTEN, Beat *et al.* Allosteric Control of Cyclic di-GMP Signaling. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 281, n. 42, p. 32015–32024, 2006.

CHRISTEN, M. *et al.* Asymmetrical Distribution of the Second Messenger c-di-GMP upon Bacterial Cell Division. **Science**, [s. l.], v. 328, n. 5983, p. 1295–1297, 2010.

CLAUDINE, Baraquet; HARWOOD, Caroline S. Cyclic diguanosine monophosphate represses bacterial flagella synthesis by interacting with the Walker a motif of the enhancer-binding protein FleQ. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 110, n. 46, p. 18478–18483, 2013.

CRAIG, Lisa; FOREST, Katrina T.; MAIER, Berenike. Type IV pili: dynamics, biophysics and functional consequences. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 17, n. 7, p. 429–440, 2019.

CRAMER, Nina *et al.* Microevolution of the major common *Pseudomonas aeruginosa* clones C and PA14 in cystic fibrosis lungs. **Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 13, n. 7, p. 1690–1704, 2011.

DARZINS, A. The *pilG* gene product, required for *Pseudomonas aeruginosa* pilus production and twitching motility, is homologous to the enteric, single-domain response regulator CheY. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 175, n. 18, p. 5934–5944, 1993.

DE OLIVEIRA PEREIRA, Thays. **Regulação da expressão de pioverdina dependente de contato em *Pseudomonas aeruginosa***. 2018. Universidade de São Paulo, [s. l.], 2018.

DOW, J. Maxwell *et al.* The HD-GYP domain, cyclic Di-GMP signaling, and bacterial virulence to plants. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, [s. l.], v. 19, n. 12, p. 1378–1384, 2006.

DUCRET, Adrien; QUARDOKUS, Ellen M.; BRUN, Yves V. MicrobeJ, a tool for high throughput bacterial cell detection and quantitative analysis. **Nature Microbiology**, [s. l.], v. 1, n. 7, p. 1–7, 2016.

ELBING, Karen; BRENT, Roger. Media Preparation and Bacteriological Tools. **Current Protocols in Molecular Biology**, [s. l.], v. 59, n. 1, p. 219–226, 2002.

FANG, Xin; GOMELSKY, Mark. A post-translational, c-di-GMP-dependent mechanism regulating flagellar motility. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 76, n. 5, p. 1295–1305, 2010.

FARINHA, M. A. *et al.* Alteration of the pilin adhesin of *Pseudomonas aeruginosa* PAO results in normal pilus biogenesis but a loss of adherence to human pneumocyte cells and decreased virulence in mice. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 62, n. 10, p. 4118–4123, 1994.

FILLOUX, Alain; WALKER, John M. **Pseudomonas Methods and Protocols**. New

York, NY: Springer New York, 2014.

FRANCIS, Vanessa I.; STEVENSON, Emma C.; PORTER, Steven L. Two-component systems required for virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS Microbiology Letters**, [s. l.], v. 364, n. 11, 2017.

FULCHER, Nanette B. *et al.* The *Pseudomonas aeruginosa* Chp chemosensory system regulates intracellular cAMP levels by modulating adenylate cyclase activity. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 76, n. 4, p. 889–904, 2010.

GALPERIN, Michael Y. Structural classification of bacterial response regulators: Diversity of output domains and domain combinations. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 188, n. 12, p. 4169–4182, 2006.

GRAHAM, Katherine J.; BURROWS, Lori L. More than a Feeling: Microscopy Approaches to Understanding Surface-Sensing Mechanisms. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 203, n. 6, p. 1–11, 2021.

GREEN, S K *et al.* Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied microbiology**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 987–991, 1974.

HA, Dae-Gon; O'TOOLE, George A. c-di-GMP and its Effects on Biofilm Formation and Dispersion: a *Pseudomonas Aeruginosa* Review. **Microbiology Spectrum**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 1–12, 2015.

HA, Un Hwan; WANG, Yanping; JIN, Shouguang. DsbA of *Pseudomonas aeruginosa* Is Essential for Multiple Virulence Factors. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 71, n. 3, p. 1590–1595, 2003.

HEINIGER, Ryan W. *et al.* Infection of human mucosal tissue by *Pseudomonas aeruginosa* requires sequential and mutually dependent virulence factors and a novel pilus-associated adhesin. **Cellular Microbiology**, [s. l.], v. 12, n. 8, p. 1158–1173, 2010.

HENGGE, Regine. High-Specificity Local and Global c-di-GMP Signaling. **Trends in Microbiology**, [s. l.], p. 1–11, 2021.

HENGGE, Regine. Trigger phosphodiesterases as a novel class of c-di-GMP effector proteins. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, [s. l.], v. 371, n. 1707, 2016.

HERNANDEZ-MONTELONGO, Jacobo *et al.* Antibacterial effect of hyaluronan/chitosan nanofilm in the initial adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* wild type, and IV pili and LPS mutant strains. **Surfaces and Interfaces**, [s. l.], 2021.

HICKMAN, Jason W.; HARWOOD, Caroline S. Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 69, n. 2, p. 376–389, 2008.

HIDRON, Alicia I. *et al.* Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With

Healthcare-Associated Infections: Annual Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, [s. l.], v. 29, n. 11, p. 996–1011, 2008.

HMELO, Laura R *et al.* Precision-engineering the *Pseudomonas aeruginosa* genome with two-step allelic exchange. **Nature Protocols**, [s. l.], v. 10, n. 11, p. 1820–1841, 2015.

HOANG, T T *et al.* 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**, [s. l.], v. 212, n. 1, p. 77–86, 1998.

HOANG, Tung T. *et al.* Integration-Proficient Plasmids for *Pseudomonas aeruginosa*: Site-Specific Integration and Use for Engineering of Reporter and Expression Strains. **Plasmid**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 59–72, 2000.

HORCAJADA, Juan P. *et al.* Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 32, n. 4, 2019.

HOSTETTLER, Lola *et al.* The Bright Fluorescent Protein mNeonGreen Facilitates Protein Expression Analysis In Vivo. **G3 Genes|Genomes|Genetics**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 607–615, 2017.

HUANGYUTITHAM, Varisa; GÜVENER, Zehra Tüzün; HARWOOD, Caroline S. Subcellular Clustering of the Phosphorylated WspR Response Regulator Protein Stimulates Its Diguanylate Cyclase Activity. **mBio**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 1–8, 2013.

INCLAN, Yuki F. *et al.* A scaffold protein connects type IV pili with the Chp chemosensory system to mediate activation of virulence signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 101, n. 4, p. 590–605, 2016.

ISLAM, Mohammad Nazrul *et al.* Optimizing T4 DNA polymerase conditions enhances the efficiency of one-step sequence- and ligation-independent cloning. **BioTechniques**, [s. l.], v. 63, n. 3, 2017.

JAIN, Ruchi; SLIUSARENKO, Oleksii; KAZMIERCZAK, Barbara I. Interaction of the cyclic-di-GMP binding protein FimX and the Type 4 pilus assembly ATPase promotes pilus assembly. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. 1–23, 2017.

JENAL, Urs; REINDERS, Alberto; LORI, Christian. Cyclic di-GMP: Second messenger extraordinaire. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 15, n. 5, p. 271–284, 2017.

JEONG, Jae Yeon *et al.* One-step sequence-and ligation-independent cloning as a rapid and versatile cloning method for functional genomics Studies. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 78, n. 15, p. 5440–5443, 2012.

KAIHAMI, Gilberto H. **Novos reguladores de resposta envolvidos na virulência de**

***Pseudomonas aeruginosa***. 2018. Universidade de São Paulo, [s. l.], 2018.

KAZMIERCZAK, Barbara I.; LEBRON, Maria B.; MURRAY, Thomas S. Analysis of FimX, a phosphodiesterase that governs twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 60, n. 4, p. 1026–1043, 2006.

KILMURY, Sara L N; BURROWS, Lori L. The *Pseudomonas aeruginosa* PilSR Two-Component System Regulates Both Twitching and Swimming Motilities. **mBio**, [s. l.], v. 9, n. 4, 2018.

KILMURY, Sara L. N.; BURROWS, Lori L. Type IV pilins regulate their own expression via direct intramembrane interactions with the sensor kinase PilS. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 113, n. 21, p. 6017–6022, 2016.

KOLLEF, Marin H. *et al.* Global prospective epidemiologic and surveillance study of ventilator-associated pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*. **Critical Care Medicine**, [s. l.], v. 42, n. 10, p. 2178–2187, 2014.

KUCHMA, S. L.; GRIFFIN, E. F.; O'TOOLE, G. A. Minor Pilins of the Type IV Pilus System Participate in the Negative Regulation of Swarming Motility. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 194, n. 19, p. 5388–5403, 2012.

KUNZ, Sandra; GRAUMANN, Peter L. Spatial organization enhances versatility and specificity in cyclic di-GMP signaling. **Biological Chemistry**, [s. l.], v. 401, n. 12, p. 1323–1334, 2020.

LAVENTIE, Benoît Joseph *et al.* A Surface-Induced Asymmetric Program Promotes Tissue Colonization by *Pseudomonas aeruginosa*. **Cell Host and Microbe**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 140-152.e6, 2019.

LEE, Daniel G. *et al.* Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. **Genome Biology**, [s. l.], v. 7, n. 10, 2006.

LEE, Keehoon; YOON, Sang Sun. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 27, n. 6, p. 1053–1064, 2017.

LEECH, Andrew J.; MATTICK, John S. Effect of Site-Specific Mutations in Different Phosphotransfer Domains of the Chemosensory Protein ChpA on *Pseudomonas aeruginosa* Motility. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 188, n. 24, p. 8479–8486, 2006.

LEIGHTON, Tiffany L. *et al.* Biogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili and regulation of their function. **Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 17, n. 11, p. 4148–4163, 2015.

LIVAK, K J; SCHMITTGEN, T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the -2DDCt method. **Methods**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LUO, Yun *et al.* A hierarchical cascade of second messengers regulates

- Pseudomonas aeruginosa* Surface Behaviors. **mBio**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 1–11, 2015.
- LYCZAK, Jeffrey B.; CANNON, Carolyn L.; PIER, Gerald B. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: Lessons from a versatile opportunist. **Microbes and Infection**, [s. l.], v. 2, n. 9, p. 1051–1060, 2000.
- MAO, Fenglou *et al.* DOOR: A database for prokaryotic operons. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 37, n. SUPPL. 1, p. 459–463, 2009.
- MATTICK, John S.; WHITCHURCH, Cynthia B.; ALM, Richard A. The molecular genetics of type-4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa* - a review. **Gene**, [s. l.], v. 179, n. 1, p. 147–155, 1996.
- MERRITT, Judith H. *et al.* SadC Reciprocally Influences Biofilm Formation and Swarming Motility via Modulation of Exopolysaccharide Production and Flagellar Function. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 189, n. 22, p. 8154–8164, 2007.
- MERRITT, Judith H. *et al.* Specific Control of *Pseudomonas aeruginosa* Surface-Associated Behaviors by Two c-di-GMP Diguanylate Cyclases. **mBio**, [s. l.], v. 1, n. 4, p. 1–9, 2010.
- MILLER, Jeffrey H. **Experiments in molecular genetics**. [S. l.]: Cold Spring Harbor Laboratory, 1972.
- MOSCOSO, Joana A. *et al.* The Diguanylate Cyclase SadC Is a Central Player in Gac/Rsm-Mediated Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 196, n. 23, p. 4081–4088, 2014.
- MUTLU, Gökhan M; WUNDERINK, Richard G. Severe pseudomonal infections. **Current Opinion in Critical Care**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 458–463, 2006.
- NAVARRO, Marcos V.A.S. *et al.* Structural Analysis of the GGDEF-EAL Domain-Containing c-di-GMP Receptor FimX. **Structure**, [s. l.], v. 17, n. 8, p. 1104–1116, 2009.
- NGUYEN, Ylan *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* Minor Pilins Prime Type IVa Pilus Assembly and Promote Surface Display of the PilY1 Adhesin. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 290, n. 1, p. 601–611, 2015.
- NICASTRO, Gianluca G. *et al.* c-di-GMP-related phenotypes are modulated by the interaction between a diguanylate cyclase and a polar hub protein. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 3077, 2020.
- NOLAN, Laura M. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* is capable of natural transformation in biofilms. **Microbiology (United Kingdom)**, [s. l.], v. 166, n. 10, p. 995–1003, 2020.
- O'NEILL, Jim. Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. **Review on Antimicrobial Resistance**, [s. l.], 2016.
- O'TOOLE, George A. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. **Journal of Visualized Experiments**, [s. l.], n. 47, p. 10–11, 2011.

O'TOOLE, George A.; KOLTER, Roberto. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 295–304, 1998.

O'TOOLE, George A; WONG, Gerard CL. Sensational biofilms: surface sensing in bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, [s. l.], v. 30, p. 139–146, 2016.

PERSAT, Alexandre *et al.* Type IV pili mechanochemically regulate virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 112, n. 24, p. 7563–7568, 2015.

RAHME, L G *et al.* Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 268, n. 5219, p. 1899–1902, 1995.

ROMLING, U.; BALSALOBRE, C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. **Journal of Internal Medicine**, [s. l.], v. 272, n. 6, p. 541–561, 2012.

ROMLING, U.; GALPERIN, M. Y.; GOMELSKY, M. Cyclic di-GMP: the First 25 Years of a Universal Bacterial Second Messenger. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s. l.], v. 77, n. 1, p. 1–52, 2013.

ROSS, P. *et al.* Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. **Nature** [s. l.], v. 325, p. 279–281, 1987.

ROSSMANN, Florian M. *et al.* The GGDEF Domain of the Phosphodiesterase PdeB in *Shewanella putrefaciens* Mediates Recruitment by the Polar Landmark Protein HubP. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 201, n. 7, 2019.

SAMBROOK, J, FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. Molecular cloning: A laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory**, [s. l.], v. 61, n. 1, p. 17–18, 1989.

SCHMIDT, Andrew J.; RYJENKOV, Dmitri A.; GOMELSKY, Mark. The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: Enzymatically active and inactive EAL domains. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 187, n. 14, p. 4774–4781, 2005.

SCHNEIDER, Caroline A; RASBAND, Wayne S; ELICEIRI, Kevin W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. 671–675, 2012.

SEMMLER, Annalese B. T. *et al.* Identification of a novel gene, *fimV*, involved in twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology**, [s. l.], v. 146, n. 6, p. 1321–1332, 2000.

SHROUT, Joshua D. *et al.* The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 62, n. 5, p. 1264–1277, 2006.

SIMM, Roger *et al.* GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels

and transition from sessibility to motility. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 53, n. 4, p. 1123–1134, 2004.

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. **Bio/Technology**, [s. l.], v. 1, n. 9, p. 784–791, 1983.

STOCK, Ann M.; ROBINSON, Victoria L.; GOUDREAU, Paul N. Two-Component Signal Transduction. **Annual Review of Biochemistry**, [s. l.], v. 69, n. 1, p. 183–215, 2000.

STOVER, C. K. *et al.* Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. **Nature**, [s. l.], v. 406, n. 6799, p. 959–964, 2000.

STRATEVA, Tanya; MITOV, Ivan. Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Annals of Microbiology**, [s. l.], v. 61, n. 4, p. 717–732, 2011.

TACCONELLI, Evelina *et al.* Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **The Lancet Infectious Diseases**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 318–327, 2018.

TAKHAR, Herlinder K. *et al.* The Platform Protein Is Essential for Type IV Pilus Biogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 288, n. 14, p. 9721–9728, 2013.

TREMBLAY, Julien *et al.* Self-produced extracellular stimuli modulate the *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility behaviour. **Environmental microbiology**, [s. l.], v. 9, n. 10, p. 2622–2630, 2007.

WEBSTER, Shanice S *et al.* Interaction between the type 4 pili machinery and a diguanylate cyclase fine-tune c-di-GMP levels during early biofilm formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 118, n. 26, p. e2105566118, 2021.

WEHBI, Hania *et al.* The Peptidoglycan-Binding Protein FimV Promotes Assembly of the *Pseudomonas aeruginosa* Type IV Pilus Secretin. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 193, n. 2, p. 540–550, 2011.

WEI, Qing *et al.* Diguanylate Cyclases and Phosphodiesterases Required for Basal-Level c-di-GMP in *Pseudomonas aeruginosa* as Revealed by Systematic Phylogenetic and Transcriptomic Analyses. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 85, n. 21, p. 1–15, 2019.

WHITCHURCH, Cynthia B. *et al.* Characterization of a complex chemosensory signal transduction system which controls twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 52, n. 3, p. 873–893, 2004.

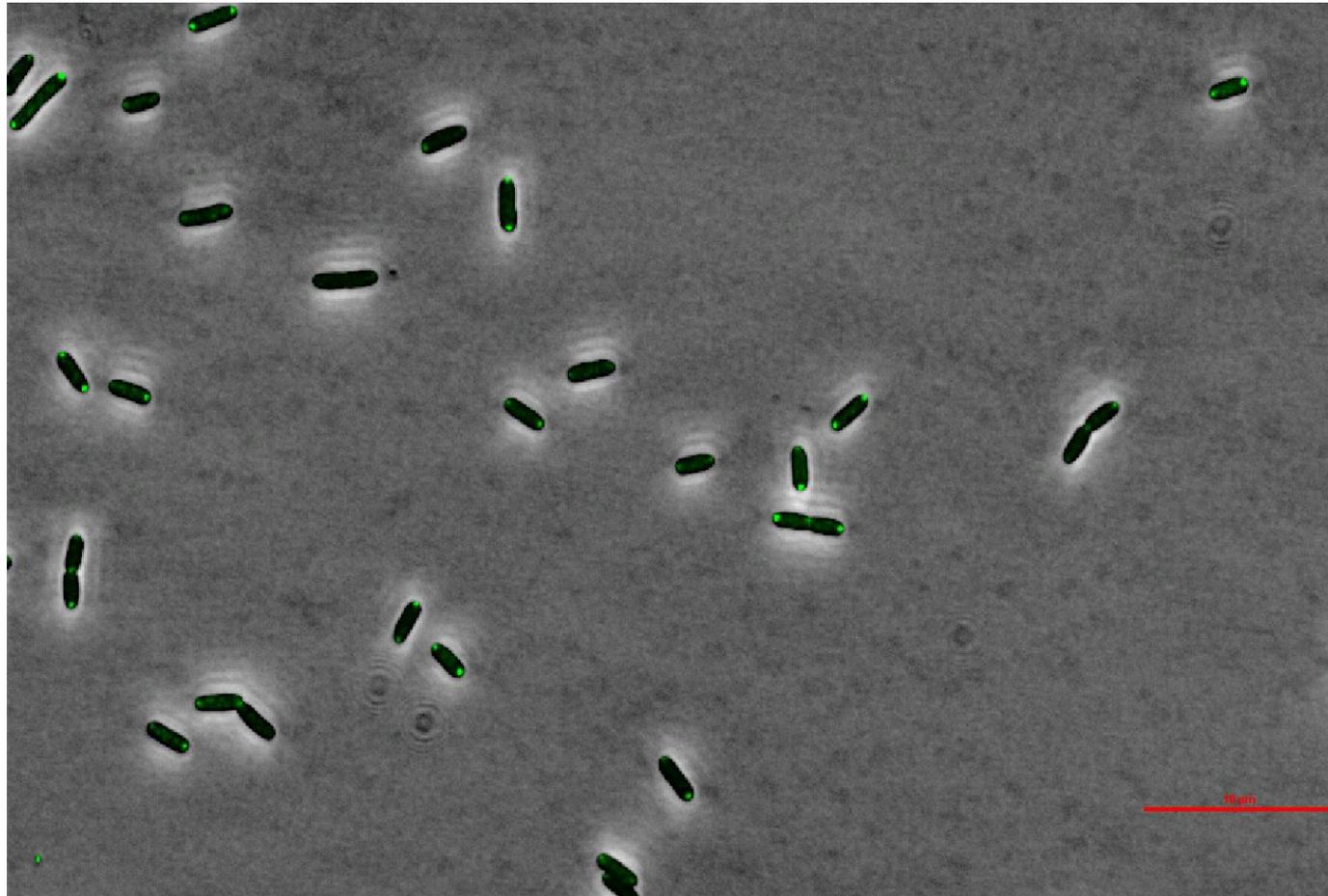
WOLFGANG, Matthew C *et al.* Coordinate regulation of bacterial virulence genes by a novel adenylate cyclase-dependent signaling pathway. **Developmental cell**, [s. l.], v.

4, n. 2, p. 253–263, 2003.

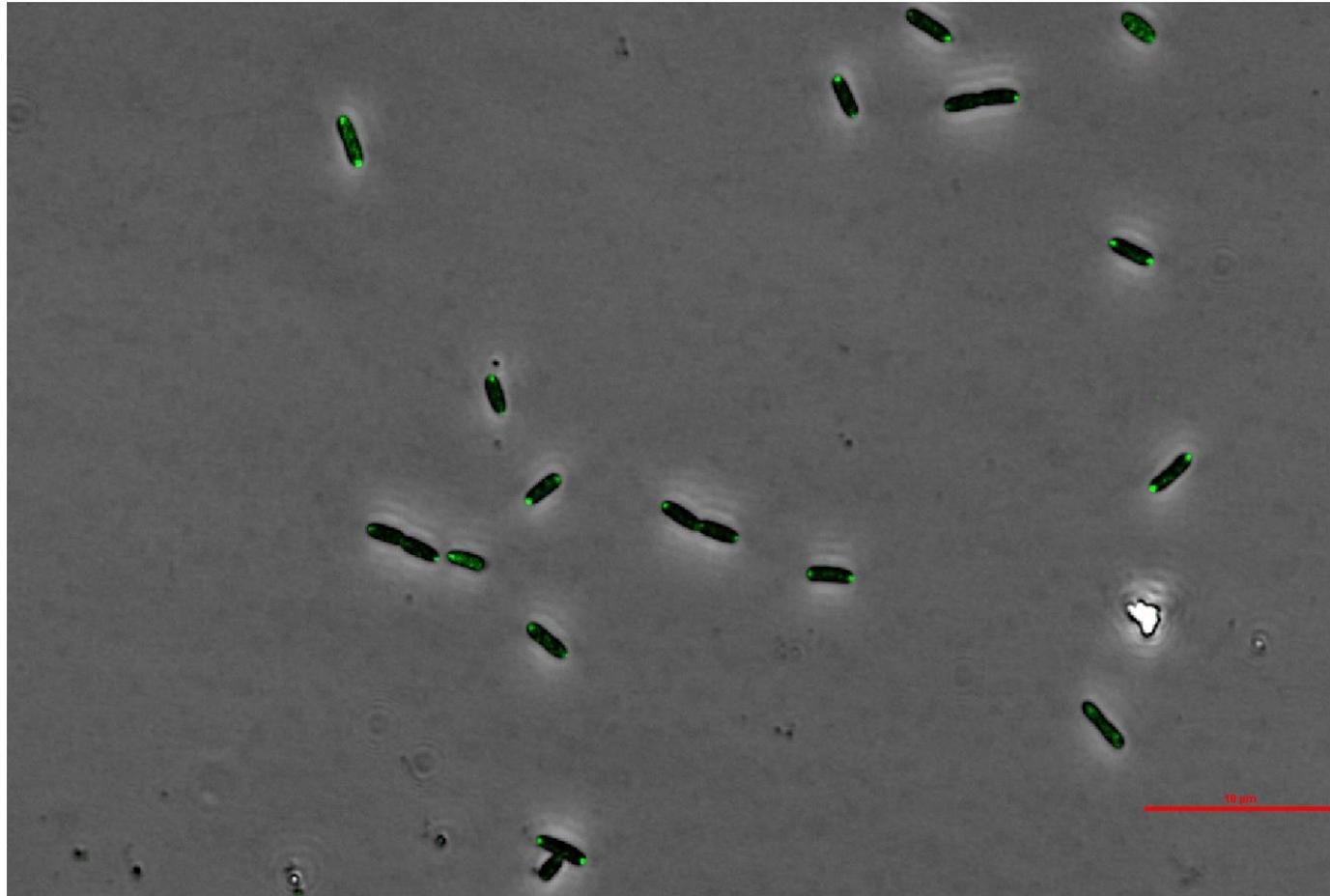
YAKUNIN, Alesander F. *et al.* The HD domain of the Escherichia coli tRNA nucleotidyltransferase has 2',3'-cyclic phosphodiesterase, 2'-nucleotidase, and phosphatase activities. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 279, n. 35, p. 36819–36827, 2004.

YAMAICHI, Yoshiharu *et al.* A multidomain hub anchors the chromosome segregation and chemotactic machinery to the bacterial pole. **Genes & Development**, [s. l.], v. 26, n. 20, p. 2348–2360, 2012.

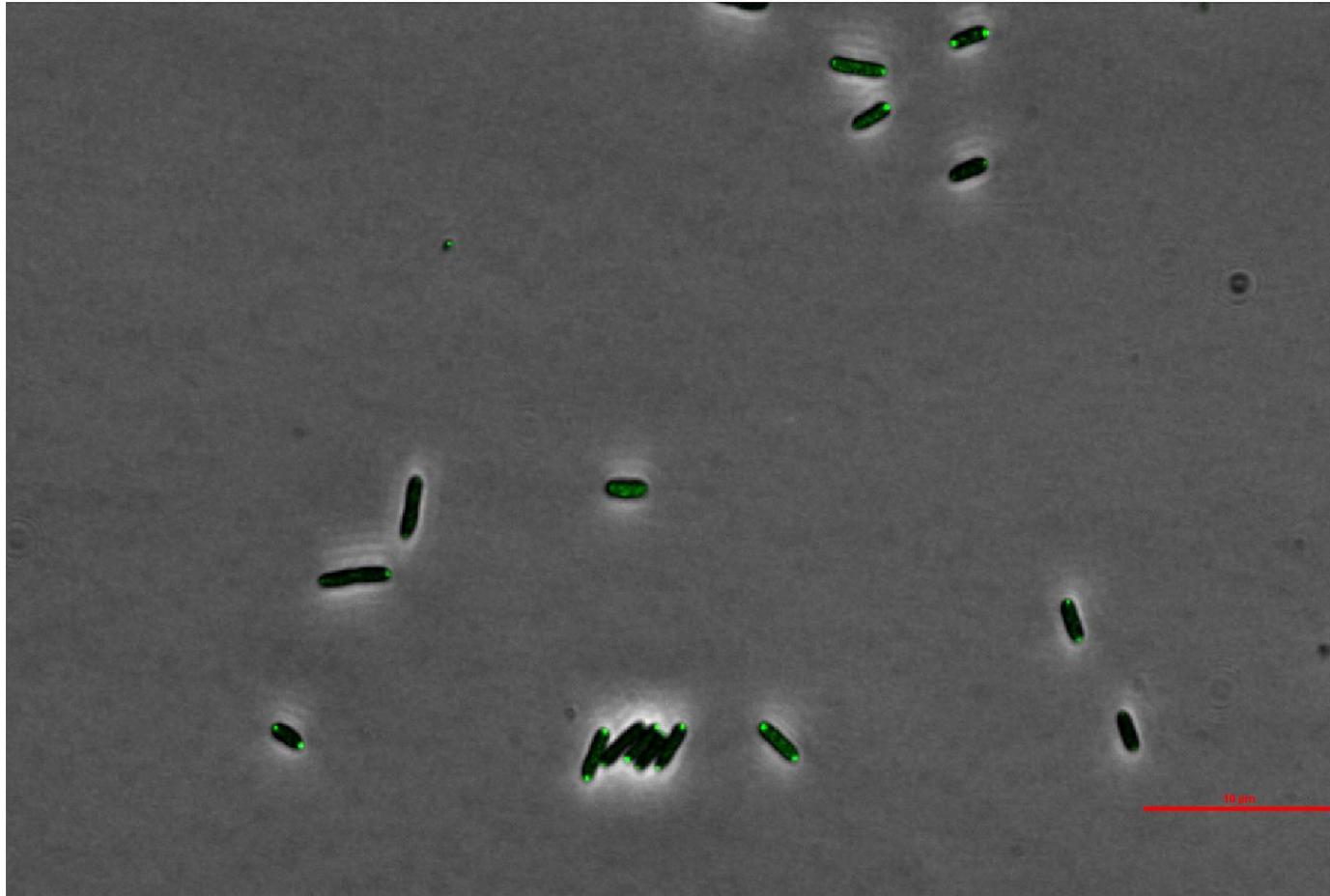
### Apêndice – Localização de DgcP-mNGr



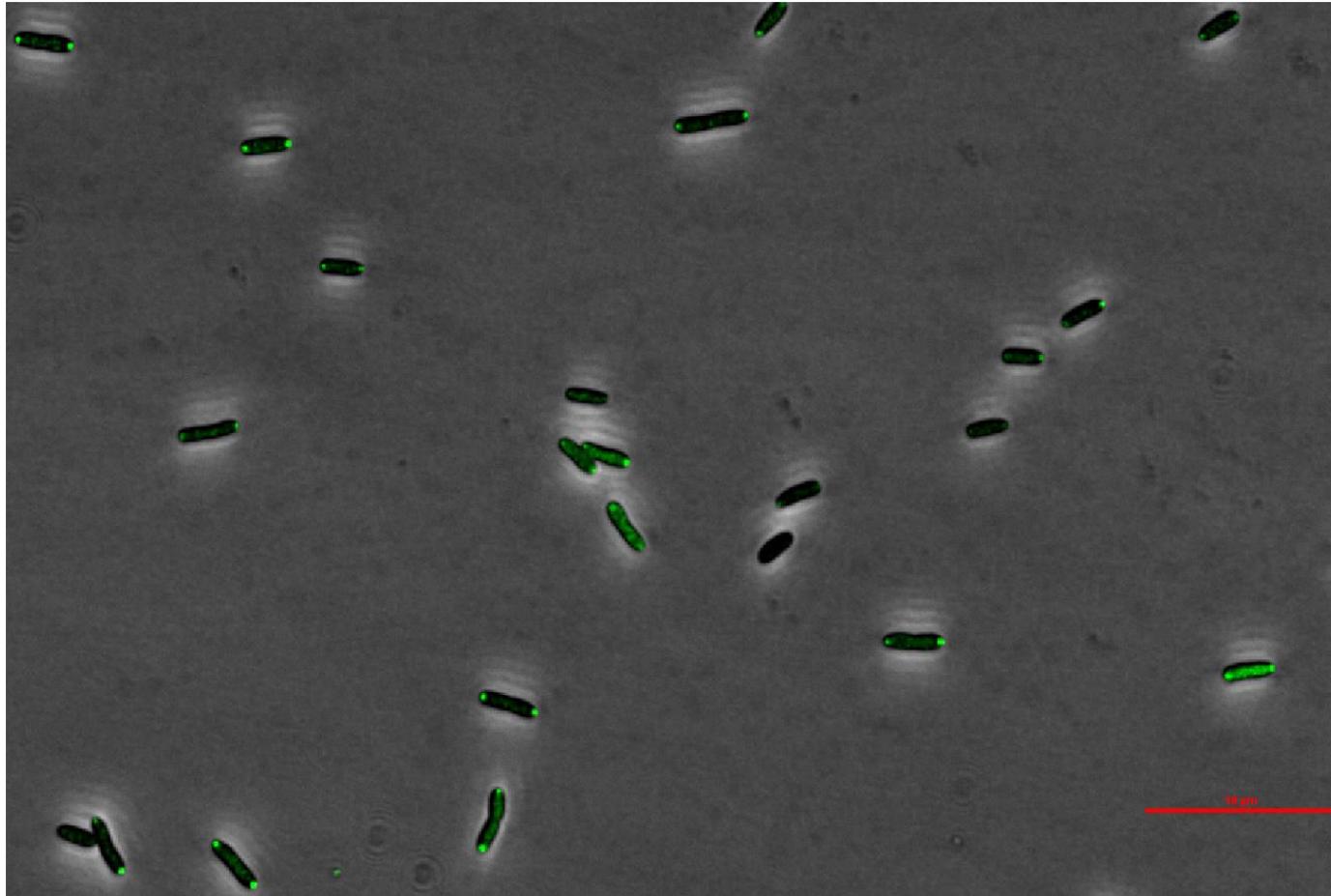
**Figura A-1. Localização de DgcP-mNGr em PA14 WT.** As imagens de microscopia de contraste de fase e de fluorescência foram sobrepostas no *software* NIS-Elements para melhor visualização. A escala presente na imagem é de 10  $\mu\text{m}$ .



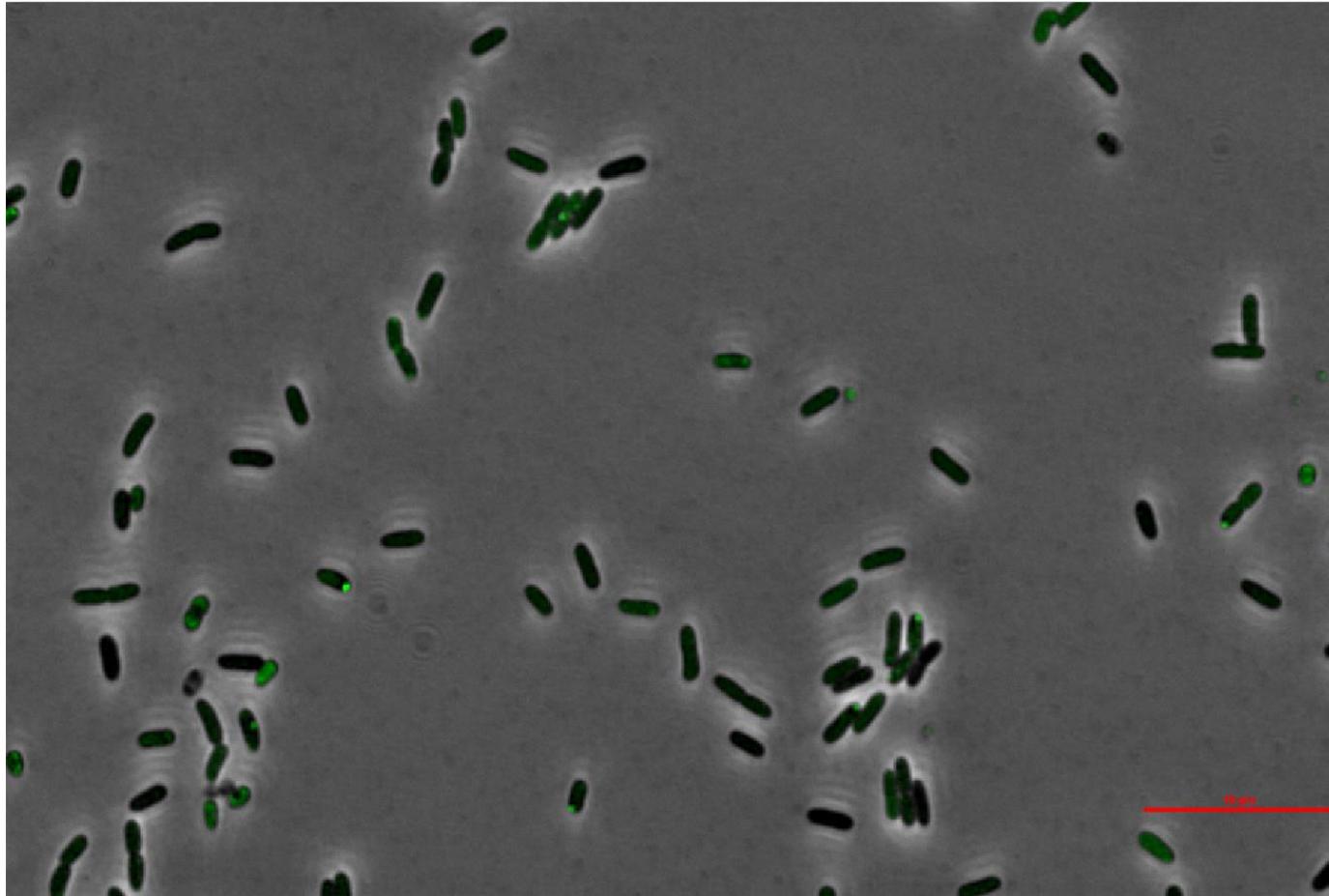
**Figura A-2. Localização de DgcP-mNGr em  $\Delta pilA$ .** As imagens de microscopia de contraste de fase e de fluorescência foram sobrepostas no *software* NIS-Elements para melhor visualização. A escala presente na imagem é de 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura A-3. Localização de DgcP-mNGr em  $\Delta pilR$ .** As imagens de microscopia de contraste de fase e de fluorescência foram sobrepostas no *software* NIS-Elements para melhor visualização. A escala presente na imagem é de 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura A-4. Localização de DgcP-mNGr em  $\Delta chpA$ .** As imagens de microscopia de contraste de fase e de fluorescência foram sobrepostas no *software* NIS-Elements para melhor visualização. A escala presente na imagem é de 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura A-5. Localização de DgcP-mNGr em  $\Delta fimV$ .** As imagens de microscopia de contraste de fase e de fluorescência foram sobrepostas no *software* NIS-Elements para melhor visualização. A escala presente na imagem é de 10  $\mu\text{m}$ .