

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

MICHELE ROCHA CASTRO

RAMINOLIPÍDEOS E O PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA EM
Pseudomonas aeruginosa PAO1

RIO DE JANEIRO
2021

Michele Rocha Castro

RAMINOLIPÍDEOS E O PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA EM
Pseudomonas aeruginosa PAO1

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Prof^ª. Bianca Cruz Neves, Ph.D.

Rio de Janeiro
2021

CIP - Catalogação na Publicação

R355r Rocha Castro, Michele
 RAMINOLIPÍDEOS E O PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA EM
 Pseudomonas aeruginosa PA01 / Michele Rocha
 Castro. -- Rio de Janeiro, 2021.
 113 f.

 Orientadora: Bianca Cruz Neves. Tese
 (doutorado) - Universidade Federal do Rio de
 Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós
 Graduação em Bioquímica, 2021.

 1. Pseudomonas aeruginosa. 2. biossurfactantes.
 3. raminolipídeos. 4. DNA microarray. 5. flagelos.
 I. Cruz Neves, Bianca , orient. II. Título.

Michele Rocha Castro

RAMINOLIPÍDEOS E O PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA EM
Pseudomonas aeruginosa PAO1

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de
Química, da Universidade Federal do Rio de
Janeiro, como parte dos requisitos necessários
à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada em 30 de março de 2021.



Prof^a. Bianca Cruz Neves, Ph.D., IQ/UFRJ

Prof. Fábio César Sousa Nogueira, D.Sc., IQ/UFRJ

Prof^a. Luciana Pizzatti Barboza, Ph.D., IQ/UFRJ

Prof. Luis Caetano Martha Antunes, Ph.D., FIOCRUZ

Prof^a. Tatiana de Castro Abreu Pinto, D.Sc., IMPG/UFRJ

Rio de Janeiro
2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Prof^a. Bianca por todo o aprendizado ao longo desses anos. Além da confiança, compreensão e paciência.

Aos Membros do LaMMP, em especial à Dr^a. e amiga Graciela Dias (UFRJ), por toda a parceria no trabalho, nas análises dos dados, na elaboração do artigo e pela sua disponibilidade em sempre me ajudar, além da sua generosidade em compartilhar seus conhecimentos com todos no laboratório.

À Dr^a. Renata Binato (INCA) pelas análises de *microarrays*, por todo o trabalho na bancada, sua atenção e disponibilidade em colaborar e ainda esclarecer as minhas dúvidas sempre prontamente.

Ao Dr. Tiago Salles (UFRJ) pela colaboração nas análises de RT-qPCR.

À Dr^a. e amiga Camilla Pires (UFRJ), pela troca de experiências no laboratório, nas sugestões para a melhoria da tese e formatação.

À Núbia pela parceria no trabalho da bancada, principalmente, nos ensaios de *swarming*.

À UERJ pela minha formação acadêmica e as minhas orientadoras de IC e de mestrado que também contribuíram para o meu aprendizado durante essa trajetória.

À UFRJ e ao PPGBq-IQ/UFRJ pela minha formação acadêmica de excelência e oportunidade de cursar o doutorado concomitantemente com as minhas atribuições no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ).

Ao IFRJ, particularmente, à Direção de Ensino do *Campus* Duque de Caxias e a equipe de Biologia do LMB-IFRJ/CDUC pela compreensão e adequação de horários para que eu pudesse conciliar melhor minhas demandas institucionais com as atividades do doutorado.

À Petrobras e demais agências de fomento pelo auxílio financeiro.

“... nada deve parecer impossível de mudar.”

Bertold Brecht

RESUMO

CASTRO, Michele Rocha. **Raminolipídeos e o perfil de expressão gênica em *Pseudomonas aeruginosa* PAO1**. Rio de Janeiro, 2021. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

Pseudomonas aeruginosa é um patógeno oportunista capaz de causar infecções em indivíduos imunocomprometidos. É também um importante organismo modelo para o estudo de comportamentos multicelulares, como a formação de biofilmes aderentes e a motilidade celular. A formação de biofilmes por essa espécie bacteriana envolve muitos fatores, tais como *Quorum Sensing* (QS), exopolissacarídeos (EPS), fímbria tipo IV, flagelos e raminolipídeos. Raminolipídeos são glicolipídios que apresentam grande eficiência tensoativa, cuja biossíntese é controlada em nível transcricional e pós-transcricional, por mecanismos regulatórios complexos, que incluem os sistemas de QS e reguladores globais, como fatores sigma alternativos. Os raminolipídeos são produzidos pela via biossintética RhlABC e estão diretamente relacionados à cinética de formação de biofilmes e à motilidade bacteriana. Esta relação é comumente associada às propriedades físico-químicas dessa classe de moléculas, classificadas como biossurfactantes. Dentre os produtos da via RhlABC, em *P. aeruginosa*, os três principais são o ácido 3- (3-hidroxi)alcanoil-oxi) alcanóico (HAA), L-raminosil-3-hidroxi)decanoil-3-hidroxi)decanoato (mono-raminolipídeo) e L-raminosil-L-raminosil-3-hidroxi)decanoil-3-hidroxi)decanoato (di-raminolipídeo). O HAA é sintetizado através da enzima RhlA, sendo convertido em mono-raminolipídeo pela enzima RhlB. Em seguida, o mono-raminolipídeo pode ser convertido em di-raminolipídeo pela enzima RhlC. A RhlA é, portanto, uma enzima-chave na produção de biossurfactantes do tipo raminolipídeo em *P. aeruginosa*. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo investigar os mecanismos bioquímicos associados ao papel fisiológico dos raminolipídeos, através da análise comparativa do perfil de expressão gênica da linhagem *P. aeruginosa* PAO1 e sua derivada deficiente na biossíntese de raminolipídeos, mutante *rhlA*-negativa, empregando-se microarranjos de DNA. O desenho experimental empregou o RNA total obtido a partir de cultivos bacterianos em fase estacionária. A análise apontou 134 genes diferencialmente expressos na mutante *rhlA*, em relação à cepa selvagem, sendo 91 genes regulados positivamente e 43 negativamente, compreendendo diferentes categorias funcionais, indicando uma diferença fisiológica significativa entre as cepas produtora e não produtora de raminolipídeos. Dentre as observações mais importantes, vários genes flagelares mostraram-se reprimidos na cepa mutante, alguns dos

quais foram selecionados e testados por RT-qPCR, confirmando o perfil de repressão, que está diretamente relacionado aos fenótipos de motilidade da cepa *rhlA*-negativa, deficiente para *swarming* e *twitching*. Por outro lado, foi observada a indução da expressão dos genes *pilO* e *pilA*, que codificam proteínas integrantes da fímbria tipo IV. Foi também verificada a indução da expressão de genes de um sistema de secreção do tipo VI (*hcp1*) e outros relacionados à produção de EPSs. Os resultados obtidos sugerem um possível padrão de regulação da expressão gênica, mediada pelos raminolipídeos e/ou seus precursores, HAA, ausentes na cepa *rhlA*-negativa. Ensaio fenotípicos reforçam essa hipótese, já que na ausência dos raminolipídeos, conforme demonstrado para a cepa mutante *rhlA*, ocorre a redução da motilidade *swarming*, fato esse que pode ser atribuído à repressão da biossíntese flagelar observada nesse estudo. No presente estudo, foi também realizada a suplementação da cepa mutante com raminolipídeos exógenos, que teve sua motilidade do tipo *swarming* restaurada em nível semelhante aos da cepa selvagem, fato este observado pela primeira vez nesse trabalho. Portanto, a análise transcriptômica global por microarranjos de DNA mostrou-se relevante para a elucidação dos prováveis mecanismos moleculares envolvidos na dinâmica regulatória dos biossurfactantes raminolipídicos e/ou HAA sobre fenótipos como a formação de biofilmes e motilidade em *P. aeruginosa* PAO1, que são importantes fatores adaptativos e de virulência.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*, raminolipídeos, motilidade, *swarming*, flagelos, biossurfactantes, *rhlA*, DNA microarray.

ABSTRACT

CASTRO, Michele Rocha. **Rhamnolipids and the gene expression profile in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1**. Rio de Janeiro, 2021. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen capable of causing infections in immunocompromised individuals. It is also an important model organism for the study of multicellular behaviors, such as the formation of adherent biofilms and cellular motility. The formation of biofilms by this bacterial species involves many factors, such as Quorum Sensing (QS), exopolysaccharides (EPS), fimbria type IV, flagella and rhamnolipids. Rhamnolipids are glycolipids that have great surfactant efficiency, whose biosynthesis is controlled at the transcriptional and post-transcriptional levels, by complex regulatory mechanisms, which include the QS systems and global regulators, as alternative sigma factors. Rhamnolipids are produced by the RhlABC biosynthetic pathway and are directly related to biofilm formation kinetics and bacterial motility. This relationship is commonly associated with the physicochemical properties of this class of molecules, classified as biosurfactants. Among the products of the RhlABC pathway, in *P. aeruginosa*, the three main ones are 3- (3-hydroxyalkanoyloxy) alkanoic acid (HAA), L-rhamnosyl-3-hydroxidecanoyl-3-hydroxidecanoate (mono-rhamnolipid) and L-rhamnosyl-L-rhamnosyl-3-hydroxidecanoyl-3-hydroxidecanoate (di-rhamnolipid). HAA is synthesized through the enzyme RhlA, being converted into mono-rhamnolipid by the enzyme RhlB. Then, the mono-rhamnolipid can be converted to di-rhamnolipid by the enzyme RhlC. RhlA is, therefore, a key enzyme in the production of rhamnolipid-type biosurfactants in *P. aeruginosa*. Thus, the present study aimed to investigate the biochemical mechanisms associated with the physiological role of rhamnolipids, through the comparative analysis of the gene expression profile of the *P. aeruginosa* PAO1 strain and its derivative deficient in rhamnolipids biosynthesis, a *rhlA*-negative mutant, using DNA microarrays. The experimental design used the total RNA obtained from bacterial cultures in stationary phase. The analysis showed 134 genes differentially expressed in the mutant *rhlA*, in relation to the wild strain, with 91 genes regulated positively and 43 negatively, comprising different functional categories, indicating a significant physiological difference between the producing and non-producing strains of rhamnolipids. Among the most important observations, several flagellar genes were shown to be repressed in the mutant strain, some of which were selected and tested by RT-qPCR, confirming the

repression profile, which is directly related to the motility phenotypes of the deficient *rhlA*-negative strain for swarming and twitching. On the other hand, it was observed the induction of expression of *pilO* and *pilA* genes, which encode type IV fimbriae proteins. The induction of gene expression of a type VI secretion system (*hcp1*) and others related to the production of EPS was also verified. The results obtained suggest a possible pattern of regulation of gene expression, mediated by rhamnolipids and/or their precursors, HAA, absent in the *rhlA*-negative strain. Phenotypic assays reinforce this hypothesis, since in the absence of rhamnolipids, as demonstrated for the mutant strain *rhlA*, there is a reduction in swarming motility, a fact that can be attributed to the repression of flagellar biosynthesis observed in this study. In the present study, the mutant strain was also supplemented with exogenous rhamnolipids, which had its swarming motility restored to a level similar to that of the wild strain, a fact observed for the first time in this work. Therefore, the global transcriptomic analysis by DNA microarrays proved to be relevant for the elucidation of the probable molecular mechanisms involved in the regulatory dynamics of rhamnolipids biosurfactants and/or HAA on phenotypes such as biofilm formation and motility in *P. aeruginosa* PAO1, which are important adaptive and virulence factors.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, rhamnolipids, motility, swarming, flagella, biosurfactants, *rhlA*, DNA microarray.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> produz raminolípídeos contendo ácidos graxos com comprimentos de cadeia entre C8 e C14	24
Figura 2. Biossíntese de raminolípídeos em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33
Figura 3. Rede regulatória que controla a biossíntese de raminolípídeos em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39
Figura 4. Caracterização da cepa mutante PAO1 $\Delta rhIA$ para análise de expressão gênica global por microarranjos de DNA	62
Figura 5. Curva de crescimento da cepa PAO1 selvagem e isogênica mutante $\Delta rhIA$	62
Figura 6. Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo	63
Figura 7. Categorias funcionais dos genes diferencialmente expressos nas análises de microarranjos	72
Figura 8. Dendrograma construído a partir dos 53 genes diferencialmente expressos ($p < 0,05$) entre os três grupos de amostras PAO1 e PAO1 $\Delta rhIA$	73
Figura 9. Gráfico de Volcano dos 134 genes expressos diferencialmente na análise de microarranjos	74
Figura 10. Rede funcional dos 43 genes regulados negativamente na análise de microarranjos	75
Figura 11. Regulação hierárquica da biossíntese flagelar	76
Figura 12. Quantificação da expressão gênica por RT-qPCR dos genes envolvidos com a biossíntese flagelar em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	77
Figura 13. Montagem da estrutura flagelar de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	78
Figura 14. Ensaio de motilidade do tipo <i>swarming</i> em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1.....	79
Figura 15. Análise da expressão gênica de genes relacionados com a produção de EPS e motilidade bacteriana em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	81
Figura 16. Análise da expressão gênica de <i>pilA</i> por RT-qPCR	82
Figura 17. Modelo para modulação da expressão gênica pelos raminolípídeos	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais classes de biossurfactantes e microrganismos envolvidos.....	22
Tabela 2. Lista de primers empregados para validação por RT-qPCR.....	57
Tabela 3. Lista de genes selecionados envolvidos com biofilme para investigação	58
Tabela 4. Lista de primers utilizados para o estudo de genes envolvidos com biofilme.....	58
Tabela 5. Número de genes diferencialmente expressos obtidos por microarranjos de DNA	64
Tabela 6. Avaliação transcriptômica global por microarranjos de DNA	65
Tabela 7. Percentual de inibição e valores de expressão por RT-qPCR dos genes de biossíntese flagelar validados.....	77

LISTA DE SIGLAS

c-di-GMP	Bis - (3',5') - di-guanosina monofosfato cíclico
CMC	Concentração micelar crítica
DO	Densidade óptica
EPS	Exopolissacarídeo
FC	Fibrose cística
HAA	Ácido 3- (3-hidroxi)alcanoilóxi) alcanóico
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
LB	Meio Luria Bertani
LPS	Lipopolissacarídeo
OMS	Organização Mundial da Saúde
P&D	P&D - Pesquisa e Desenvolvimento
RT-qPCR	PCR quantitativa em Tempo Real
QS	<i>Quorum Sensing</i>
RL	Raminolipídeos
sRNA	Pequeno RNA regulatório
SST3	Sistema de Secreção do Tipo 3
SST4	Sistema de Secreção do Tipo 4
SST6	Sistema de Secreção do Tipo 6
TAC	<i>Transcriptome analysis console</i>
TCS	Sistemas reguladores de transcrição de dois componentes
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UNAM	Universidade Nacional Autônoma do México
$\Delta\Delta Cq$	Delta-delta Cq/Cq - ciclo de quantificação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>: Importância Clínica e Ambiental.....	18
2.2. Produção de Biossurfactantes por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....	22
2.2.1. <i>Estruturas Moleculares dos Raminolipídeos</i>	23
2.2.2. <i>Propriedades Físico-Químicas</i>	25
2.2.3. <i>Aplicações</i>	26
2.3. Biossíntese de Raminolipídeos e Mecanismos Regulatórios.....	28
2.3.1. <i>Vias Metabólicas.....</i>	29
2.3.2. <i>Sistemas de Quorum Sensing (QS)</i>	34
2.3.3. <i>Reguladores Globais.....</i>	37
2.4. O Papel dos Raminolipídeos na Formação de Biofilme e na Motilidade Bacteriana do Tipo <i>Swarming</i>	40
2.5. Estudos de Transcriptômica por Microarranjos de DNA em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>: Aspectos Relevantes nas Análises de Expressão Gênica Global.....	49
3. OBJETIVOS	53
3.1. Objetivo Geral	53
3.2. Objetivos Específicos.....	53
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	54
4.1. Manutenção das Cepas Estudadas e Curva de Crescimento	54
4.2. Extração de RNA Total.....	54
4.3. Síntese de cDNA	55
4.4. Caracterização da Cepa Mutante por PCR em Tempo Real (RT-qPCR).....	55
4.5. Avaliação do Perfil de Expressão Gênica Global por Microarranjos de DNA	55
4.6. Validação de Genes Diferencialmente Expressos por RT-qPCR.....	56
4.7. Investigação dos Genes Envolvidos na Formação de Biofilmes.....	57
4.8. Produção de Raminolipídeos.....	59
4.9. Extração e Quantificação de Raminolipídeos.....	59
4.10. Ensaio de Motilidade do Tipo <i>Swarming</i> em Placa	60
4.11. Análise Estatística.....	60
4.12. Depósito de Dados.....	60

5. RESULTADOS.....	61
5.1. Perfil de Expressão Gênica da Cepa <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Deficiente em <i>rhlA</i> (PAO1 $\Delta rhlA$) Não Produtora de HAA e Raminolipídeos na Fase Estacionária de Crescimento.....	61
5.1.1. Caracterização da Cepa Mutante por PCR em Tempo Real (RT-qPCR).....	61
5.1.2. Extração de RNA Total	63
5.1.3. Avaliação do Perfil de Expressão Gênica Global por Microarranjos de DNA	64
5.2. Genes Envolvidos com a Biossíntese Flagelar Regulados Negativamente na Cepa PAO1 $\Delta rhlA$: Confirmação da Análise de Microarranjos de DNA por RT-qPCR.....	76
5.3. Avaliação Fenotípica da Motilidade <i>Swarming</i> das Cepas PAO1, PAO1 $\Delta rhlA$ e PAO1 $\Delta rhlA$ Suplementada com Mistura Exógena de HAA e Raminolipídeos.....	79
5.4. Análise da Expressão de Genes Relacionados à Biossíntese dos Exopolissacarídeos Pel, Psl e Alginato em <i>P. aeruginosa</i> PAO1 e sua Derivada Mutante $\Delta rhlA$.....	80
6. DISCUSSÃO	83
7. CONCLUSÃO	92
8. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

1. INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria ubíqua capaz de causar infecção oportunista em indivíduos imunocomprometidos e é o principal patógeno na doença fibrose cística (FC) (Stover et al., 2000). *P. aeruginosa* é um organismo modelo para o estudo do comportamento social bacteriano ou sociomicrobiologia (Parsek & Greenberg, 2005), desenvolvimento de biofilmes microbianos (Davey et al., 2003) e padrões de motilidade bacteriana (Rashid & Kornberg, 2000; Kearns, 2010; Kilmury & Burrows, 2018). Múltiplos fatores estão envolvidos na motilidade bacteriana e na formação de biofilme durante as interações superficiais, nas quais os raminolipídeos parecem desempenhar um papel central (Pamp & Tolker-Nielsen, 2007).

Raminolipídeos são moléculas anfipáticas compostas por uma porção de ácido graxo hidrofóbico e uma porção hidrofílica que pode conter uma ou duas moléculas de L-raminose, apresentando propriedades surfactantes e tensoativas (Maier & Soberón-Chávez, 2000). Em *P. aeruginosa*, os três biosurfactantes principais são o ácido 3- (3-hidroxialcanoiloxi) alcanóico (HAA), L-raminosil-3-hidroxidecanoil-3-hidroxidecanoato (mono-raminolipídeo) e L-raminosil-L-raminosil-3-hidroxidecanoil-3-hidroxidecanoato (di-raminolipídeo). As moléculas de HAA são biossintetizadas pela enzima RhlA e subsequentemente são convertidos em mono-raminolipídeos pela enzima RhlB. Os mono-raminolipídeos podem então ser convertidos em di-raminolipídeos pela enzima RhlC. RhlA é, portanto, uma enzima chave na produção dos biosurfactantes secretados de *P. aeruginosa* (Soberón-Chávez et al., 2005) que são uma mistura de HAAs, mono-raminolipídeos e di-raminolipídeos.

Os raminolipídeos são tipicamente produzidos durante a fase estacionária de crescimento, pois o operon *rhlAB* é fortemente regulado pelos sistemas de QS, por reguladores globais, como os fatores sigma (Schuster et al., 2007; Dobler et al., 2016) e pós-transcricionalmente por pequenos RNAs não codificantes, como NrsZ (Wenner et al., 2014) e PhrD (Malgaonkar & Nair, 2019).

Existem evidências de que os raminolipídeos são necessários para a arquitetura tridimensional das estruturas do biofilme e para a formação inicial das microcolônias de *P. aeruginosa* PAO1 durante o crescimento em sistemas de fluxo controlado (Davey et al., 2003; Pamp & Tolker-Nielsen, 2007). Essas moléculas geralmente estão associadas à manutenção de canais entre as estruturas características de cogumelos e na dispersão do biofilme (Davey, et al., 2003; Boles, et al., 2005). Curiosamente, Zheng et al., (2017) relataram que análogos sintéticos de raminolipídeos foram capazes de restaurar a estrutura típica do biofilme em uma

cepa mutante de *P. aeruginosa* (PAO1 $\Delta rhIA$), de maneira dependente da concentração. De forma semelhante, um desses compostos promoveu motilidade do tipo *swarming* na cepa deficiente na biossíntese de raminolipídeos.

A motilidade bacteriana associada à superfície também é crítica para a formação e o arranjo espacial do biofilme, que incluem canais bem caracterizados entre as microcolônias onde circulam água e nutrientes (Ghanbari et al., 2016). *P. aeruginosa* tem a capacidade de executar padrões complexos de motilidade, como *twitching*, *swimming* e *swarming* (Rashid & Kornberg, 2000; Kearns, 2010; Kilmury & Burrows, 2018). Evidências na literatura sugerem que raminolipídeos, flagelos e fímbria tipo IV são fundamentais para a motilidade em *P. aeruginosa*, particularmente, para a motilidade de *swarming* (Köhler et al., 2000; Déziel et al., 2003; Caiazza et al., 2005; Tremblay et al., 2007). No entanto, os possíveis mecanismos moleculares envolvidos na modulação raminolipídica da motilidade *swarming* e no desenvolvimento de biofilmes nessa bactéria não são conhecidos.

No presente estudo, utilizamos uma abordagem transcriptômica para comparar o perfil de expressão gênica de *P. aeruginosa* PAO1 e sua nocaute isogênica PAO1 $\Delta rhIA$, através de microarranjos de DNA (Affymetrix *Gene Chip® P. aeruginosa Genome Array*) e PCR em tempo real (RT-qPCR). Testamos a hipótese de que os biossurfactantes produzidos por PAO1 afetam a expressão gênica em condições de crescimento sob agitação em cultivos bacterianos líquidos, contendo células planctônicas no início da fase estacionária. Mostramos que 134 genes foram regulados na cepa mutante $\Delta rhIA$ em comparação com a cepa selvagem, sendo 91 genes induzidos e 43 reprimidos. Inesperadamente, foi observado um padrão de repressão de genes flagelares envolvidos com a biossíntese flagelar e a motilidade bacteriana. De forma contrária, observamos a regulação positiva de genes que codificam proteínas integrantes da fímbria tipo IV.

Os raminolipídeos são importantes fatores adaptativos e de virulência relacionados com a formação de biofilmes e a motilidade bacteriana. Dessa forma, a estratégia de análise transcriptômica global por microarranjos de DNA empregada, se mostrou satisfatória para o melhor entendimento dos papéis desempenhados pelos biossurfactantes produzidos por esse patógeno oportunista.

Em síntese, a partir dos resultados obtidos nesse estudo, esperamos contribuir para a elucidação dos possíveis mecanismos moleculares envolvidos na dinâmica regulatória dessas moléculas raminolípídicas e/ou HAA sobre diferentes fenótipos de *P. aeruginosa* PAO1.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Pseudomonas aeruginosa*: Importância Clínica e Ambiental

Pseudomonas aeruginosa foi isolada de infecções pela primeira vez em 1882 por Gessard, que a nomeou de *Bacillus pyocyaneus*, sendo reconhecida como um patógeno em 1890, por Charrin (Bodey et al., 1983; Lyczak et al., 2000). O microrganismo foi relatado pela primeira vez em secreções de pus obtidas de infecções humanas em 1862 por Luke, que observou partículas em forma de bastão na cor azul esverdeado. Coloração semelhante havia sido observada anteriormente por Sedillot em curativos cirúrgicos, provavelmente devido ao pigmento piocianina produzido por *P. aeruginosa* (Lyczak et al., 2000). *P. aeruginosa* pertence ao gênero *Pseudomonas*, da família *Pseudomonadaceae*, ordem *Pseudomonadales*, classe γ -proteobacteria e filo *Proteobacteria*, incluída no Domínio *Bacteria*.

A bactéria *P. aeruginosa* emergiu como um microrganismo patogênico importante durante a década de 1960 (Bodey et al., 1983). A espécie bacteriana é uma das três principais causas de infecções oportunistas humanas (Stover et al., 2000; Driscoll et al., 2007). É um patógeno relevante em infecções nosocomiais e em muitas infecções tanto crônicas como agudas em pacientes imunocomprometidos, além de pacientes acometidos por queimaduras graves, com infecções do trato urinário e pneumonia e, principalmente, em portadores de FC (Sadikot et al., 2005).

A patogênese causada por infecções clínicas de *P. aeruginosa* é quase na totalidade dos casos associada ao comprometimento dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Enquanto que em muitos outros casos, pode ser atribuída a imunossupressão generalizada. As principais doenças humanas causadas por *P. aeruginosa* são: a bacteremia em vítimas de queimaduras graves, a infecção pulmonar crônica em pacientes com fibrose cística e a ceratite ulcerativa aguda em usuários de lentes de contato gelatinosas de uso prolongado (Lyczak et al., 2000). O biofilme de *P. aeruginosa* também está associado às diversas infecções agudas e crônicas que possuem esse microrganismo como agente causador (Lorenz et al., 2019). A dificuldade na erradicação de *P. aeruginosa* está frequentemente correlacionada ao desenvolvimento da multirresistência (Schmidt et al., 1996).

O gênero *Pseudomonas* é notável pela grande variedade de compostos que podem metabolizar como fontes de carbono e energia (Williams & Worsey, 1976). *P. aeruginosa* é classificada como um bastonete Gram-negativo, saprófito que apresenta ocorrência ubíqua,

com a capacidade de colonizar múltiplos nichos ambientais (Lyczak et al., 2000; Mathee et al., 2008). As células de *P. aeruginosa* possuem um único flagelo polar que caracteriza esse microrganismo como móvel (Chrzanowski et al., 2012). A bactéria exibe alta versatilidade crescendo em solos, pântanos e habitats marinhos costeiros, bem como em plantas e tecidos animais (Hardalo & Edberg, 1997; Stover et al., 2000). Diferentes cepas de *P. aeruginosa* também foram isoladas de solos contaminados por hidrocarbonetos (Macelwee et al., 1990).

Parte da razão para o expressivo sucesso ecológico observado e sua considerável patogenicidade é devida, particularmente, aos múltiplos fatores de virulência bacteriana e a flexibilidade genética que permitem a sobrevivência em ambientes variados (Silby et al., 2011; Gellatly & Hancock, 2013). *P. aeruginosa* é geralmente encontrada em ambientes aeróbicos, apresentando uma diversificada competência metabólica, como a habilidade de crescer em ambientes anóxicos por respiração anaeróbica, além de realizar a desnitrificação (Alvarez-Ortega & Harwood, 2007; Sharma et al., 2006). *P. aeruginosa* pode formar biofilmes em microaerobiose (isto é, em concentrações muito baixas de oxigênio), condições essas semelhantes às encontradas nos pulmões de pacientes com FC (Alvarez-Ortega & Harwood, 2007; Oberhardt et al., 2008).

A patogenicidade de *P. aeruginosa* em plantas e animais está intimamente relacionada com a expressão de genes bacterianos que codificam fatores de virulência (Rahme et al., 1995). A competência em ocasionar doença em indivíduos imunocomprometidos é atribuída, sobretudo, à sua eficiência na produção de um grande arsenal desses fatores (Pearson et al., 2000; Lau et al., 2004; Gellatly & Hancock, 2013).

A virulência de *P. aeruginosa* é dependente de um amplo repertório de fatores, dentre os quais, podemos citar os sistemas de secreção de proteínas (SST), fímbrias, flagelos, exopolissacarídeos (EPS) e lipopolissacarídeos (LPS). A grande maioria são componentes da superfície bacteriana que facilitam ou mesmo medeiam diretamente a interação do microrganismo às superfícies do hospedeiro, sendo também capazes de ativar respostas imunes. Flagelos, fímbrias e lipopolissacarídeos são importantes constituintes bacterianos necessários para a virulência já estudados em vários modelos de infecção por *P. aeruginosa* (Tang et al., 1996; Pearson et al., 2000; Hauser 2009; Hogardt & Heesemann, 2010).

Fatores de virulência extracelulares ou secretados, como proteases (elastase e protease alcalina, por exemplo), toxinas (exotoxina A e as exoenzimas S, T e U) e, mais especificamente, os sistemas de secreção de proteínas do tipo III e IV (SST3 e SST4), são descritos como

substanciais para a virulência em modelos animais. O SST6 em *P. aeruginosa* é extremamente relevante para a patogênese bacteriana e sobrevivência da célula hospedeira. Participam também alguns fatores de virulência acessórios como hemolisina, raminolipídeos, fenazina e piocianina (Sawa et al., 1998; Pearson et al., 2000; Lau et al., 2004; Engel & Balachandran, 2009; Hogardt & Heesemann, 2010; Bleves et al., 2010; Hachani et al., 2011; Mikkelsen et al., 2011).

O genoma relativamente grande da maioria das cepas de *P. aeruginosa* (5-7 Mb) podem incluir um conjunto considerável de genes conservados, codificando para funções essencialmente importantes para a sobrevivência na maioria dos ambientes (Schmidt et al., 1996). A comparação de genomas já publicados demonstra que o repertório genético de diferentes cepas de *P. aeruginosa* possui componentes únicos, consistindo em inserções específicas de blocos gênicos adquiridos por transferência horizontal de genes, com simultâneo descarte de informações genéticas, ocorrendo em um número limitado de *loci* cromossômicos (Mathee et al., 2008).

P. aeruginosa PAO1 é a cepa mais comumente utilizada como modelo de estudo e pesquisas no mundo. A cepa PAO1, um derivado do isolado original australiano PAO, foi distribuída amplamente para diversos laboratórios visando a sua manutenção, conservação e viabilidade em inúmeras coleções de microrganismos (Klockgether et al., 2010). PAO1 apresenta um genoma grande e complexo, com 6,3 milhões de pares de bases, contendo uma alta proporção de genes regulatórios já descritos para um genoma bacteriano e, um grande número de genes envolvidos no catabolismo, transporte e efluxo de compostos orgânicos, bem como quatro sistemas potenciais de quimiotaxia (Stover et al., 2000). O genoma de PAO1 reflete uma adaptação evolutiva que contribui para que essa bactéria se desenvolva em diferentes habitats, em razão da sua versatilidade metabólica e resistência intrínseca a uma grande variedade de substâncias antimicrobianas e desinfetantes (Stover et al., 2000).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2017 publicou uma listagem de agentes patogênicos prioritários resistentes a antibióticos, em um catálogo de 12 famílias de bactérias que representam uma enorme ameaça à saúde humana, estratificando os resultados em três níveis de prioridade: crítica, alta e média. *P. aeruginosa* se destacou apresentando a segunda colocação, de acordo com a classificação designada como patógenos com prioridade crítica. A lista foi elaborada em uma tentativa de orientar e promover a pesquisa e o desenvolvimento

(P&D) de novos antibióticos, como parte dos esforços da OMS para enfrentar a crescente resistência global aos medicamentos antimicrobianos (OMS, 2017).

P. aeruginosa é um dos patógenos oportunistas mais estudados mundialmente. Esse microrganismo é o foco de intensas pesquisas devido ao seu papel proeminente em muitas doenças (Mulcahy et al., 2014). Um número expressivo de trabalhos são relacionados à epidemiologia molecular da espécie, além de outros que abordam sua importância biotecnológica. Uma busca simples no *PubMed* realizada em dezembro de 2020 utilizando o termo “*Pseudomonas aeruginosa*”, disponibiliza mais de 1000 resultados de publicações nos últimos 5 anos, dentre as quais podemos citar artigos, revisões, livros e outros documentos de considerável relevância.

Na área ambiental, a principal contribuição desse microrganismo é a sua capacidade de produzir substâncias bioativas conhecidas como biossurfactantes. Os biossurfactantes são compostos tensoativos produzidos por uma grande variedade de espécies de microrganismos, como bactérias e leveduras (Phale et al., 1995). São caracterizados como moléculas anfipáticas compostas por um domínio hidrofóbico e um hidrofílico (Phale et al., 1995; Beal & Betts, 2000). A estrutura molecular e suas propriedades físico-químicas permitem a redução da tensão superficial do meio aquoso (ar/líquido) e as tensões interfaciais (líquido/líquido) ou (líquido/sólido) entre a água e os líquidos de fase não aquosa, formando emulsões ou até mesmo microemulsões que afetam positivamente a taxa de biodegradação de hidrocarbonetos (Phale et al., 1995; Zhang & Miller, 1995; Beal & Betts, 2000).

Os biossurfactantes também apresentam muitas aplicações nas indústrias alimentícia, agrícola, petrolífera, de papel/celulose, cosmética e farmacêutica. Esses bioprodutos possuem uma gama de benefícios quando comparados com os surfactantes sintéticos, incluindo grande biodegradabilidade, baixa toxicidade, melhor compatibilidade ambiental, atividade de superfície aceitável em temperaturas extremas, pH e salinidade admissíveis em diferentes condições de interesse e a capacidade de ser sintetizado a partir de fontes renováveis (Abdel-Mawgoud et al., 2010; Eslami et al., 2020).

São classificados de acordo com sua estrutura molecular principalmente em glicolipídeos, lipopeptídeos, biossurfactantes poliméricos, ácidos graxos e fosfolipídeos (Desai & Banat, 1997; Lang & Wullbrandt, 1999). Os raminolipídeos (RLs) são biossurfactantes da classe dos glicolipídeos que têm sido amplamente estudados. São produzidos por várias espécies bacterianas, incluindo *Pseudomonas* spp. e *Burkholderia* spp. (Abdel-Mawgoud et al.,

2010; Funston et al., 2016). Foram isolados e descritos pela primeira vez em *P. aeruginosa* por Jarvis e Johnson em 1949 (Desai & Banat, 1997; Lang & Wullbrandt, 1999), sendo os raminolipídeos um dos agentes tensoativos com potencial biotecnológico promissor mais investigados na literatura (Abdel-Mawgoud et al., 2010; Abdel-Mawgoud et al., 2011; Suh et al., 2019; Eslami et al., 2020).

2.2. Produção de Biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa*

Os biossurfactantes constituem um grupo diverso de moléculas tensoativas produzidas por diferentes espécies de seres vivos como bactérias, fungos e leveduras. Algumas espécies de cianobactérias também produzem biomoléculas que apresentam propriedades surfactantes, caracterizadas por uma alta hidrofobicidade superficial (Nitschke & Pastore, 2002). A classificação dos biossurfactantes se baseia em dois fundamentos: a composição química da molécula e sua origem microbiana. As principais classes, de acordo com a Tabela 1, incluem glicolipídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas, fosfolipídeos e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (Desai & Banat, 1997; Lang & Wullbrandt, 1999; Nitschke & Pastore, 2002).

Tabela 1. Principais classes de biossurfactantes e microrganismos envolvidos.

Tipo de Biossurfactante	Microrganismos
Glicolipídeos	
Raminolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Pseudomonas chlororaphis</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Burkholderia</i> spp.
Soforolipídeos	<i>Torulopsis bombicola</i> <i>Torulopsis apicola</i>
Trehalolipídeos	<i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Mycobacterium</i> sp.
Lipopeptídeos e Lipoproteínas	
Peptídeo-lipídeo	<i>Bacillus licheniformis</i>
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>

Continuação	
Ácidos Graxos, Lipídeos Neutros Fosfolipídeos	
Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Lipídeos neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
Fosfolipídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes Poliméricos	
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Liposan	<i>Yarrowia lipolytica</i>
Carboidrato-lipídeo-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Manana-lipídeo-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
Surfactantes Particulados	
Vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Células	Várias espécies bacterianas

Adaptado de Nitschke e Pastore, 2002.

Embora muitos microrganismos sejam capazes de sintetizar biosurfactantes, os RLs produzidos por espécies de *Pseudomonas* spp. representam uma das classes mais importantes de surfactantes microbianos, apresentando altos rendimentos e um bom potencial para exploração comercial. Outra vantagem dos raminolipídeos é o fato de que podem ser produzidos a partir de substratos hidrofílicos ou hidrofóbicos relativamente de baixo custo (Nitschke & Pastore, 2002; Nitschke et al., 2005).

2.2.1. Estruturas Moleculares dos Raminolipídeos

A descoberta dos RLs foi referida por Bergström em 1946, em que data os autores relataram a identificação de um glicolipídeo oleoso produzido por *Pseudomonas pyocyanea* (espécie atualmente denominada de *P. aeruginosa*), quando crescida em meio de cultivo contendo glicose. Essa substância foi designada como ácido piolípico e seus componentes estruturais foram identificados como L-raminose e ácido β -hidroxidecanóico (Abdel-Mawgoud et al., 2011). A natureza química detalhada dessas moléculas foi revelada por Jarvis e Johnson (1949), e em 1965 descrita também por Edwards e Hayashi (Edwards & Hayashi, 1965; Desai & Banat, 1997; Lang & Wullbrandt, 1999; Abdel-Mawgoud et al., 2011).

P. aeruginosa produz mais de 28 congêneres de raminolipídeos, sendo predominantes os L-raminosil-3-hidroidecanoil-3-hidroidecanoato (mono-raminolipídeos) e L-raminosil-L-raminosil-3-hidroidecanoil-3-hidroidecanoato (di-raminolipídeos), ou seja, com uma ou duas moléculas de L-raminose (R) e cadeias carbônicas C10 (R-C10-C10 e RR-C10-C10). Da mesma forma, a porção lipídica pode conter um ou dois ácidos graxos β -hidroxi ligados por ligação do tipo éster, que diferem no comprimento da cadeia e grau de saturação em várias estruturas congêneres. Essa espécie bacteriana também produz um biossurfactante classificado como ácido graxo e denominado de ácido 3- (3- hidroxialcanoiloxi) alcanóico (HAA) (Déziel et al., 1999; Cabrera-Valladares et al., 2006; Abdel-Mawgoud et al., 2010; Wood et al., 2018).

As estruturas simplificadas dessas moléculas produzidas por *P. aeruginosa* podem ser observadas na Figura 1.

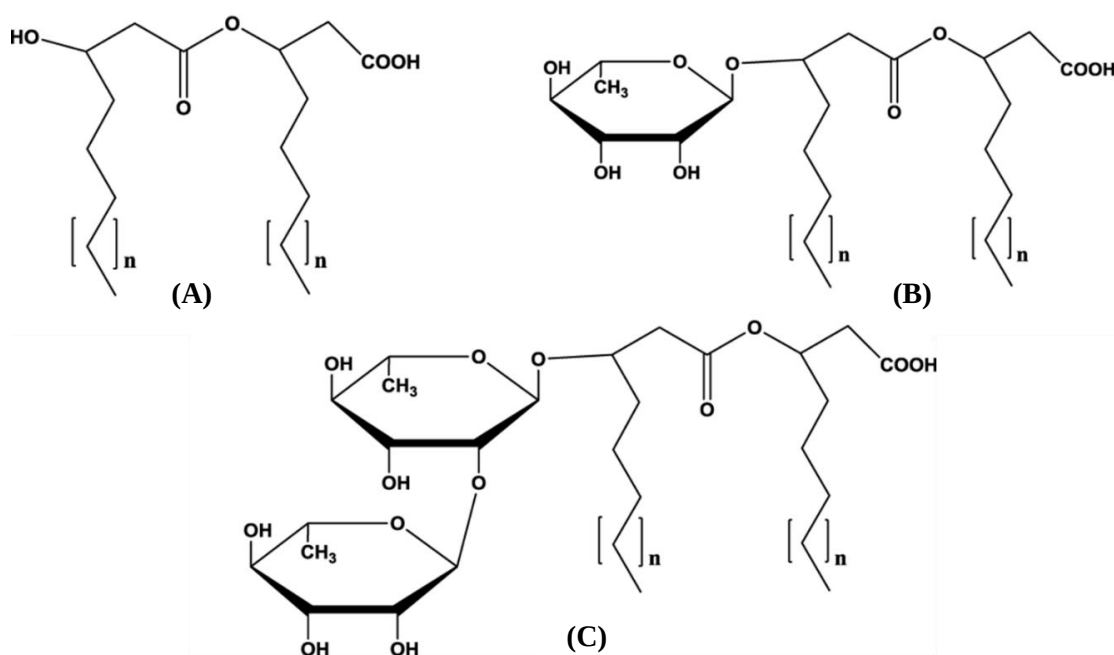


Figura 1. *Pseudomonas aeruginosa* produz raminolipídeos contendo ácidos graxos com comprimentos de cadeia entre C8 e C14. (A) HAA - ácido 3- (3- hidroxialcanoiloxi) alcanóico; (B) Mono-raminolipídeo e; (C) Di-raminolipídeo, com n podendo variar de 1 até 7 (Adaptada de Wood et al., 2018).

Os raminolipídeos apresentam uma extensa diversidade química. *P. aeruginosa* produz mono-raminolipídeos e di-raminolipídeos com propriedades tensoativas e estrutura glicolípídica que são secretados para o meio extracelular (Déziel et al., 1999; Soberón-Chávez et al., 2005). Além disso, esse microrganismo também produz o biossurfactante HAA que

apresenta uma capacidade surfactante excelente, diminuindo a tensão superficial para valores inferiores quando comparado aos raminolipídeos (Déziel et al., 2003).

As atividades de superfície, solubilidade e outras propriedades são geralmente sensíveis ao pH, devido ao ácido graxo livre presente nas moléculas desses biossurfactantes. As diferentes estruturas moleculares, ou seja, o número de resíduos de L-raminose e o comprimento da cadeia e extensão das insaturações, também afetam as suas propriedades e potencialmente as possibilidades de aplicação dos raminolipídeos (Suh et al., 2019).

2.2.2. *Propriedades Físico-Químicas*

De forma muito semelhante aos surfactantes sintéticos, os raminolipídeos podem reduzir as tensões superficiais e interfaciais e oferecem propriedades detergentes, emulsificantes, espumantes e/ou dispersantes para diferentes aplicações. A tensão superficial mínima em soluções aquosas de raminolipídeos é geralmente relatada em cerca de 30 mN/m, no entanto valores mais baixos como 22,56 mN/m para *P. aeruginosa* já tenham sido relatados (Renfro et al., 2014; Varjani & Upasani, 2016; Xia et al., 2011). Em uma comparação das atividades tensoativas entre surfactantes sintéticos e biológicos não observamos diferenças expressivas, contudo os bioprodutos microbianos apresentam inúmeras outras vantagens da sua utilização (Christofi & Ivshina, 2002).

Os raminolipídeos apresentam concentrações de micelas críticas muito baixas (CMCs), que é uma medida de sua eficiência, sendo mais eficientes e mais efetivos do que os surfactantes convencionais (detergentes aniônicos sulfatados), pois produzem menor tensão superficial em concentrações menores. Entretanto, as CMCs dos raminolipídeos também dependem diretamente das suas estruturas moleculares e do pH ambiental. A pureza do mesmo modo tem um efeito significativo e quanto menor ela se apresenta maiores são os valores de CMCs dos raminolipídeos (Nitschke & Pastore, 2002; Nitschke et al., 2005; Suh et al., 2019).

Raminolipídeos são normalmente obtidos por processos fermentativos aeróbicos, sendo metabólitos secundários que são produzidos, principalmente, durante a fase estacionária de crescimento em culturas líquidas com indução por esgotamento de pelo menos um nutriente essencial, como, por exemplo, a fonte de nitrogênio (Guerra-Santos et al., 1984; Gunther et al., 2005). Outra possibilidade de obtenção de raminolipídeos sob condições anaeróbicas desnitrificantes também já foi relatada (Chayabutra et al., 2001). A relação C/N é um fator

relevante que influencia o desempenho da produção de raminolipídeos e alguns trabalhos mencionam que a produção desses bioprodutos é mais eficiente sob condições limitantes de nitrogênio (Benincasa et al., 2002; Santa Anna et al., 2002). No entanto, as concentrações ideais podem variar de acordo com a cepa e a fonte de carbono (Wu et al., 2008). As cepas de *P. aeruginosa* que utilizam substratos não polares, como hidrocarbonetos e óleos vegetais, possuem maiores rendimentos na produção de raminolipídeos (Sim et al., 1997; Lang & Wullbrandt, 1999).

Um número notável de pesquisas estão direcionadas na utilização de subprodutos industriais de baixo custo para a produção de raminolipídeos (Haba et al., 2000; Rahman et al., 2002; Nitschke et al., 2010). Os custos de produção também se mostram elevados, devido a tendência de formação de espuma na fermentação aeróbia e a problemática da produtividade e do rendimento relativamente baixos (Sodagari et al., 2018).

O rendimento descrito para a produção de raminolipídeos a partir de diferentes substratos varia em uma ampla faixa de 10% a 62%. Além disso, o rendimento também depende dos requisitos da cepa bacteriana e das condições do processo. A baixa produtividade na obtenção de raminolipídeos é um obstáculo econômico potencial para a escala industrial, estando estreitamente associada ao fato da sua maior produção ocorrer na fase estacionária de crescimento, o que demanda um tempo prolongado, com declínio significativo da produtividade (Henkel et al., 2012; Suh et al., 2019).

2.2.3. Aplicações

As principais aplicações dos raminolipídeos incluem os processos de emulsificação, solubilização, detergência, umectação, formação de espuma e dispersão em diferentes áreas da indústria, além das ambientais como na biorremediação e na recuperação aprimorada de óleo (Benincasa, 2007; Nguyen et al., 2008; Whang et al., 2008). Os raminolipídeos têm sido empregados também na agricultura para controlar a disseminação de infecções por fitopatógenos e como antimicrobianos (Haba et al., 2003; Dashtbozorg et al., 2015), na cicatrização de feridas (Piljac & Piljac, 2007), em cosméticos (Marchant & Banat, 2012) e na dispersão de biofilmes (Dusane et al., 2010; Wood et al., 2018).

Além da importância ambiental e industrial, os raminolipídeos também desempenham papéis fisiológicos singulares (Wittgens et al., 2017). Na fisiologia microbiana podemos

destacar diferentes atuações como na motilidade bacteriana, virulência, sinalização e diferenciação, contribuindo inclusive na formação de biofilmes. São notavelmente promissores na biorremediação de ambientes impactados por óleo devido à sua alta biodegradabilidade e também devido ao seu potencial relevante de adsorção de hidrocarbonetos, sendo uma alternativa na substituição de surfactantes químicos sintéticos por biotecnológicos (Reis et al., 2011; Dobler et al., 2016).

Raminolipídeos são biossurfactantes com uma ampla gama de aplicações industriais que entraram no mercado há uma década atrás. *P. aeruginosa* é a melhor produtora de raminolipídeos. Por outro lado, *Pseudomonas putida* é uma bactéria não patogênica que tem sido usada como hospedeiro heterólogo para a produção desses biossurfactantes, apresentando rendimentos relativamente bons (Soberón-Chávez et al., 2020). O desenvolvimento de cepas recombinantes não patogênicas, através da engenharia genética associada a engenharia metabólica, como uma estratégia de aumento do rendimento e da produtividade na obtenção de raminolipídeos tem se revelado promissora (Cha et al., 2008; Beuker et al., 2016). Recentemente, foi publicada uma revisão contendo uma lista abrangente de microrganismos geneticamente modificados para a produção de raminolipídeos (Dobler et al., 2016).

Uma das estratégias utilizada é a produção heteróloga de raminolipídeos em bactérias que expressam o operon *rhlAB* de *P. aeruginosa*, a partir de um promotor indutível, com o emprego de um microrganismo não patogênico que apresente rendimentos satisfatórios (Soberón-Chávez et al., 2020). Um exemplo de grande êxito foi a produção heteróloga de mono-raminolipídeos através de *P. putida* KT2440 contendo um plasmídeo que codifica o operon *rhlAB* de *P. aeruginosa* PAO1, expresso a partir de um promotor induzido por IPTG (Wittgens et al., 2011; Beuker et al., 2016).

Dessa forma, as inúmeras aplicações dos raminolipídeos e as limitações que afetam a sua produção industrial são de extrema importância no contexto mundial e atual. A investigação e o desenvolvimento de novas estratégias e metodologias que contribuam para a obtenção economicamente viável em larga escala dos raminolipídeos, têm se mostrado crescentes e imprescindíveis do ponto de vista ambiental, particularmente, em virtude do potencial de biorremediação e biodegradabilidade característica dessas moléculas bioativas.

2.3. Biossíntese de Raminolipídeos e Mecanismos Regulatórios

Em *P. aeruginosa*, a biossíntese e a regulação na produção de raminolipídeos têm sido extensivamente estudadas, uma vez que essas moléculas desempenham um papel importante como fatores de virulência. Os mecanismos moleculares envolvidos na produção de raminolipídeos também têm impactado o desenvolvimento de cepas aptas para a produção desses biossurfactantes, bem como vem contribuindo para o aprimoramento dessas cepas visando à sua aplicação industrial (Soberón-Chávez et al., 2020).

A biossíntese de raminolipídeos em *P. aeruginosa* coincide com a fase estacionária de crescimento. Os raminolipídeos, conforme comentado anteriormente, se caracterizam basicamente por moléculas anfipáticas compostas de uma porção hidrofóbica, de ácido graxo, e outra hidrofílica, podendo conter uma ou duas moléculas de L-raminose. O número de moléculas de L-raminose permite uma distinção entre mono e di-raminolipídeo. Em *P. aeruginosa*, o comprimento das cadeias de ácidos graxos varia de C8 a C14, com predominância para mono-raminolipídeos e di-raminolipídeos que apresentam cadeias de ácidos graxos C10-C10. O resíduo de ácido graxo normalmente consiste em um dímero composto por dois ácidos graxos β -hidroxi (também denominado 3-hidroxi), formando um éster intramolecular podendo apresentar insaturações, embora raminolipídeos com apenas uma cadeia de ácido graxo também sejam conhecidos (Soberón-Chávez et al., 2005; Caiazza et al., 2005; Abdel-Mawgoud et al., 2010; Reis et al., 2011; Dobler et al., 2016; Wittgens et al., 2017).

Dentre os raminolipídeos produzidos por *P. aeruginosa* os mais abundantes são o L-raminosil-3-hidroxidecanoil-3-hidroxidecanoato (mono-raminolipídeo) e L-raminosil-L-raminosil-3-hidroxidecanoil-3-hidroxidecanoato (di-raminolipídeo). O precursor ácido 3- (3-hidroxialcanoiloxi) alcanóico (HAA) é necessário para a produção de ambos os raminolipídeos. O precursor HAA também atua como um biossurfactante da classe ácido graxo em *P. aeruginosa*, possuindo propriedades tensoativas relevantes. O HAA é sintetizado através da enzima RhlA, sendo convertido em mono-raminolipídeo pela enzima RhlB. Em seguida, o mono-raminolipídeo pode então ser convertido em di-raminolipídeo pela enzima RhlC. A RhlA é uma enzima-chave na produção de biossurfactantes em *P. aeruginosa* (Soberón-Chávez et al., 2005; Caiazza et al., 2005; Zhu & Rock, 2008; Xavier et al., 2011).

2.3.1. Vias Metabólicas

As vias metabólicas que participam da biossíntese de raminolipídeos fornecendo os precursores dTDP-L-raminose e ácidos graxos β -hidroxi são as centrais que envolvem o metabolismo de carboidratos, a síntese de novo de ácidos graxos e a β -oxidação de lipídeos (Giraud & Naismith, 2000; Rahim et al., 2001; Rehm et al., 2001; Reis et al., 2011; Abdel-Mawgoud et al., 2014; Dobler et al., 2016). A biossíntese de raminolipídeos de forma simplificada ocorre a partir de três reações enzimáticas consecutivas. Na primeira etapa, a enzima RhlA sintetiza moléculas do precursor 3- (3-ácido hidroxicanoiloxi) alcanóico (HAAs) por esterificação de duas moléculas de 3-hidroxiacil ligadas à proteína transportadora de acil (ACP). Em seguida, a RhlB liga uma molécula de HAA com uma de dTDP-L-raminose proveniente da D-glicose-6-fosfato, para produzir mono-raminolipídeos. A última reação é catalisada pela raminosiltransferase RhlC, que catalisa a adição de uma molécula de dTDP-L-raminose aos mono-raminolipídeos (Rahim et al., 2001; Maier & Soberón-Chávez, 2000; Soberón-Chávez et al., 2005).

A molécula de L-raminose pode ser sintetizada a partir da glicose que *P. aeruginosa* adquire do meio ambiente, da degradação do glicogênio intracelular ou da gliconeogênese (Suh et al., 2019). Para a utilização de glicose exógena, essa bactéria normalmente converte glicose diretamente em 6-fosfogliconato durante o transporte, que então entra na via Entner-Doudoroff. Sendo assim, a D-glicose-6-fosfato é subsequentemente sintetizada a partir da D-frutose-6-fosfato gerada na via das pentoses fosfato ou a partir da via da gliconeogênese (Lessie et al., 1984).

Alternativamente, *P. aeruginosa* pode fosforilar intracelularmente glicose através da enzima glicoquinase para gerar D-glicose-6-fosfato (Lessie et al., 1984), que é então convertida em D-glicose-1-fosfato por uma fosfoglicomutase conhecida como AlgC (Olvera et al., 1999). Na ausência de glicose exógena, *P. aeruginosa* tem que gerar esta hexose através da via da gliconeogênese, um processo metabólico crítico para a biossíntese de peptideoglicano, além de outros componentes celulares essenciais. A enzima AlgC também desempenha um papel crucial na biossíntese do EPS alginato, por catalisar a conversão de D-manose-6-fosfato em D-manose-1-fosfato. A D-glicose-1-fosfato gerada por AlgC é então convertida em dTDP-L-raminose em quatro reações sequenciais catalisadas pelas enzimas codificadas pelo operon *rmIBDAC* (Olvera et al., 1999; Rahim et al., 2001).

A primeira enzima envolvida chamada de RmlA, é uma nucleotidiltransferase que converte D-glicose-1-fosfato em dTDP-D-glicose, ativando então a molécula de D-glicose. É importante ressaltar que a atividade catalítica de RmlA é regulada negativamente pelo produto final dTDP-L-raminose (Blankenfeldt et al., 2000). A segunda enzima, a RmlB, é uma desidratase que catalisa a oxidação e desidratação de dTDP-D-glicose para formar dTDP-4-ceto-6-desoxi-D-glicose (Allard et al., 2000). A terceira enzima, RmlC, é uma epimerase que catalisa a epimerização no C3 e C5 para gerar dTDP-4-ceto-6-desoxi-L-manose. Esse substrato é então reduzido a dTDP-L-raminose por RmlD, uma dTDP-4-ceto-6-desoxi-L-manose redutase (Graninger et al., 1999). *P. aeruginosa* usa dTDP-L-raminose como molécula precursora para a biossíntese de raminolipídeos, lipopolissacarídeo (LPS), Psl (EPS) e flagelina (FliC) (Jarvis & Johnson, 1949; Maier & Soberón-Chávez, 2000; Blankenfeldt et al., 2000; Rahim et al., 2001; Pham et al., 2004; Byrd et al., 2009; Lindhout et al., 2009).

P. aeruginosa adquire a porção de ácido graxo β -hidroxi por meio de dois mecanismos. O primeiro mecanismo é através da via biossintética de ácidos graxos de novo (FAS II), em que um β -cetoacil-ACP é convertido em β -hidroxiacil-ACP por uma β -cetoacil redutase dependente de NADPH (Campos-Garcia et al., 1998; Maier & Soberón-Chávez, 2000). Estudos mais recentes sugerem que esta etapa é provavelmente catalisada pela enzima FabG ao contrário de dados anteriores que descreviam a participação da enzima RhlG (Miller et al., 2006; Bazire & Dufour, 2014). O segundo mecanismo para gerar a fração de ácido graxo β -hidroxi para a biossíntese de raminolipídeos é através da via catabólica da β -oxidação de ácidos graxos (Hori et al., 2011; Zhang et al., 2012). Apesar da possibilidade de geração de ácidos graxos β -hidroxi por meio da síntese de novo e da β -oxidação, evidências mais recentes demonstraram que ambas as vias não contribuem igualmente para a biossíntese de raminolipídeos. A β -oxidação de ácidos graxos é provavelmente a principal fonte de ácidos graxos β -hidroxi para a produção de mono e di-raminolipídeos (Abdel-Mawgoud et al., 2014).

As enzimas que catalisam a produção de raminolipídeos a partir dos precursores descritos acima são codificadas pelo operon *rhlAB* e pelo gene *rhlC*. O gene *rhlC* se localiza em um cromossomo distante do operon *rhlAB*. Esses genes codificam raminosiltransferases específicas conhecidas como RhlA, RhlB e RhlC. Em *P. aeruginosa* *rhlAB* e *rhlC* se localizam em diferentes loci enquanto em *Burkholderia thailandensis* e *B. pseudomallei* esses três genes são encontrados agrupados em um único cluster (Dubeau et al., 2009).

Os genes *rhlA* e *rhlB* estão organizados em um operon bicistrônico e as proteínas codificadas foram originalmente descritas como duas subunidades constituintes de único complexo enzimático funcional nomeado de raminosiltransferase I. No entanto, as evidências de que uma cepa mutante de *P. aeruginosa* deficiente na produção de mono-raminolípidos e di-raminolípidos PG201 Δ *rhlB*, era capaz de produzir HAA e que a expressão heteróloga de *rhlA* em *Escherichia coli* acarretava à produção de HAA (Déziel et al., 2003; Zhu e Rock, 2008) foram determinantes para a elucidação da função da enzima RhlA, que exerce a sua catálise independentemente de RhlB. O gene *rhlC* também se organiza em um operon bicistrônico com PA1131, um gene de função desconhecida que codifica uma proteína hipotética (Rahim et al., 2001). Recentemente foi demonstrado que raminolípidos e HAAs exógenos podem ser absorvidos pela célula bacteriana, sendo direcionados para a via de biossíntese de raminolípidos (Wittgens et al., 2017).

A RhlA catalisa a formação da porção de ácido graxo dimérico 3- (3-hidroxi- α -alcanoíloxi) alcanóico (HAA), constituído geralmente por 10 carbonos e denominado de ácido β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanóico, através da condensação de duas moléculas de β -hidroxidecanoil-ACP ou utilizando uma molécula de β -hidroxidecanoil-ACP e a outra de β -hidroxidecanoil-CoA (Déziel et al., 2003). RhlA é uma aciltransferase contendo um domínio α -/ β -hidrolase que catalisa a esterificação de dois ácidos graxos hidroxil ativados para HAAs (Cabrera-Valladares et al., 2006). A esterificação de ácidos graxos hidroxil, catalisada por RhlA, é uma atividade enzimática rara e a especificidade dessa enzima explica as diferenças observadas na diversidade de congêneres do ácido 3- (3-hidroxi- α -alcanoíloxi) alcanóico (HAA), em diferentes espécies de microrganismos (Germer et al., 2020).

RhlB é a raminosiltransferase que catalisa a transferência de uma L-raminose ativada (dTDP-L-raminose) para um β -hidroxidecanoil- β -ácido hidroxidecanóico para formar um mono-raminolípeido (R-C10-C10). Posteriormente, RhlC catalisa a transferência de uma segunda molécula de L-raminose para o mono-raminolípeido produzindo di-raminolípidos (RR-C10-C10) (Maier & Soberón-Chávez, 2000; Soberón-Chávez et al., 2005; Rahim et al., 2001). Uma análise transcriptômica global utilizando *microarrays* em *P. aeruginosa* que investigou padrões de expressão gênica modulados por regulons de QS em células planctônicas, demonstrou que a expressão de *rhlAB* aumentou mais de 100 vezes no início da fase de crescimento estacionário enquanto a expressão de *rhlC* aumentou apenas 7,4 vezes. Esses dados sugerem que possivelmente os mono-raminolípidos são produzidos primariamente no início

da fase estacionária, seguido pelos di-raminolipídeos que são convertidos mais tardiamente (Wagner et al., 2003).

A via biossintética dos raminolipídeos produzidos pela bactéria *P. aeruginosa* está representada na Figura 2.

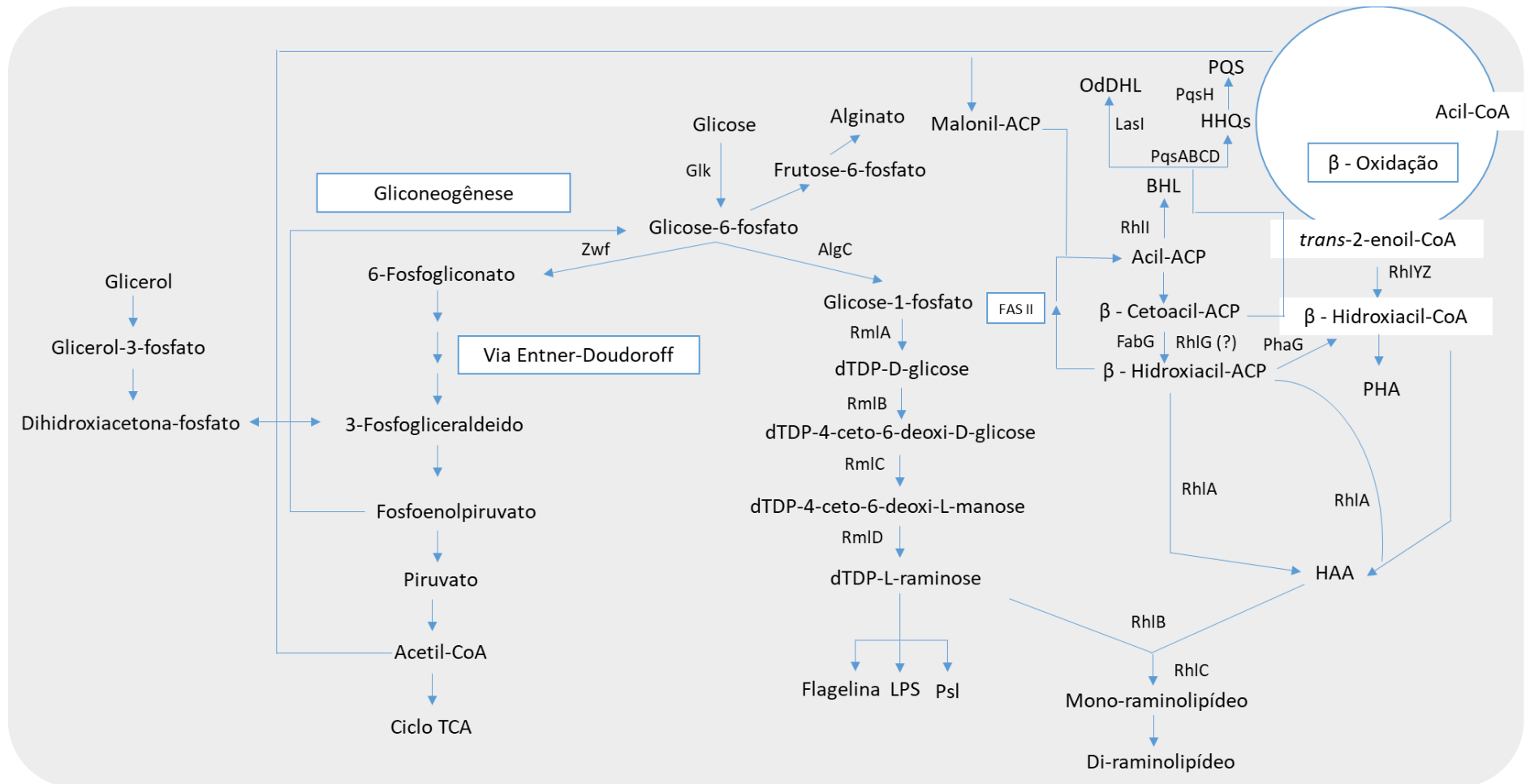


Figura 2. Biossíntese de raminolipídeos em *Pseudomonas aeruginosa*. A rota biossintética dos raminolipídeos pode ser dividida em três etapas principais: biossíntese da fração de carboidrato (L-raminose), biossíntese da cauda lipídica (ácidos graxos β -hidroxilados) e produção de raminolipídeos. Os precursores, dTDP-L-raminose e ácidos graxos β -hidroxi são gerados a partir das vias metabólicas centrais de carboidratos, da via biossintética de novo de ácidos graxos e do catabolismo de lipídeos através da β -oxidação (Adaptada de Suh et al., 2019).

2.3.2. Sistemas de Quorum Sensing (QS)

Em *P. aeruginosa* a regulação da biossíntese de raminolipídeos envolve mecanismos regulatórios globais altamente complexos e intrincados, além das condições ambientais incluindo fontes de carbono, limitação de nitrogênio e disponibilidade de ferro que também regulam a produção desses biossurfactantes (Suh et al., 2019). O operon *rhIAB* é então regulado transcricionalmente e pós-transcricionalmente por vários reguladores, que englobam os sistemas QS e fatores sigma alternativos, como RpoS e RpoN (Caiazza et al., 2005; Reis et al., 2011; Dobler et al., 2016).

Foi demonstrado que os sistemas *quorum sensing* (QS) de *P. aeruginosa* regulam a expressão de aproximadamente 160 genes, onde vários desses controlam a produção e secreção de vários fatores de virulência, como a exotoxina A, proteases e os raminolipídeos (Hentzer et al., 2003; Hentzer & Givskov, 2005). Os sistemas de QS são sistemas de comunicação célula-a-célula bacteriana que incluem a biossíntese, secreção e detecção de moléculas de sinalização conhecidas como autoindutores (Williams & Cámara, 2009). Os mecanismos de QS dentro das populações bacterianas podem produzir um comportamento sincronizado e coordenado quando um determinado número mínimo (quórum) é alcançado. Os sistemas QS são difundidos em bactérias, controlando uma ampla variedade de processos biológicos (Williams & Cámara, 2009). Um sistema regulatório de QS típico é composto por uma enzima sintase (I), um receptor (R) e uma molécula sinalizadora chamada de autoindutor (AI).

Os sistemas QS em *P. aeruginosa* controlam diversos mecanismos fisiológicos, incluindo produção de fatores de virulência, evasão imune, resistência a antibióticos, motilidade, formação e arquitetura de biofilmes, além da resposta a sinais ambientais (Lee & Zhang, 2015). Os quatro sistemas QS identificados e caracterizados até o momento na bactéria *P. aeruginosa* são Las, Rhl, PQS e IQS. Os principais são Las e Rhl e as sintases LasI e RhlI que produzem suas moléculas sinalizadoras 3OC12-HSL e C4-HSL, respectivamente. Essas moléculas de AI se ligam e modulam os seus reguladores transcricionais correspondentes, LasR e RhlR, respectivamente (Dekimpe & Deziel, 2009). O sistema QS Las também requer RsaL, uma proteína repressora para *lasI* e *lasR*, regulando negativamente a expressão de ambos os genes e afetando indiretamente a biossíntese de raminolipídeos (Rampioni, et al., 2007).

O sistema QS Las é então composto por LasR, LasI e o autoindutor (AI) 3-oxododecanoil-homoserina lactona (OdDHL/3OC12-HSL). LasR é uma proteína de ligação ao DNA e LasI possui atividade de acil-homoserina lactona sintase induzindo a biossíntese do

autoindutor OdDHL. O segundo sistema QS descoberto em *P. aeruginosa* denominado de Rhl é composto pelo regulador RhlR, a acil-homoserina lactona sintase RhlI e o autoindutor N-butilil-homoserina lactona (BHL/C4-HSL). RhlR foi inicialmente identificado como um regulador transcricional do operon *rhlAB* (Ochsner et al., 1994).

O sistema QS PQS foi o primeiro mediado por um autoindutor não acil-homoserina-lactona caracterizado em *P. aeruginosa*. PQS regula positivamente a biossíntese de ramípolídeos (Dobler et al., 2016; Suh et al., 2019). O autoindutor 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS) é sintetizado por PqsABCD, PhnAB e PqsH (Gallagher et al., 2002). PqsABCD e PhnAB estão envolvidos na síntese de 2-heptil-4-quinolona (HHQ), uma molécula intracelular que é convertida em PQS por PqsH. O receptor PqsR também conhecido como MvfR, é um regulador transcricional de fator de virulência múltiplo característico do sistema PQS que medeia a expressão dos *clusters* de genes *pqsABCD*, *phnAB* e *pqsH* todos relacionados com a biossíntese do sinal de quinolona. A expressão de PqsR é induzida pelo sistema Las e reprimida pelo sistema Rhl em uma rede regulatória complexa (Gallagher et al., 2002; Déziel et al., 2004). A produção de PQS atinge seu máximo na fase estacionária de crescimento muito semelhante à produção dos ramípolídeos (Diggle et al., 2003).

O mais recente sistema QS identificado e caracterizado em *P. aeruginosa* é o IQS mediado por um autoindutor não acil-homoserina-lactona conhecido como 2-(2-hidroxifenil)-tiazol-4-carbaldeído (IQS). O IQS é sintetizado pelo operon *ambBCDE* de origem não-ribossômica (Lee et al., 2013).

A hierarquia regulatória se inicia com o sistema QS Las. O complexo LasR/OdDHL ativa a transcrição de *lasI*, *rhlR*, *rhlI*, *pqsR* e *rsaL*. A indução transcricional de *lasI* pelo complexo LasR/OdDHL leva ao aumento da produção de OdDHL, através de um *feedback* positivo do sistema QS Las (Seed et al., 1995). A expressão de *lasI* também é regulada positivamente pelo complexo RhlR/BHL (Dekimpe & Deziel, 2009). Em contraste, *rsaL* codifica um repressor transcricional de *lasI* por um mecanismo de *feedback* negativo, que conjuntamente com a indução de *lasI* pelo complexo LasR/OdDHL autorregula o sistema QS Las (De Kievit et al., 1999; Rampioni et al., 2006). Contudo, alguns genes regulados por QS respondem especificamente ao regulon *rhl*, como o operon *rhlAB*, que afeta diretamente a expressão de enzimas biossintéticas envolvidas na produção de ramípolídeos (Schuster & Greenberg, 2007).

A expressão de *lasR* é induzida por dois reguladores globais Vfr e GacA. O regulador de resposta GacA é um efector do sistema de dois componentes GacA/S que regula múltiplos fatores de virulência em muitas γ -proteobactérias, incluindo espécies de *Pseudomonas* spp. (Reimann et al., 1997; Lapouge et al., 2008). A atividade do sistema Las é também regulada por QscR e VqsR. O regulador QscR suprime as atividades de LasR e RhlR pela formação de heterodímeros com essas proteínas (Ledgham et al., 2003). O VqsR de forma antagônica ativa indiretamente o sistema Las. A expressão de *vqsR* é estimulada pelo regulon Las (Liang et al., 2012).

O sistema Rhl é ativado pelo complexo LasR/OddHL que induz a expressão de *rhlR* e *rhlI* (De Kievit et al., 2002). O complexo RhlR/BHL também induz a expressão de *rhlI* através de um *feedback* positivo. Além do complexo LasR/OddHL a expressão de *rhlR* é ativada por Vfr e GacA e as atividades de LasR e RhlR são inibidas por QscR (Reimann et al., 1997; Croda-García et al., 2011). Além disso, *rhlR* e *rhlI* são induzidos indiretamente por VqsR através da repressão da expressão de *qscR* que permite a atividade do complexo LasR/OddHL (Liang et al., 2012). A expressão de *rhlR* e *rhlI* também é positivamente regulada pelo complexo PqsR/PQS (McKnight et al., 2000).

O gene *rhlI* também é regulado negativamente em um nível pós-transcricional por um pequeno RNA regulatório conhecido como DksA, que interfere no processo de tradução (Branny et al., 2001). Os sistemas QS Las e Rhl também são regulados positivamente em resposta à privação de aminoácidos e mediados pelo nível intracelular de ppGpp (Van Delden et al., 2001).

O complexo LasR/OddHL induz a produção de PQS pela indução da expressão de *pqsR* que codifica um ativador dos operons *pqsABCDE* e *phnAB* para a biossíntese de HHQ, e *pqsH* que codifica para uma monooxigenase que converte HHQ em PQS na última etapa da via biossintética de PQS (Déziel et al., 2004; Gallagher et al., 2002). Em contraste, o sistema PQS é regulado negativamente pelo sistema RhlR devido à repressão de *pqsR* pelo complexo RhlR/BHL (Xiao et al., 2006). Por sua vez, o complexo PqsR/PQS induz a expressão de *rhlI* e *rhlR* para regular positivamente o sistema Rhl (McKnight et al., 2000). Assim, o complexo LasR/OddHL ativa tanto Rhl quanto o sistema PQS. Além disso, o sistema PQS é ativado pelo sistema IQS sob condições limitantes de fosfato. O sistema IQS é regulado positivamente pelo complexo LasR/OddHL (Lee et al., 2013).

O papel dos sistemas QS na biossíntese de raminolipídeos em *P. aeruginosa* foi notoriamente estabelecido uma vez que RhlR foi caracterizado por exigir RhlI, uma acil-homoserina sintase ou acil-homoserina lactonas adicionadas exogenamente, para ativar a expressão do operon *rhlAB* envolvido na síntese raminolipídica (Ochsner & Reiser, 1995). Então, foi demonstrado que *rhlC*, o gene que codifica para uma raminosiltransferase e participa da síntese de di-raminolipídeos também foi regulado pelo complexo Rhl/BHL. Assim, os três genes que codificam para as três últimas enzimas envolvidas na conversão de mono e di-raminolipídeos são regulados pelo sistema Rhl (Rahim et al., 2001). Um estudo mostrou que o operon *rmlBDAC* envolvido na biossíntese de dTDP-L-raminose também é regulado pelo complexo RhlR/BHL. Esses dados evidenciaram que o QS regula as etapas iniciais da biossíntese de raminolipídeos, além das três últimas etapas (Ramirez et al., 2012).

2.3.3. Reguladores Globais

Em *P. aeruginosa* a expressão dos genes *lasI* e *rhlI* que codificam as sintases também são regulados por dois fatores sigma alternativos, denominados RpoN e RpoS. RpoN é um regulador global envolvido na resposta de limitação ao elemento nitrogênio desempenhando um papel em vários aspectos da fisiologia dessa bactéria, como na motilidade (Lee & Zhang, 2015). RpoS é um regulador global de resposta ao estresse em *P. aeruginosa*, incluindo a depleção de nutrientes (Suh et al., 1999). Os sistemas de dois componentes típicos, como NtrB/C e CbrA/B são ativados quando o nitrogênio está esgotado. O sistema NtrB/C também está relacionado à capacidade de motilidade *swarming* em *P. aeruginosa*, um movimento multicelular organizado característico de superfície bacteriana que é diretamente dependente da presença de raminolipídeos (Zhang & Rainey, 2008; Hervás et al., 2009; Yeung et al., 2009).

Foi proposto que RpoN ativa indiretamente a expressão do operon *rhlAB* através da indução da transcrição de *rhlR* (Medina et al., 2003). Portanto, o fator sigma alternativo RpoN desempenha um papel central como um regulador global, controlando genes envolvidos no metabolismo do nitrogênio, assimilação de carbono, transporte de nutrientes, motilidade e QS (Potvin et al., 2008). No entanto, o papel de RpoS na biossíntese de raminolipídeos ainda é contraditório (Whiteley et al., 2000; Medina et al., 2003).

O fator sigma RpoS também desempenha um papel importante nas respostas relacionadas ao estresse em *P. aeruginosa*. Os níveis de RpoS são mais elevados na fase

estacionária e em resposta à limitação de nutrientes (Bertani et al., 2003). RpoS regula a maioria dos genes em fase estacionária de crescimento e está conectado com as vias regulatórias Las e Rhl (Schuster & Greenberg, 2007). O operon *rhlAB* está sob o controle de RpoS, sendo parcialmente regulado positivamente, sugerindo que há ainda outra conexão entre a produção de raminolipídeos e a privação de nutrientes (Medina et al., 2003).

Vários pequenos RNAs regulatórios (sRNAs) atuam mediando de forma mais sutil respostas bacterianas aos sinais ambientais, além de regularem também os sistemas QS (Malgaonkar & Nair, 2019). Até o momento, são conhecidos apenas dois sRNAs envolvidos com a regulação pós-transcricional da biossíntese de raminolipídeos em *P. aeruginosa*.

Um estudo mostrou que a cascata NtrB/C-RpoN ativa a transcrição do sRNA regulado por nitrogênio (NrsZ), que por sua vez, ativa a expressão de *rhlA*, levando ao aumento da produção de raminolipídeos por limitação de nitrogênio. Os autores sugerem que a regulação positiva da expressão de *rhlA* devido a supressão de nitrogênio, através de RpoN, ocorre indiretamente, em um nível pós-transcricional. Assim, o sRNA NrsZ se ligaria a sequência do mRNA de *rhlA*, modulando positivamente a expressão de *rhlA*. Até o momento, NrsZ é o único sRNA regulador relacionado com a biossíntese de raminolipídeos (Wenner et al., 2014). Mais recentemente foi descrito PhrD, um sRNA de *P. aeruginosa* que quando superexpresso aumentou a produção de biossurfactantes raminolipídicos, através de uma regulação indireta mediada por RhlR (Malgaonkar & Nair, 2019).

A regulação da biossíntese de raminolipídeos descrita anteriormente envolve mecanismos regulatórios globais que regulam a produção dessas moléculas. A rede regulatória que controla a produção de raminolipídeos em *P. aeruginosa* pode ser observada na Figura 3.

Figura 3. Rede regulatória que controla a biossíntese de raminolipídeos em *Pseudomonas aeruginosa*. A regulação da biossíntese de raminolipídeos envolve mecanismos moleculares transcricionais e pós-transcricionais. Os genes *rhlR* e *rhlI* estão sob regulação altamente complexa por pelo menos 4 sistemas QS, incluindo Las, Rhl, PQS e IQS. O sistema Rhl, que compreende RhlR, o regulador de resposta, e RhlI, a sintase para o autoindutor N-butil-homoserina lactona (BHL/C4-HSL), exerce a regulação mais direta sobre a biossíntese raminolipídica. O complexo RhlR/BHL regula positivamente a expressão do operon *rhlAB* e do gene *rhlC*, que codificam as três enzimas (RhlA, RhlB e RhlC) catalisando a produção de raminolipídeos a partir de precursores, mas também atuam regulando o operon *rmlBDAC* envolvido na biossíntese do precursor dTDP-L-raminose (Adaptada de Suh et al., 2019).

Apesar da elucidação da rede regulatória complexa implicada na biossíntese desses biosurfactantes e da importância das suas propriedades tensoativas, os mecanismos moleculares envolvidos no papel desempenhado pelos raminolipídeos no ciclo de vida e na patogenicidade de *P. aeruginosa* ainda não foram compreendidos. Entretanto, sabe-se que eles afetam diversas estruturas e fenótipos bacterianos como a composição da membrana externa, a motilidade celular e a formação de biofilme (Déziel et al., 2003; Davey et al., 2003; Caiazza et al., 2005; Wilhelm et al., 2007).

2.4. O Papel dos Raminolipídeos na Formação de Biofilme e na Motilidade Bacteriana do Tipo *Swarming*

Os biofilmes microbianos têm sido objeto de intenso estudo durante a última década. Primeiro, por ser de interesse na pesquisa básica, buscando elucidar como as bactérias se organizam e vivem em comunidades multicelulares. Segundo, de interesse na pesquisa aplicada, a formação de biofilmes é importante na patogênese de várias infecções bacterianas, em ambientes e equipamentos hospitalares e na indústria em oleodutos e tubulações, uma vez que as bactérias em um estilo de vida sésil apresentam uma maior resistência às drogas antimicrobianas, às respostas imunes do hospedeiro e aos tratamentos com biocidas (Mah et al., 2003; Jackson et al., 2004; Harmsen et al., 2010).

Os fenótipos de resistência aos antibióticos e a capacidade de adesão a superfícies bióticas e abióticas representam as principais dificuldades no combate de biofilmes bacterianos em ambientes médicos e industriais (Irie et al., 2005). Uma das propriedades mais conhecidas e importantes associada aos biofilmes é a capacidade de tolerância aos antibióticos, que pode ser até mil vezes maior do que quando comparada às células em um estilo de vida planctônico. Essa tolerância pode ser atribuída a diminuição da penetração dessas moléculas na estrutura do biofilme, ao aumento da expressão de bombas de efluxo de múltiplas drogas e a expressão de moléculas de carboidratos periplasmáticos que se ligam e sequestram os antibióticos (Suci et al., 1994; Maira-Litran et al., 2000; Davies, 2003; Mah et al., 2003).

Biofilmes são comunidades bacterianas complexas que iniciam a interação a partir de células planctônicas com uma superfície sólida ou líquida e em resposta a sinais ambientais (O'Toole & Kolter, 1998). Apresentam uma arquitetura bem característica e propriedades fenotípicas e bioquímicas distintas de suas contrapartes planctônicas, estando imersos em uma

matriz polimérica hidratada (Banin et al., 2005). Podemos definir um biofilme como uma comunidade estruturada de células bacterianas encerradas em uma matriz polimérica própria e aderente a uma superfície biótica ou abiótica (Costerton et al., 1999). O modelo proposto em 1987 conhecido como “canal de água”, descreve que em um biofilme há frequentemente uma distribuição tridimensional de microrganismos apresentando subestruturas específicas (Costerton et al., 1987).

O desenvolvimento de biofilmes bacterianos envolve a transição coordenada de células bacterianas planctônicas até comunidades altamente diferenciadas. Em geral e de forma sucinta na etapa inicial ocorre à fixação de bactérias a uma superfície, seguida pelo acúmulo de aglomerados de células, ou microcolônias e, finalmente, um biofilme maduro caracterizado por microcolônias e macrocolônias de células bacterianas separadas por canais cheios de fluido, com organização espacial bem estruturada é formado (Davey & O'Toole, 2000; Wozniak et al., 2003).

Uma importante característica de um biofilme maduro é a produção de uma matriz extracelular (Costerton et al., 1999). Os principais componentes da matriz são geralmente polissacarídeos e água, juntamente com outros produtos celulares que são secretados (Sutherland, 2001). Além de polissacarídeos, a matriz polimérica extracelular dos biofilmes possui ácidos nucleicos (DNA e RNA) e proteínas. A matriz do biofilme é um ambiente dinâmico e heterogêneo, dependente de fatores intrínsecos e extrínsecos. Fatores intrínsecos se expressam de acordo com o perfil genético das células microbianas e os fatores extrínsecos incluem o ambiente físico-químico em que o biofilme e sua matriz estão localizados (Sutherland, 2001).

P. aeruginosa constitui um importante modelo para a compreensão do desenvolvimento de biofilmes, principalmente, devido a sua relativa facilidade em formar biofilmes *in vitro* sob diferentes condições (Høiby et al., 2001). Os biofilmes de *P. aeruginosa* são formados a partir de células planctônicas individuais em um processo de desenvolvimento complexo e altamente regulado. Acredita-se que as células planctônicas iniciem interações com uma superfície em resposta a vários sinais, incluindo a disponibilidade de nutrientes no ambiente (O'Toole & Kolter, 1998).

O biofilme de *P. aeruginosa* se desenvolve em um ciclo multicelular de cinco estágios, que é iniciado pela adesão de células planctônicas a uma superfície, seguido pela formação de microcolônias e produção de exopolissacarídeos (EPS), organização em macrocolônias e

dispersão, onde as células planctônicas das microcolônias se desprendem podendo colonizar uma nova superfície (Stoodley et al., 2002). A matriz extracelular do biofilme de *P. aeruginosa* é uma combinação de expolissacarídeos (EPSs), ácidos nucleicos e proteínas (Allesen-Holm et al., 2006). Pelo menos três expolissacarídeos conhecidos como Psl, Pel e alginato contribuem para a formação do biofilme de *P. aeruginosa* (Ma et al., 2009).

Os EPSs da matriz extracelular são componentes cruciais dos biofilmes que proporcionam à comunidade múltiplos benefícios (Friedman & Kolter, 2004; Matsukawa & Greenberg, 2004). Trabalhos mais recentes sugerem que c-di-GMP, um importante mensageiro secundário em bactérias, promove a formação de biofilme através da regulação dos EPSs. Uma análise de fatores regulatórios especificamente expressos em *P. aeruginosa*, sob condições de elevadas concentrações de c-di-GMP, revelou funções relacionadas com a produção e manutenção da matriz extracelular (Borlee et al., 2010).

Foi postulado também que a expressão de genes envolvidos na biossíntese de alginato pode ser crítica para a formação do biofilme de *P. aeruginosa*, isto porque a expressão de *algC* na estirpe mucoide PA8830 se mostrou elevada (Davies & Geesey, 1995; Stapper et al., 2004). No entanto, o produto do gene *algC* (a enzima AlgC) também está envolvido na biossíntese de LPS e na produção de raminolipídeos (Soberón-Chávez et al., 2005; King et al., 2009).

Outros trabalhos argumentam que o alginato pode não desempenhar uma função determinante na formação da matriz do biofilme de *P. aeruginosa* PAO1 (Stapper et al., 2004; Matsukawa, 2004). Por outro lado, Pel e Psl são considerados componentes importantes da matriz desse microrganismo (Friedman & Kolter, 2004; Matsukawa & Greenberg, 2004). O expolissacarídeo (EPS) Pel é um polímero rico em glicose que desempenha um papel relevante, principalmente, durante as etapas iniciais da formação do biofilme, como a adesão em superfícies bióticas e abióticas (Friedman & Kolter, 2004; Vasseur et al., 2005). O EPS Psl é caracterizado como rico em manose e importante na manutenção da estrutura do biofilme maduro (Ma et al., 2006).

A percepção do ambiente aliada à transferência de informações, envolvem mecanismos regulatórios que representam “tomadas de decisão” fundamentais para o sucesso das respostas adaptativas (Jimenez et al., 2012). A participação, a quantidade e a complexidade dos sistemas regulatórios microbianos estão diretamente relacionados à versatilidade e adaptabilidade de cada microrganismo e suas informações genéticas. No caso de *P. aeruginosa*, cerca de 8% do seu genoma compreende mecanismos regulatórios (Stover et al., 2000).

O estilo de vida sésil que se aplica aos biofilmes microbianos está associado a infecções persistentes, enquanto as células livres na sua forma planctônica estão relacionadas à disseminação sistêmica do microrganismo (Coggan & Wolfgang, 2012). Os mecanismos regulatórios que controlam a formação e a dispersão dos biofilmes envolvem uma variedade de sistemas bacterianos e reguladores, como os sistemas de *Quorum sensing* (QS), sistemas de dois componentes, RNAs regulatórios e outros reguladores pós-transcricionais (Mikkelsen et al., 2011). A alternância entre as duas formas de vida está diretamente relacionada ao segundo mensageiro intracelular c-di-GMP (Mills et al., 2011), assim como ao sistema Gac/Rsm (Brencic et al., 2009; Brensic & Lory, 2009; Mikkelsen et al., 2011). Além de regular a expressão de genes relacionados ao desenvolvimento de biofilmes em *P. aeruginosa*, a via regulatória Gac/Rsm também participa dos processos que envolvem os sistemas SST3 e SST6 (Moscoso et al., 2011).

Os primeiros *insights* publicados sobre o papel dos raminolipídeos na regulação estrutural do desenvolvimento do biofilme de *P. aeruginosa* mostraram que a estabilidade da estrutura desse biofilme é dependente da produção de uma quantidade adequada dessas moléculas, em um determinado momento (Davey et al., 2003; Lequette & Greenberg, 2005; Glick et al., 2010). Os raminolipídeos estão envolvidos em diferentes estágios do desenvolvimento do biofilme de *P. aeruginosa* apresentando múltiplos papéis. Dentre os quais, podemos citar a formação inicial das microcolônias, a manutenção da arquitetura tridimensional e a dispersão das células planctônicas (Nickzad & Déziel, 2014).

Os raminolipídeos em baixa concentração levam ao aumento da hidrofobicidade das células bacterianas facilitando a formação inicial das microcolônias (Pamp & Tolker-Nielsen, 2007). Enquanto que em certas condições, como biofilmes crescendo sob limitação de ferro, a maior produção de raminolipídeos induzida por essa deficiência pode contribuir para o aumento de um tipo de motilidade bacteriana que, como consequência, impede a formação inicial das microcolônias (Patriquin et al., 2008).

O desenvolvimento da arquitetura dos biofilmes, particularmente, o arranjo espacial das microcolônias, é um elemento considerado fundamental para a função dessas complexas comunidades. Um dos papéis desempenhados pelos biosurfactantes raminolipídicos produzidos por *P. aeruginosa* está relacionado com a manutenção dessa organização tridimensional. Biofilmes produzidos por mutantes deficientes na biossíntese de raminolipídeos se apresentam planos não sendo capazes de manter a arquitetura típica observada na cepa de *P.*

aeruginosa selvagem, caracterizada por estruturas em formato de cogumelo com a presença de canais onde circulam água, nutrientes e outras moléculas (Davey et al., 2003; Lequette & Greenberg, 2005; Pamp & Tolker-Nielsen, 2007).

A formação dessas estruturas semelhantes a cogumelos que é dependente da produção de raminolipídeos ocorre no início da maturação do biofilme de *P. aeruginosa*, através do surgimento de uma subpopulação bacteriana móvel com capacidade de migrar para cima (Pamp & Tolker-Nielsen, 2007). Para este tipo de migração as bactérias requerem um padrão característico de motilidade mediado por flagelos e a presença de fímbria tipo IV (PilA) (Barken et al., 2008). Em 2007 foi mostrado que uma cepa mutante PAO1 $\Delta rhIA$ presente em biofilmes mistos contendo mutantes *pilA/rhIA* exibiu uma redução na altura das estruturas em forma de cogumelo, devido a deficiência de raminolipídeos. Dessa forma, está claro que os raminolipídeos facilitam a migração bacteriana associada à superfície e, portanto, a formação dos cogumelos na arquitetura tridimensional típica observada no biofilme de *P. aeruginosa* (Pamp & Tolker-Nielsen, 2007).

Há muitas evidências de que os biossurfactantes nos biofilmes atuem também na manutenção da abertura dos canais de circulação de água, afetando assim as interações célula-a-célula e o contato das células bacterianas às superfícies. Os raminolipídeos impedem a colonização dos canais entre as estruturas em forma de cogumelo mantendo a estrutura tridimensional (Pamp & Tolker-Nielsen, 2007). A biossíntese dos raminolipídeos durante os últimos estágios do desenvolvimento do biofilme (quando a densidade celular é alta), resultaria na ativação de mecanismos de comunicação entre as células bacterianas, preservando assim o arcabouço que mantém os canais abertos (Boles et al., 2005). Ainda sim, altos níveis na produção de raminolipídeos pode impedir a formação de biofilme (Davey et al., 2003).

Os raminolipídeos produzidos por *P. aeruginosa* podem apresentar um papel relevante como agentes antimicrobianos. Muitos autores já descreveram a eficiência dessas moléculas na dispersão de biofilmes de diferentes espécies bacterianas (Irie et al., 2005; Boles et al., 2005; Dusane et al., 2010; do Valle Gomes & Nitschke, 2012; Wood et al., 2018). Existem muitas razões para a formação de biofilmes como uma estratégia de defesa contra o estresse, por exemplo, devido a limitação de nutrientes, ação de antibióticos ou alterações de pH e até mesmo como uma forma de permanência em um estado rico em nutrientes.

Por outro lado, as bactérias também devem ter um meio de se desprender do biofilme, em consequência de mudanças nas condições ambientais, por exemplo, oscilações nos níveis

de oxigênio, baixa nutricional ou aumento de produtos tóxicos (Jefferson, 2004; Kaplan, 2010; Kostakioti, et al., 2013). *P. aeruginosa* apresenta múltiplos fenótipos durante o desenvolvimento de seu biofilme e o conhecimento da fisiologia específica em cada um dos estágios de formação é importante para o entendimento do processo em nível molecular, o que pode viabilizar novos métodos para o controle dos biofilmes microbianos (Sauer et al., 2002).

Um dos modelos mais aceitos para o desenvolvimento dos biofilmes de *P. aeruginosa* destaca a importância dos flagelos e da fímbria tipo IV (PilA), como comentado anteriormente (Klausen et al., 2003; Barken et al., 2008; Conrad et al., 2011). Os flagelos atuam mediando o transporte das bactérias à superfície enquanto a fímbria tipo IV, leva à agregação celular e a formação de microcolônias. Em seguida, ocorre a organização das estruturas multicelulares em forma de cogumelo, através de um processo de maturação que requer sinalização célula-a-célula e a presença de raminolipídeos (Klausen et al., 2003; O'Toole et al., 2000; Stoodley et al., 2002; Heydorn et al., 2002).

Estudos realizados até o momento sugerem que a transição planctônica-biofilme é um processo complexo e estritamente regulado, com o envolvimento dos sistemas QS, produção de EPS, participação de raminolipídeos e motilidade bacteriana (Reis et al., 2011; Guttenplan & Kearns, 2013; Wang et al., 2014). A motilidade bacteriana também é relevante para o desenvolvimento do biofilme, como para a sua formação e para o seu arranjo espacial, incluindo canais bem caracterizados (Ghanbari et al., 2016).

Os principais tipos de motilidade bacteriana realizados por *P. aeruginosa* são *swarming*, *swimming* e *twitching* (Rashid & Kornberg, 2000; Tremblay & Déziel, 2010). A motilidade *swimming* é dependente dos flagelos enquanto o *twitching* necessita da fímbria tipo IV (PilA). Ao contrário desses fenótipos de motilidade, o *swarming* em *P. aeruginosa* exige a produção de raminolipídeos e HAA, além de flagelos funcionais (Kohler et al., 2000; Déziel et al., 2003; Caiazza et al., 2005; Tremblay et al., 2007). O *swarming* pode ser então definido como um movimento multicelular rápido e coordenado ocorrendo em uma superfície semissólida, que requer participação flagelar e produção de biossurfactantes (Kearns, 2010; Há et al., 2014). Os biossurfactantes atuam como agentes umectantes e quimiotáticos (Déziel et al., 2003; Caiazza et al., 2005; Tremblay et al., 2007). Mutantes deficientes na produção da fímbria tipo IV também não são capazes de realizar *swarming* em *P. aeruginosa* (Kohler et al., 2000).

O *swarming* é um comportamento multicelular que requer a integração de sinais químicos e físicos, o que leva à diferenciação fisiológica e morfológica das células bacterianas

(Verstraeten et al., 2008). A bactéria *P. aeruginosa* exibe um fenótipo de motilidade *swarming* com um padrão circular bem característico, que inclui projeções semelhantes a dendritos que se caracterizam por regiões longas e delgadas de colonização, que emergem de uma origem central (Rashid & Kornberg, 2000; Kearns et al., 2010; Tremblay & Déziel, 2010; Kilmury & Burrows, 2018). As células *swarmers* de *P. aeruginosa* são alongadas e possuem dois flagelos polares (Verstraeten et al., 2008). De maneira geral, as células da borda do *swarming* se apresentam mais alongadas do que as células do centro e o número de flagelos também é aumentado (Kohler et al., 2000). Porém, muitas diferenças nos padrões de *swarming* são observados nos ensaios *in vitro* de *P. aeruginosa*, que podem ser explicados por uma variedade de fatores, incluindo os efeitos decorrentes da tensão superficial, da composição do meio e da concentração de ágar superficial (Kamatkar & Shrout, 2011).

Em um estudo mais recente de imagem e análise de motilidade *swarming* foram examinadas oito cepas de *P. aeruginosa*, incluindo uma cepa mutante $\Delta rhlAB$ deficiente na produção de raminolipídeos. Muitas diferenças no comportamento de disseminação em superfície característico do *swarming* foram observadas entre as cepas, não apenas no tamanho da zona do *swarming*, mas também na formação de dendritos e outros padrões de crescimento nas bordas, como a presença de microdendritos. Esses dados refletem que o *swarming* de *P. aeruginosa* é altamente variável (Morris et al., 2011).

Um número expressivo de genes relacionados à virulência, incluindo o sistema SST3 e seus efetores, proteases extracelulares e outros implicados com o transporte de ferro são superexpressos em células *swarmers* de *P. aeruginosa*. Além disso, dois genes de virulência (*lasB* e *pvdQ*) também estão envolvidos (Verstraeten et al., 2008). As células *swarmers* exibem resistência adaptativa a antibióticos (Overhage et al., 2008). A co-regulação do processo de *swarming* e da virulência ocorre através da sinalização via c-di-GMP. A proteína RsmA se liga ao RNA e atua pós-transcricionalmente, afetando positivamente tanto o *swarming* como a virulência, enquanto prejudica a formação de biofilme levando a inibição da biossíntese do EPS Pel e influenciando negativamente os sistemas QS em *P. aeruginosa* (Verstraeten et al., 2008).

A atividade de RsmA é reprimida por dois pequenos RNAs regulatórios, RsmY e RsmZ, que são dependentes da via GacS/GacA. Outras quinases sensoriais envolvidas são RetS e LadS vias de transdução de sinal antagônicas. RetS é necessária para a expressão do sistema SST3 e outros fatores de virulência. Uma mutação em *retS* eleva a expressão dos EPSs *pel* e *psl* e resulta

em formação de biofilme enquanto interfere negativamente na motilidade *swarming* em *P.aeruginosa* (Goodman et al., 2004; Ventre et al., 2006).

Os flagelos são o requisito mais importante para o *swarming*, associado com a indução da biossíntese flagelar, mas este tipo de movimento também requer um aumento nas interações célula-célula e a presença de surfactante (Kearns, 2010). Os flagelos permitem que as bactérias se movam e colaboram para a virulência de patógenos por mediar a adesão e formação de biofilme nas superfícies do hospedeiro. A transcrição dos genes envolvidos com a maquinaria flagelar ocorre de maneira hierárquica e precisamente regulada, com a participação de reguladores centrais como o FleQ em *P. aeruginosa*, integrando vários sinais ambientais. O número de flagelos é geralmente regulado positivamente em células de *swarming* (Verstraeten et al., 2008).

Mutações que levam a repressão de genes flagelares reduzem o número de flagelos e diminuem ou impedem a motilidade de *swarming* (Dufour et al., 1998; Young et al., 1999; Wang et al., 2005). Todavia, mutações que aumentam a expressão de genes flagelares, consequentemente, induzem a biossíntese flagelar estimulando o movimento bacteriano de *swarming* (Claret & Hughes, 2000; Wang et al., 2005). A razão pela qual o *swarming* requer múltiplos flagelos na superfície da célula é desconhecida (Kearns, 2010).

Evidências na literatura mostraram que flagelos bacterianos e raminolipídeos contribuem para o comportamento de disseminação na superfície característico do *swarming* de *P. aeruginosa* PAO1. Por outro lado, um mutante deficiente na produção da fímbria tipo IV (PAO1 $\Delta pilA$) perdeu a capacidade de realizar esse tipo de motilidade, de acordo com os padrões de *swarming* observados para essa espécie (Takahashi et al., 2008). Um mutante de *P. aeruginosa* deficiente na produção de raminolipídeos apresentou *swarming* defeituoso em meio contendo 0,5% de ágar, embora esse mesmo mutante tivesse sido capaz de realizar a motilidade *swimming* que é dependente da atividade flagelar (Köhler et al, 2000). Outros autores demonstraram, em condições de crescimento experimentais muito específicas, a restauração do fenótipo de *swarming* em uma cepa mutante PAO1 $\Delta rhlA$ por complementação com o operon *rhlAB* e também através do fornecimento externo de raminolipídeos purificados (Nozawa et al., 2007).

Um estudo também avaliou a produção de raminolipídeos em cultura líquida e a produção dessas moléculas durante o crescimento superficial em oito cepas de *P. aeruginosa*, revelando não haver correlação entre elas. De forma geral, as cepas apresentaram baixa

produção de raminolipídeos durante o crescimento em superfície enquanto produziram quantidades significativas desses biossurfactantes em cultura planctônica. As melhores cepas de *swarming* também produziram mais raminolipídeos quando cresceram em placas para o ensaio de motilidade (Morris et al., 2011).

Além disso, a produção de raminolipídeos também foi maior nos sobrenadantes de culturas obtidas de células planctônicas, crescidas em meio líquido sob agitação, quando comparada a quantificação dessas moléculas a partir de células em crescimento estático no biofilme da cepa PAO1, durante 24 horas. Por outro lado, a cepa mutante PAO1 $\Delta rhlA$ deficiente na biossíntese de raminolipídeos, teve a sua produção abolida em ambas condições de crescimento e restabelecida após complementação plasmidial com o operon *rhlAB* (Van Gennip et al., 2009).

Foi descrito que os biossurfactantes HAAs, mono-raminolipídeos e di-raminolipídeos modulam diferentemente o processo de *swarming*. Os HAAs e os di-raminolipídeos se comportam como atrativos quimiotáticos autoproduzidos pelas células bacterianas apresentando atividade contrária, ou seja, são repelentes. Em alternativa, os mono-raminolipídeos que parecem agir como agentes umectantes facilitando o fenótipo de motilidade. Outros resultados contradizem esses dados, possivelmente devido aos diferentes graus de purificação dessas moléculas, e indicam que HAAs são os surfactantes mínimos necessários para o *swarming* em *P. aeruginosa* e os raminolipídeos apenas modulam o padrão de motilidade (Caiazza et al., 2005; Tremblay et al., 2007).

Além disso, os raminolipídeos exercem a função de fatores de virulência e se destacam na proteção microbiana contra as defesas do hospedeiro (Van Gennip et al., 2009; Wittgens et al., 2017). Raminolipídeos atuam como hemolisinas extracelulares estáveis ao calor e são conhecidos por desencadear a lise de células do sistema imune, resultando em morte celular necrótica (Johnson & Boese-Marrazzo, 1980; Jensen et al., 2007). Foi demonstrado também que raminolipídeos quimicamente purificados ou produzidos por *P. aeruginosa* levam a perda da polaridade celular, entre outras alterações no epitélio respiratório que contribuem para a invasão bacteriana (Zulianello et al., 2006).

Na literatura evidências descrevem que raminolipídeos, flagelos e fímbria tipo IV são essenciais para a motilidade *swarming* em *P. aeruginosa* (Köhler et al., 2000; Déziel et al., 2003; Caiazza et al., 2005; Tremblay et al., 2007). Adicionalmente, a motilidade *swarming* está claramente relacionada com a formação de biofilme (Verstraeten et al., 2008). No entanto, os

mecanismos propostos para os efeitos dos raminolipídeos nos fenótipos de motilidade *swarming* e formação de biofilme se restringem a umectação, a regulação da hidrofobicidade da superfície celular, a modificação das interações adesivas e as características tensoativas dessas moléculas (Déziel et al., 2003; Al-Tahhan et al., 2000; Fauvart et al., 2012).

Contudo, embora os múltiplos papéis desempenhados pelos biossurfactantes raminolipídicos em *P. aeruginosa* tenham sido investigados, a maioria das funções descritas, conforme discutimos anteriormente, são atribuídas as suas propriedades físico-químicas (Abdel-Mawgoud et al., 2010; Fauvart et al., 2012; Kim et al., 2015). Em contrapartida, os possíveis mecanismos moleculares e as propriedades biológicas dos raminolipídeos para as bactérias produtoras nos diferentes fenótipos estudados, ainda não foram devidamente esclarecidos.

2.5. Estudos de Transcriptômica por Microarranjos de DNA em *Pseudomonas aeruginosa*: Aspectos Relevantes nas Análises de Expressão Gênica Global

A tecnologia de *microarray* permite uma análise paralela da abundância de RNA e homologia de DNA para milhares de genes em um único experimento. Com a crescente disponibilidade de genomas microbianos completos, os microarranjos de DNA se tornaram uma ferramenta comumente utilizada em muitas áreas da pesquisa, incluindo fisiologia e metabolismo bacteriano, patogênese, epidemiologia, ecologia e filogenia, por exemplo. A exploração de perfis de transcrição e diferenças genômicas para uma variedade de microrganismos têm contribuído para a melhor compreensão dos sistemas microbianos (Rick et al., 2001).

Foram publicados em 1999 os primeiros estudos de transcriptômica por microarranjos de DNA em bactérias (Tao et al., 1999; Richmond et al., 1999). Com o sequenciamento do genoma de *P. aeruginosa* PAO1 (Stover et al., 2000), bem como a disponibilidade de matrizes de oligonucleotídeos de alta densidade (Affymetrix *P. aeruginosa* GeneChip) foram possíveis os estudos de avaliação do perfil de expressão gênica global dessa espécie nos anos posteriores (Wagner et al., 2003). Uma análise a partir de nove estudos de *microarray* em *P. aeruginosa*, identificou cerca de um quarto do genoma sendo regulado diferencialmente em resposta a vários estímulos (Goodman & Lory, 2004). No entanto, uma análise comparativa subsequente mostrou

que cerca de 35% do genoma de *P. aeruginosa* é regulado em geral (Balasubramanian & Mathee, 2009).

Análises de DNA *microarray* têm sido utilizadas para identificar genes e redes regulatórias em *P. aeruginosa* envolvidas na formação de biofilme, células planctônicas *versus* biofilme, cepas com fenótipos mucóides, motilidade *swarming*, diversas condições de estresse, diferentes fases de crescimento bacteriano, entre outros (Whiteley et al., 2001; Firoved & Deretic, 2003; Goodman & Lory, 2004; Chang et al., 2005; Salunkhe et al., 2005; Small et al., 2007; Platt et al., 2008; Overhage et al., 2008; Yeung et al., 2009; Brencic et al., 2009; Balasubramanian & Mathee, 2009; Tremblay & Déziel, 2010; De La Fuente-Núñez et al., 2012; Barbier et al., 2014; Oura et al., 2015; Rahmani-Badi et al., 2015; Strehmel et al., 2015; Rampioni et al., 2016; Rampioni et al., 2017).

O mapeamento dos regulons Las e Rhl também foi realizado através da abordagem transcriptômica por microarranjos de DNA. Os estudos relataram vários novos genes que são regulados por QS. Embora houvessem algumas discrepâncias na identificação, esses estudos demonstraram que uma parte significativa dos genes (6-10%) anotados no genoma de PAO1 são regulados por QS (Wagner et al., 2003; Schuster et al., 2003). Adicionalmente, outras análises de *microarray* revelaram 74% de transcritos hipotéticos ou já conhecidos que codificam fatores de virulência regulados por QS em *P. aeruginosa* PAO1 em diferentes condições experimentais. Dentre os quais, podemos citar os genes *rhlA* (PA3479) e *rhlB* (PA3478) que codificam raminosiltransferases importantes para a produção de raminolipídeos (Wagner et al., 2003; Wagner et al., 2004).

Microarranjos de DNA também têm sido empregados para avaliação dos perfis de expressão gênica de populações de células de *swarming* de *P. aeruginosa* em comparação com populações de células planctônicas cultivadas em meio líquido. No trabalho referido, os autores mostraram que as células localizadas na região mais periférica do *swarming*, exibiram regulação positiva de genes associados à virulência, como por exemplo, com o sistema SST3, além de proteases extracelulares e transportadores de ferro, contrastando com as células bacterianas cultivadas no meio líquido (Overhage et al., 2008). Posteriormente, outro estudo mostrou que ao contrário das células da região central do *swarming*, as populações localizadas nas regiões mais periféricas apresentaram regulação negativa de genes associados à virulência e regulação positiva de genes envolvidos com metabolismo energético (Tremblay & Déziel, 2010).

Em *P. aeruginosa* as diferenças nas populações de biofilmes e bactérias planctônicas levaram à hipótese de que existem grandes diferenças na expressão gênica entre os dois modos de crescimento. No entanto, em média, a expressão gênica em células de biofilme é notavelmente semelhante à expressão gênica em células planctônicas, mantidas em condições ambientais semelhantes (Whiteley et al., 2001). Outros trabalhos que avaliaram diferentes espécies bacterianas corroboram com esses resultados, mostrando que muitos dos genes que foram expressos diferencialmente em biofilmes microbianos (por exemplo, flagelos e fímbrias), também são expressos em condições planctônicas. Além disso, muitos dos genes necessários para o desenvolvimento do biofilme não são exclusivamente expressos em condições sésseis (Lazazzera, 2005).

Apesar da relevância dos estudos pioneiros de microarranjos de DNA ou DNA *microarray* em biofilmes microbianos, muitas divergências são observadas nas análises de expressão gênica global. Essas controvérsias são devidas as características fisiologicamente heterogêneas das bactérias que crescem em biofilmes, que podem ser justificadas pela adaptação às condições ambientais locais (Williamson et al., 2012). A maior parte desses estudos utilizaram a estrutura do biofilme em sua totalidade ou seções muito grandes para as análises transcriptômicas, enquanto que a minoria selecionou e isolou subpopulações celulares espacialmente distintas (Williamson et al., 2012; Heacock-Kang et al., 2017).

Com o desenvolvimento mais aprimorado da técnica um novo método de análise transcriptômica de célula bacteriana única foi proposto (Kang et al., 2011). A partir daí, também foi possível caracterizar o perfil de expressão gênica de células individuais localizadas em regiões distintas e em diferentes profundidades na arquitetura tridimensional de biofilmes microbianos (Kang et al., 2015).

Em 2017 uma análise de transcriptômica espacial utilizando microarranjos de DNA revelou um padrão de expressão gênica estratificado verticalmente no biofilme maduro de *P. aeruginosa*, em comparação com o controle composto por células planctônicas (Heacock-Kang et al., 2017). Um total de 2.504 genes diferencialmente expressos foram detectados em todas as três regiões analisadas (superfície, meio e interior), o que cobriu 45% do genoma de *P. aeruginosa*, resultando em uma maior resolução quando comparada com o primeiro estudo de *microarray* do biofilme dessa bactéria, que mostrou apenas 1% de genes sendo regulados (Whiteley et al., 2001). Esta análise mais abrangente mostrou que a expressão gênica das células no biofilme difere significativamente das células planctônicas. Além disso, células em

microambientes únicos dentro da arquitetura tridimensional do biofilme exibem comportamentos marcadamente diferentes (Heacock-Kang et al., 2017).

Interessantemente, o estudo anterior também revelou a regulação positiva do operon de biossíntese flagelar, especificamente, na região localizada no meio do biofilme maduro de *P. aeruginosa* (Heacock-Kang et al., 2017). Na discussão desses resultados, os autores sugerem que o padrão de expressão gênica apresentado poderia se correlacionar diretamente com o fenótipo de dispersão do biofilme de PAO1, descrito anteriormente (Boles et al., 2005).

Portanto, a abordagem transcriptômica por microarranjos de DNA ou DNA *microarray* tem contribuído para a melhor compreensão dos complexos sistemas regulatórios que controlam a expressão gênica nos diversos processos biológicos da bactéria *P. aeruginosa*, como por exemplo, no desenvolvimento do biofilme e na motilidade bacteriana. Por outro lado, é importante ressaltar que muitas das discordâncias observadas podem ser atribuídas as diferentes condições experimentais analisadas. Assim sendo, no nosso estudo optamos por utilizar uma condição de crescimento mais abrangente, já bem estabelecida na literatura, onde a produção de raminolipídeos é significativamente maior.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Caracterizar e comparar o perfil de expressão gênica de duas linhagens de *P. aeruginosa* PAO1 (selvagem - PAO1 e nocaute - PAO1 $\Delta rhlA$) em condições adequadas de crescimento microbiano para a maior produção de raminolipídeos através de uma abordagem transcriptômica utilizando microarranjos de DNA.

3.2. Objetivos Específicos

- Empregar microarranjos de DNA como estratégia de análise transcriptômica global;
- Identificar genes diferencialmente expressos relacionados à presença ou ausência de biosurfactantes do tipo raminolipídeos;
- Confirmar por PCR em tempo real (RT-qPCR) genes de interesse previamente selecionados através das análises de microarranjos de DNA;
- Analisar o perfil fenotípico de motilidade do tipo *swarming* das cepas estudadas;
- Investigar o perfil de expressão gênica de genes relacionados com a biossíntese de componentes da matriz extracelular do biofilme de *P. aeruginosa* PAO1;
- Elucidar possíveis mecanismos moleculares envolvidos na dinâmica regulatória dos raminolipídeos sobre diferentes fenótipos de *P. aeruginosa* PAO1.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Manutenção das Cepas Estudadas e Curva de Crescimento

Os microrganismos utilizados no estudo foram armazenados a - 80 °C, em meio *Lysogeny Broth* (LB; 10 g/L triptona, 5 g/L extrato de levedura, 5 g/L NaCl; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) suplementado com 20% (v/v) de glicerol. A cepa selvagem de *P. aeruginosa* (PAO1 ATCC® 15692™) foi cedida pela Professora Lucimar Milagres da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). A cepa nocaute PAO1 $\Delta rhlA$ ($\Delta rhlA::Gm^R$) foi cedida pela Professora Glória Soberón-Chávez da *Universidad Nacional Autónoma de México* (UNAM).

O crescimento das cepas foi realizado em frascos *erlemmeyers* de 250 mL contendo 100 mL de meio LB, submetidos à agitação até o início da fase estacionária de crescimento, durante cerca de 14 horas em *shaker* a 170 rpm e 30 °C. As culturas bacterianas que compreendem em grande parte as células planctônicas foram então mantidas em condições dinâmicas de crescimento até a coleta. A curva de crescimento foi realizada em triplicatas com posterior quantificação através da medição da D.O. 600 nm. As células planctônicas foram coletadas com aproximadamente D.O. 600 nm = 2,0. Foi retirada uma alíquota da suspensão dos caldos líquidos para a extração de RNA total.

4.2. Extração de RNA Total

O RNA total foi obtido a partir das culturas bacterianas no início da fase estacionária de crescimento com o *RNeasy® Protect Bacteria Mini Kit* (QIAGEN, Hilden, Alemanha), de acordo com as recomendações do fabricante. Após a extração do RNA total, o mesmo foi tratado com 1U/μl de DNase I (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA) e armazenado em ultrafreezer a - 80 °C para as análises moleculares posteriores. A integridade e a qualidade do material genético extraído foram avaliadas através de gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. As concentrações e o grau de pureza dos RNAs foram determinados pelo método de espectrofotometria através do *NanoDrop® 2000* (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA).

4.3. Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA nas reações de PCR em tempo real (RT-qPCR) utilizou-se o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Foster City, EUA), conforme as instruções do fabricante.

4.4. Caracterização da Cepa Mutante por PCR em Tempo Real (RT-qPCR)

A cepa nocaute PAO1 $\Delta rhlA$ utilizada no estudo foi confirmada através da avaliação da expressão do operon *rhlAB* por PCR em tempo real (RT-qPCR), a fim de se verificar os níveis de RNAm dos genes *rhlA* e *rhlB*, envolvidos na biossíntese de raminolipídeos. O RNA Ribossomal 16S (RNAr 16S) foi empregado como controle endógeno. As reações foram realizadas na plataforma *Real-Time PCR Detection Systems* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Os primers com as sondas TaqMan foram sintetizados pela Life Technologies (Applied Biosystems, Foster City, EUA), conforme descrito a seguir: *16sRNA* F – ACCTGGACTGATACTGACACTGA R – GTGGACTACCAGGGTATCTAATCCT FAM – TCCCCACGCTTTTCG – NFQ; *rhlA* F – GACTGAACCAGGCGATGCT R – TTGTCGTCCAGCTCGATCAG FAM – CCGCCCGACGTAGTC – NFQ; *rhlB* F – GCGTGGTCTGCCTGTTC R – GGGTTGCGGCCAATCCT FAM – TCGCGCCGCCCCAG – NFQ. Para a análise da expressão gênica foi utilizado o método de quantificação relativa de $\Delta\Delta C_q$ (Livak & Schmittgen, 2001).

4.5. Avaliação do Perfil de Expressão Gênica Global por Microarranjos de DNA

Para a avaliação do perfil de expressão gênica global foi utilizado o Gene Chip® *P. aeruginosa Genome Array* (Affymetrix, Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA), que contém o genoma anotado da cepa PAO1, contendo 5.549 sequências codificantes de proteínas (ORFs), 18 genes de tRNA, um representante do *cluster* de RNA ribossômico e 117 genes presentes em cepas diferentes de PAO1. Além disso, o Chip também inclui 199 conjuntos de sondas correspondentes a todas as regiões intergênicas que excedem 600 pares de bases.

Procedendo as recomendações do fabricante para a análise de expressão gênica por microarranjos de DNA em procariotos, utilizamos para a síntese de cDNA a enzima *SuperScript*

II Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA), após a hibridização com 75 ng/μl de random primers. Posteriormente, foi realizada a remoção de RNA com solução a 1M de NaOH e neutralização com 1M HCl. O kit *MinElute PCR Purification* (QIAGEN, Hilden, Alemanha) foi utilizado para a purificação do cDNA, que foi quantificado e submetido às etapas de fragmentação (1,6 μg). Em seguida, foram realizadas a marcação terminal com biotina, a hibridização, a lavagem e o escaneamento. Os experimentos foram realizados em três réplicas biológicas. As diferenças de expressão foram avaliadas por meio de análises comparativas e emparelhadas entre os grupos desejados, com *fold change* $\leq -1,5$ ou $\geq 1,5$. Os genes foram considerados diferencialmente expressos na mutante nocaute PAO1 $\Delta rhIA$ em comparação com a cepa selvagem.

Os dados obtidos foram processados no *software Transcriptome Analysis Console* (TAC), versão 4.02 (Affymetrix, Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, EUA), onde se utilizou a abordagem *Gene Level Differential Expression Analysis* e o teste ANOVA, com significância estatística $p < 0,05$ e FDR (*False Discovery Rate*) de 5%. As ferramentas DIAMOND (Buchfink et al., 2015) e PseudoCAP (Winsor et al., 2005) também foram utilizadas para a identificação de proteínas. As categorias funcionais foram determinadas através do banco de dados do COG (Tatusov et al., 2000).

A plataforma utilizada para a análise transcriptômica global (tecnologia de DNA *microarray*) foi a da empresa Affymetrix disponibilizada, gentilmente, pelas pesquisadoras Renata Binato Gomes e Eliana Saull Furquim Werneck Abdelhay do Instituto Nacional de Câncer (INCA).

4.6. Validação de Genes Diferencialmente Expressos por RT-qPCR

Os genes diferencialmente expressos relacionados com a motilidade bacteriana e, consequentemente, com a biossíntese flagelar (*fliC*, *flgL*, *fliD* e *fliT*) foram selecionados para validação através da PCR em tempo real. O gene utilizado como normalizador (controle endógeno) foi o *16sRNA* e as reações foram realizadas na plataforma *Real-Time PCR Detection Systems* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA), de acordo com as instruções do fabricante utilizando o fluoróforo SYBR Green qPCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Para a amplificação, cerca de 100 ng/μL de cDNA obtido anteriormente foi adicionado a reação contendo 7,5 μL do SYBR Green qPCR Master Mix, 0,4 μM de cada primer (sense e

anti-sense) em uma reação com volume final de 15 μ L. As condições da RT- qPCR estão descritas a seguir: pré-incubação 95°C/2 min; desnaturação 95°C/15 seg; anelamento 60°C/1 min; alongamento 95°C/15 seg em um total de 40 ciclos e curva de melt ao final (65°C - 95°C/0,5°C e 5 seg).

Os primers foram desenhados com o auxílio da ferramenta online Primer3Plus (Untergasser et al., 2007) e alguns parâmetros foram analisados a partir do *software* Beacon Designer (Thornton & Chhandak, 2011) para otimização das sequências de oligonucleotídeos obtidas. As sequências descritas abaixo na Tabela 2 foram então utilizadas nas reações de RT-qPCR que se sucederam.

Tabela 2. Lista de primers empregados para validação por RT-qPCR.

<i>16sRNA</i>	F – GTGTAGCGGTGAAATGCGTAG R – AGTGTCAGTATCAGTCCAG
<i>fliC</i>	F – CCACCATCATTACCGACAACCTCC R – ATTTACCGTTTGCCGCCTT
<i>flgL</i>	F – CAGTCAATACAAGTCGGGCATCAC R – GCAGGTTTCAGCAGTTCGTCC
<i>fliD</i>	F – AGGCGGCAAACGGTGAAAT R – GATGAACCTTGGTGAGGGTGTTGTAG
<i>fliT</i>	F – CATCGGTGAGCTGGATCAGG R – GAACATCTGGTAGACCTTGCGC

Para a quantificação relativa da expressão gênica foi utilizado o método de $\Delta\Delta C_q$ (Livak & Schmittgen, 2001). As recomendações mínimas para experimentos de RT-qPCR foram consultadas através do MIQE (Bustin et al., 2009).

4.7. Investigação dos Genes Envolvidos na Formação de Biofilmes

O PCR em tempo real (RT-qPCR) foi também utilizado para a medição da expressão dos genes *algD*, *pelf*, *pilA*, *pslA* e *pslC*. O RNAr 16S (*16sRNA*) foi utilizado como controle endógeno. Os genes selecionados para a investigação, as proteínas respectivas e suas funções estão descritas na Tabela 3, apresentada a seguir.

Tabela 3. Lista de genes selecionados envolvidos com biofilme para investigação.

Genes	Enzima	Função
<i>algD</i>	GDP-manose 6-desidrogenase	Biossíntese de alginato (exopolissacarídeo)
<i>pelF</i>	Glicose transferase	Biossíntese de Pel (exopolissacarídeo)
<i>pilA</i>	Fimbria Tipo IV	Motilidade por <i>twitching</i> e biofilme
<i>pslA</i>	Glicose glicosil transferase	Biossíntese de Psl (exopolissacarídeo)
<i>pslC</i>	Raminose glicosil transferase	Biossíntese de Psl (exopolissacarídeo)

Todas as reações de PCR em tempo real foram realizadas na plataforma *CFX96 Real-Time PCR Detection Systems* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA), seguindo as recomendações do fabricante. Para a quantificação dos níveis de RNAm dos genes selecionados foi utilizado o método de quantificação relativa de $\Delta\Delta C_q$ (Livak & Schmittgen, 2001). Nas reações de RT-qPCR foram utilizados primers contendo sonda TaqMan, devidamente sintetizados pela Life Technologies (Applied Biosystems, Foster City, EUA), conforme as sequências da Tabela 4.

Tabela 4. Lista de primers utilizados para o estudo de genes envolvidos com biofilme.

<i>16sRNA</i>	F – ACCTGGACTGATACTGACACTGA R – GTGGACTACCAGGGTATCTAATCCT FAM – TCCCCACGCTTTCG – NFQ	Applied Biosystem
<i>algD</i>	F – GCCGATCATCCGCAAGAC R – AGACGTTGCAGGTGTACTTGAT FAM – CATCTCGGCGACCTCG – NFQ	Applied Biosystem
<i>pelF</i>	F – CCGATCGTCGCCCTCTAC R – CCGGTCCAGGCATCGA FAM – CCAGCGCCAGGTACT – NFQ	Applied Biosystem
<i>pilA</i>	F – CGTGGAATTGCTGGTAGCAAAATTAAA R – GGCTCGACGCCGACAT FAM – CTGCGACCGAAACAT – NFQ	Applied Biosystem
<i>pslA</i>	F – CCGCCTGCGGCAATT R – CCGGAAGGCAGCCATGT FAM – CCAGCAGGACGTTTAC – NFQ	Applied Biosystem
<i>pslC</i>	F – CGCCTACCGCAGCGA R – GCTGCCGATGACGTCTTC FAM – TCGGCGACTTCCCC – NFQ	Applied Biosystem

4.8. Produção de Raminolipídeos

Os raminolipídeos foram obtidos conforme descrito anteriormente (Tavares et al., 2013). Resumidamente, *P. aeruginosa* PAO1 foi inicialmente cultivada durante a noite em caldo LB, a 28 °C, a partir de estoques a - 80 °C e inoculada em frascos de 1 L contendo 300 mL de meio de pré-produção (K_2HPO_4 7 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, $NaNO_3$ 1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g/L, glicerol 30 g/L, extrato de levedura 5 g/L, bacto-peptona 5 g/L) e incubado a 28 °C a 170 rpm em um agitador rotativo por 40 horas. Os pellets bacterianos foram então coletados por centrifugação a $6.000 \times g$ por 25 min a 25 °C e inoculados em frascos de 250 mL contendo 125 mL de meio de produção de sal mineral otimizado (MSP) (K_2HPO_4 7 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, $NaNO_3$ 1,4 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g/L, glicerol 30 g/L); para uma concentração final de 1 g/L (peso seco). A produção de biossurfactantes foi realizada por 10 dias a 28 °C e 170 rpm.

4.9. Extração e Quantificação de Raminolipídeos

Os sobrenadantes provenientes da cultura foram obtidos por centrifugação a $6.000 \times g$ por 25 min, a 15 °C e acidificados com HCl 1 N em pH 3,5, após a adição de acetato de etila na proporção de 1:3. Os raminolipídeos foram então extraídos para a fase orgânica e secos com um evaporador rotativo HetoDrywinner (Heto-Holten, Gydevank, Dinamarca). A preparação resultante foi dissolvida em metanol, liofilizada e armazenada a - 20 °C. Antes do uso, uma suspensão de $8,35 \pm 0,26 \mu g/mL$ foi preparada em solução de eletrólito. A quantificação de raminolipídeos foi realizada através da quantificação indireta de L-raminose por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Para quantificação da L-raminose, foram adicionados 100 μL de uma solução de ácido sulfúrico 10 M a 1 mL de solução eletrolítica e aquecidos a 100 °C por 4 horas. A solução hidrolisada foi neutralizada com 10 M de hidróxido de sódio, filtrada com uma membrana de 0,22 μm e analisada por HPLC. O sistema de HPLC utilizado nesse estudo foi um Agilent 1260 Infinity (Santa Clara, CA, EUA) com um detector de índice de refração. A coluna analítica foi um Aminex HPX-87H (BioRad1), a fase móvel 5 mM de ácido sulfúrico com vazão de 0,6 mL/min e temperatura do forno de 45 °C. A reação foi realizada em triplicatas e um fator de conversão espectrométrico de massa 2,5 foram aplicados para converter a concentração de L-raminose em raminolipídeos (Dobler et al., 2017).

4.10. Ensaio de Motilidade do Tipo *Swarming* em Placa

Os ensaios de *swarming* foram realizados em placas contendo ágar 0,5%, M8 5X suplementado com 0,2% de glicose, 0,5% de triptona e 1 mM de MgSO₄ (Ha et al., 2014). Foram adicionados 2,5 µL das culturas no centro da placa e incubou-se a 30 °C por 48 horas. No caso da cepa nocaute PAO1 $\Delta rhIA$ suplementada com adição de raminolípídeo exógeno, foi adicionada uma solução de raminolípídeos eletrolítica aquosa imediatamente antes da aplicação no meio de *swarming*, com concentração final de 4,0 µg/µL.

4.11. Análise Estatística

As amostras foram comparadas quanto aos níveis de expressão da cepa nocaute PAO1 $\Delta rhIA$ e controle PAO1, utilizando o teste *t* pareado do programa Graphpad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA). O nível de significância estabelecido foi de 95% ($p < 0,05$).

4.12. Depósito de Dados

Os conjuntos de dados gerados durante o estudo foram disponibilizados através do repositório *Gene Expression Omnibus* (GEO) do NCBI, sob o número de acesso GSE163816.

5. RESULTADOS

5.1. Perfil de Expressão Gênica da Cepas *Pseudomonas aeruginosa* Deficiente em *rhlA* (PAO1 $\Delta rhlA$) Não Produtora de HAA e Raminolipídeos na Fase Estacionária de Crescimento

5.1.1. Caracterização da Cepas Mutante por PCR em Tempo Real (RT-qPCR)

A cepa nocaute $\Delta rhlA::Gm^R$, derivada de PAO1, deficiente na biossíntese de raminolipídeos, foi submetida à confirmação através da PCR em tempo real (RT-qPCR). A mutante nocaute foi construída a partir de uma inserção de um cassete de resistência à gentamicina (Gm^R) no gene *rhlA* (Rahim et al., 2001).

A biossíntese de raminolipídeos ocorre majoritariamente em fase estacionária de crescimento, sendo controlada por QS (Dusane et al., 2010; Lee & Zhang, 2015; Dobler et al., 2016). Os congêneres raminolipídeos mais abundantes produzidos por *P. aeruginosa* são L-raminosil-3-hidroxidecanoil-3-hidroxidecanoato (mono-raminolipídeo) e L-raminosil-L-raminosil-3-hidroxidecanoil-3-hidroxidecanoato (di-raminolipídeo).

Para a produção de HAA um biossurfactante da classe ácido graxo dessa bactéria e também o precursor da biossíntese dos mono-raminolipídeos, a atividade da enzima RhlA é essencial. Os genes *rhlA* e *rhlB* se localizam no operon *rhlAB* e compartilham o mesmo mecanismo regulatório. Logo, a expressão de ambos os genes (*rhlA* e *rhlB*) foi examinada.

Os resultados observados mostram a expressão gênica dos genes *rhlA* e *rhlB* totalmente abolida na cepa nocaute PAO1 $\Delta rhlA$ em comparação com a cepa selvagem PAO1, em condições adequadas para a maior produção de raminolipídeos (Figura 4). Portanto, a cepa nocaute é deficiente na produção de HAA, mono-raminolipídeos e di-raminolipídeos, uma vez que as reações são sequenciais ocasionando o impedimento da biossíntese dos três compostos.

A verificação do efeito polar na cepa PAO1 $\Delta rhlA$ foi confirmada por RT-qPCR, nas mesmas condições de crescimento planejadas para a avaliação transcriptômica global (Figura 4). Posteriormente, foi realizado o Sequenciamento de Sanger da mutante, a partir dos produtos de PCR obtidos com primers flanquadores específicos, desenhados para o operon *rhlAB* (dados não mostrados). A mutação na cepa nocauteada produziu um efeito polar e aboliu a expressão dos genes *rhlA* e *rhlB*.

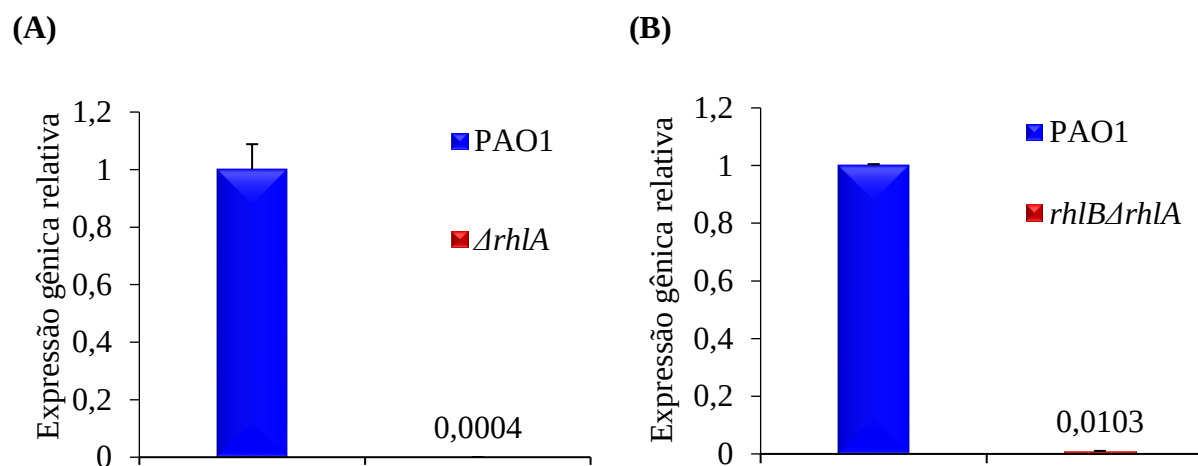


Figura 4. Caracterização da cepa mutante PAO1 $\Delta rhlA$ para análise de expressão gênica global por microarranjos de DNA. Os gráficos representam os níveis de RNAm normalizados pelos níveis do gene *16sRNA*, que foi utilizado como controle endógeno. **(A)** O gene *rhlA* nocauteado na cepa PAO1 $\Delta rhlA$ teve a sua expressão completamente reprimida. **(B)** O gene *rhlB* que integra o mesmo operon do gene *rhlA* também teve a sua expressão gênica medida por RT-qPCR, apresentando níveis muito baixos. Os valores de expressão dos genes *rhlA* e *rhlB* para a cepa PAO1 $\Delta rhlA::Gm^R$ são relativos ao controle - cepa selvagem PAO1, considerado valor 1,0. Para o cálculo foi utilizado o método de $\Delta\Delta Cq$. Barras indicam $\pm$ erro padrão.

Em seguida, prosseguimos para a etapa de crescimento até o início da fase estacionária, na qual ocorre uma abundante produção de raminolipídeos. O fitness da mutante PAO1 $\Delta rhlA$ não exibiu alterações relevantes durante o seu crescimento (Figura 5). Assim sendo, o RNA total foi obtido das células planctônicas provenientes de cultivos agitados continuamente, por cerca de 14 horas de crescimento a 170 rpm e 30 °C.

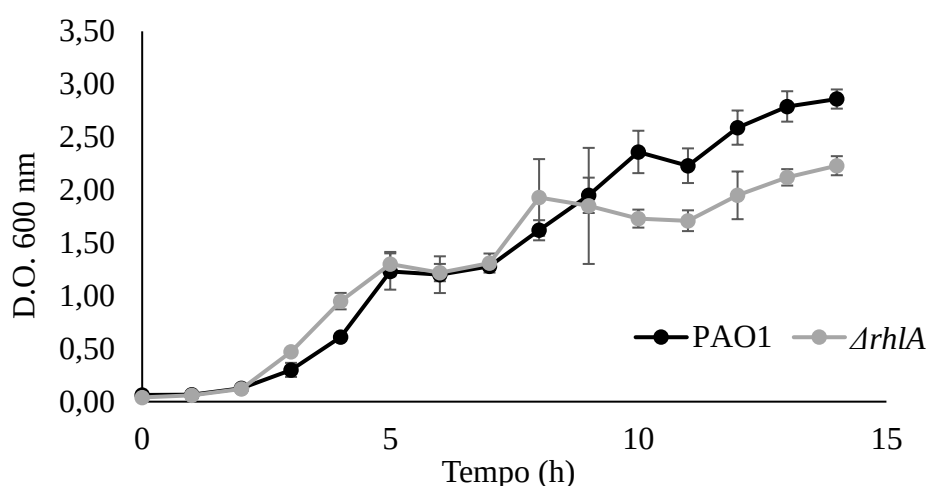


Figura 5. Curva de crescimento da cepa PAO1 selvagem e isogênica mutante $\Delta rhlA$. As cepas foram cultivadas sob agitação a 170 rpm e 30 °C. A curva de quantificação D.O. 600 nm foi realizada em triplicatas. As células planctônicas foram coletadas no início da fase estacionária (aproximadamente D.O. 600 nm = 2,0 e 14 horas de crescimento).

5.1.2. Extração de RNA Total

A extração de RNA total foi realizada a partir das amostras obtidas de suspensões das culturas bacterianas de PAO1 e PAO1 $\Delta rhlA$, crescidas em meio líquido nutritivo sob agitação, contendo células planctônicas no início da fase estacionária de crescimento por 14 horas a 170 rpm e 30 °C. Para posterior análise por microarranjos de DNA, a concentração do RNA total extraído e a sua integridade devem seguir alguns parâmetros rígidos de qualidade. Em vista disso, na quantificação por espectrofotometria a relação A260/280 deve ser de aproximadamente 2,0, podendo apresentar intervalos entre 1,8 e 2,1. As bandas 23S e 16S do RNAr 16S devem se apresentar nítidas, claras e sem manchas evidentes.

A quantificação das amostras obtidas após a extração se mostrou devidamente adequada e a qualidade do RNA total extraído avaliada por eletroforese foi considerada satisfatória, não sendo observada a degradação do ácido nucleico. Entretanto, a indicação da presença de contaminação por DNA cromossômico (bandas de alto peso molecular presentes na região superior do gel) exigiu um tratamento adicional com DNase I, antes da etapa de síntese de cDNA (Figura 6).

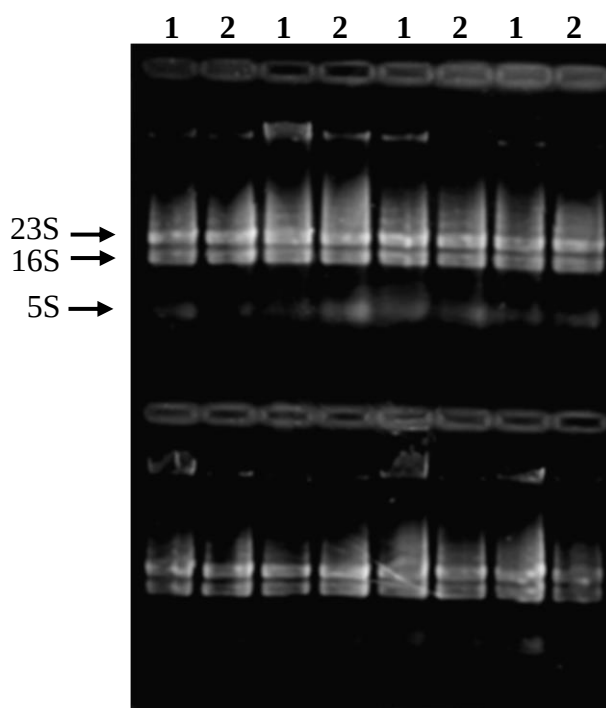


Figura 6. Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. As amostras de RNA total antes do tratamento com DNase tiveram a sua integridade e qualidade avaliadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (1 - cepa selvagem e 2- cepa mutante).

Em seguida, foi realizada a síntese de cDNA e os demais procedimentos para a avaliação do perfil de expressão gênica global através de microarranjos de DNA.

5.1.3. Avaliação do Perfil de Expressão Gênica Global por Microarranjos de DNA

Observando o panorama geral para a caracterização e comparação do perfil de expressão gênica de PAO1 e PAO1 $\Delta rhIA$, podemos apontar 134 genes diferencialmente expressos na nocaute em relação à cepa selvagem, sendo 91 genes regulados positivamente e 43 negativamente (Tabela 5).

Tabela 5. Número de genes diferencialmente expressos obtidos por microarranjos de DNA.

	Fold change $\leq -2,0$ ou $\geq 2,0$	Fold change $\leq -1,5$ ou $\geq 1,5$
Genes Induzidos	31	60
Genes Reprimidos	10	33
Total	41	93

O aspecto mais notável da visão geral dos dados de expressão é que a maioria dos genes diferencialmente expressos é regulado positivamente na cepa deficiente na produção de HAA e raminolipídeos.

Na Tabela 6 estão todos os 134 genes regulados na cepa PAO1 $\Delta rhIA$ em relação à cepa selvagem. Nessa tabela, podemos observar a descrição das proteínas devidamente organizadas em suas respectivas categorias funcionais do COG, a identificação dos genes, o fold change e o valor-p.

A Tabela 6 resume os dados de expressão das análises de microarranjo do genoma de *P. aeruginosa* PAO1, mutante $\Delta rhIA$, versus a cepa do tipo selvagem PAO1. Dentre os 134 genes diferencialmente expressos vários foram identificados como genes relacionados à motilidade bacteriana. Curiosamente, a regulação negativa de genes envolvidos na biossíntese flagelar foi, particularmente, significativa e incluiu genes flagelares das classes II, III e IV

(Dasgupta et al., 2003; Dasgupta et al., 2004; Copeland & Weibel, 2009): *fleN* (classe II), *flgL* (classe III), *fliD*, *fliT*, *fliS* (classe II) e *fliC* (classe IV).

Tabela 6. Avaliação transcriptômica global por microarranjos de DNA.

Descrição da Proteína (nome do gene)	Identificação do Gene (ID)	Fold change $\leq -1,5$ ou $\geq 1,5$ (valor-p)
Transporte e metabolismo de aminoácidos [E]		
oxidorreductase (<i>pauB1</i>)	PA0534	+1,92 (0,4745)
glutamato bifuncional N-acetiltransferase/ aminoácido N-acetiltransferase (<i>argJ</i>)	PA4402	-1,55 (0,0643)
proteína transportadora de ligação ao substrato de aminoácido ABC (<i>dguC</i>)	PA5082 [ET]	+1,67 (0,3458)
antiporter arginina/ornitina (<i>arcD</i>)	PA5170	+2,87 (0,0869)
arginina desiminase (<i>arcA</i>)	PA5171	+2,32 (0,1400)
ornitina carbamoiltransferase (<i>arcB</i>)	PA5172	+2,32 (0,1680)
carbamato quinase (<i>arcC</i>)	PA5173	+2,05 (0,1593)
Transporte e metabolismo de carboidratos [G]		
raminosiltransferase B (<i>rhlB</i>)	PA3478	-7,06 (2,43e-05)*
álcool desidrogenase (<i>adhA</i>)	PA5427	+3,08 (0,0262)*
Controle do ciclo celular, divisão celular, partição cromossômica [D]		
regulador de síntese flagelar (<i>fleN</i>)	PA1454 [DN]	-1,56 (0,0212)*
Motilidade celular [N]		
proteína associada a gancho flagelar FlgL (<i>flgL</i>)	PA1087	-1,56 (0,3465)
flagelina tipo B (<i>fliC</i>)	PA1092	-1,56 (0,0246)*
proteína 2 associada a gancho flagelar tipo B (<i>fliD</i>)	PA1094	-1,8 (0,1996)
proteína flagelar FliS (<i>fliS</i>)	PA1095 [NU]	-1,63 (0,0059)*
regulador de síntese flagelar (<i>fleN</i>)	PA1454 [DN]	-1,56 (0,0212)*
provável transdutor de quimiotaxia	PA2788 [NT]	-1,98 (0,0024)*
proteína PilO da biogênese da fímbria tipo 4 (<i>pilO</i>)	PA5042 [NW]	+1,62 (0,0013)*

Biogênese da parede celular/membrana/envelope [M]

proteína hipotética	PA0615	+1,70 (0,0047)*
N-acetilmuramoil-L-alanina amidase (<i>ampDh3</i>)	PA0807	+1,81 (0,0090)*
proteína hipotética	PA1041	-1,68 (0,1110)
provável proteína de secreção	PA1877 [MV]	+1,55 (0,9393)
subunidade do adaptador periplasmático do transportador RND de efluxo múltiplo da família MexX/AmrA (<i>mexX</i>)	PA2019 [MV]	+1,94 (0,0001)*
ADP-L-glicero-D-manoheptose 6-epimerase (<i>rfaD</i>)	PA3337	+3,54 (0,0526)
proteína da família OmpW (<i>oprG</i>)	PA4067	+1,69 (0,1619)
proteína hipotética	PA4638	-1,52 (0,0492)*
lipídeo A desacilase PagL (<i>pagL</i>)	PA4661	+1,85 (0,4024)
proteína hipotética	PA5232 [MV]	+1,78 (0,0003)*

Transporte de coenzima e metabolismo [H]

proteína hipotética	PA2501 [HR]	+1,59 (0,0454)*
provável N-acetilglutaminilglutamina sintetase	PA3460 [HJ]	+1,73 (0,0810)
aminoácido ômega-piruvato transaminase (<i>gabT2</i>)	PA5313	-1,54 (0,5655)

Mecanismos de defesa [V]

alquil hidroperóxido redutase subunidade C (<i>ahpC</i>)	PA0139	+1,53 (0,8085)
proteína de ligação ao DNA /privação celular (<i>dps</i>)	PA0962 [PV]	+2,07 (0,6121)
provável proteína de secreção	PA1877 [MV]	+1,55 (0,9393)
subunidade de permease de transportador RND de efluxo de múltiplas drogas da família AmrB (<i>mexY</i>)	PA2018	+1,61 (0,0022)*
subunidade do adaptador periplasmático do transportador RND de efluxo múltiplo da família MexX/AmrA (<i>mexX</i>)	PA2019 [MV]	+1,94 (0,0001)*
provável transportador de ABC de fusão de permease/ligação de ATP	PA5231	+1,64 (0,0031)*
proteína hipotética	PA5232 [MV]	+1,78 (0,0003)*

Produção e conversão de energia [C]

nitrito redutase (<i>nirS</i>)	PA0519	-1,93 (0,0485)*
fosfato acetiltransferase (<i>pta</i>)	PA0835	+1,65 (0,0491)*
acetato quinase (<i>ackA</i>)	PA0836	+2,28 (0,0294)*
dicarboxilato/aminoácido: simporte de cátions (<i>dctA</i>)	PA1183	+1,89 (0,2199)
dihidrolipoil desidrogenase (<i>lpdV</i>)	PA2250	+1,51 (0,7150)
provável aldeído desidrogenase	PA4899	+1,55 (0,2019)

Estruturas extracelulares [W]

proteína PilO da biogênese da fímbria tipo 4 (<i>pilO</i>)	PA5042 [NW]	+1,62 (0,0013)*
--	-------------	-----------------

Função desconhecida [S]

regulador transcricional da família XRE hipotético	PA1029	+1,96 (0,0705)
proteína contendo domínio EAL hipotética	PA2134	+1,76 (0,1366)
proteína hipotética contendo o domínio DUF1311	PA3021	+1,60 (0,4812)
proteína hipotética contendo o domínio DUF2061	PA3237	+2,00 (0,0819)
proteína hipotética da família CsbD	PA4738	+1,62 (0,4636)
transportador hipotético	PA4739	+1,67 (0,0875)

Predição de função geral [R]

provável proteína flagelar (<i>flaG</i>)	PA1093	-1,78 (0,0300)*
proteína da família VOC hipotética	PA1358	-1,53 (0,1966)
proteína hipotética	PA2501 [HR]	+1,59 (0,0454)*
acetil-CoA sintetase hipotética	PA5475 [KR]	+2,11 (0,2163)

Transporte e metabolismo de íons inorgânicos [P]

proteína de ligação ao DNA /privação celular (<i>dps</i>)	PA0962 [PV]	+2,07 (0,6121)
K ⁺ /H ⁺ + subunidade F antiporter (<i>shaE</i>)	PA1058	+1,51 (0,0454)*
provável proteína de ligação de ATP transportadora ABC	PA2329	-1,62 (0,0486)*
proteína da família da carboximuconolactona descarboxilase hipotética	PA2331	-1,81 (0,0648)
repressor transcricional hipotético	PA2384	-1,67 (0,2341)
ferredoxina Bf associada à bacterioferritina (<i>bfd</i>)	PA3530	-1,59 (0,1018)
Fe (3 ⁺) - receptor de pioquelina (<i>fptA</i>)	PA4221	-1,64 (0,0440)*
catalase (<i>katA</i>)	PA4236	+2,01 (0,0200)*

Tráfego intracelular, secreção e transporte vesicular [U]

proteína do sistema de secreção do tipo 6 (<i>hcp1</i>)	PA0085	+1,56 (0,0616)
proteína flagelar FliS (<i>fliS</i>)	PA1095 [NU]	-1,63 (0,0059)*

Transporte e metabolismo de lipídeos [I]

CoA transferase subunidade A	PA1999	-1,69 (0,0937)
------------------------------	--------	----------------

NAD (P)/oxidoreductase dependente de FAD	PA2566	-1,95 (0,1939)
raminosiltransferase A (<i>rhlA</i>)	PA3479	-23,25 (5,34e-06)*

Mobilome: profagos, transposons [X]

provável proteína V de montagem de placa de base de fago	PA0616	+3,30 (0,1014)
provável proteína de placa de base de fago	PA0617	+1,75 (0,0118)*
provável proteína bacteriófago	PA0618	+2,49 (0,0033)*
provável proteína I da cauda do fago	PA0619	+2,36 (0,0088)*
provável proteína bacteriófago	PA0620	+1,96 (0,0003)*
proteína da família da bainha da cauda do fago hipotética	PA0622	+1,98 (0,0263)*
provável estruturas atômicas de um nanotubo contrátil bactericida	PA0623	+2,80 (0,0761)
proteína hipotética	PA0625	+1,57 (0,0033)*
proteína da cauda do fago hipotética	PA0627	+1,52 (0,0034)*
proteína de controle tardio hipotética	PA0628	+2,40 (0,0006)*
proteína de cauda de fago hipotética	PA0636	+3,06 (0,0043)*
proteína L de cauda de fago menor hipotética	PA0638	+1,79 (0,0082)*
provável proteína de bacteriófago	PA0641	+1,77 (0,0008)*

Modificação pós-tradução, renovação de proteínas, chaperones [O]

desacilase dependente de NAD hipotética	PA1197	+1,55 (0,1084)
proteína da família transglutaminase hipotética	PA1732	+1,51 (0,3182)
endopeptidase Clp dependente de ATP, subunidade proteolítica ClpP (<i>clpP</i>)	PA1801	-1,60 (0,1437)
glutathione S-transferase hipotética	PA3844	-1,66 (0,5253)
DnaK acompanhante molecular (<i>dnaK</i>)	PA4761	+1,95 (0,4562)
fator de troca de nucleotídeos GrpE (<i>grpE</i>)	PA4762	+1,79 (0,3607)

Biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários [Q]

catecol 1,2-dioxigenase (<i>catA</i>)	PA2507	+1,60 (0,7154)
(2,3-dihidroxibenzoil) adenilato sintase (<i>pchD</i>)	PA4228	-1,70 (0,2021)

Mecanismos de transdução de sinal [T]

sensor de histidina quinase de dois componentes (<i>phoQ</i>)	PA1180	+1,51 (0,1353)
regulador transcricional da família Fis dependente de sigma-54 (<i>ddaR</i>)	PA1196 [KT]	+2,58 (0,032)*
provável fosfohistidina fosfatase SixA	PA1616	+1,88 (0,4910)
família universal de proteínas de estresse 7	PA1789	+1,85 (0,4269)

regulador transcricional da família LuxR (<i>vqsR</i>)	PA2591 [TK]	-1,54 (0,0644)
provável transdutor de quimiotaxia	PA2788 [NT]	-1,98 (0,0024)*
provável proteína universal de estresse	PA3017	+1,54 (0,8530)
provável proteína universal de estresse	PA3309	+1,55 (0,3750)
proteína A de choque de fago hipotética	PA3731 [KT]	-1,57 (0,1302)
regulador de resposta do sistema de dois componentes NarL (<i>narL</i>)	PA3879 [TK]	+2,01 (0,1887)
provável proteína universal de estresse	PA4352	+2,85 (0,1249)
provável proteína universal de estresse	PA5027	+1,67 (0,2111)
proteína transportadora de ligação ao substrato de aminoácido ABC (<i>dguC</i>)	PA5082 [ET]	+1,67 (0,3458)

Transcrição [K]

provável regulador transcricional	PA0535	+1,62 (0,4620)
regulador transcricional da família Fis dependente de sigma-54 (<i>ddaR</i>)	PA1196 [KT]	+2,58 (0,0320)*
família TetR do regulador transcricional (<i>mexZ</i>)	PA2020	+2,65 (0,0191)*
fator sigma PvdS (<i>pvdS</i>)	PA2426	-2,48 (0,0526)
regulador transcricional da família LuxR (<i>vqsR</i>)	PA2591 [TK]	-1,54 (0,0644)
proteína de domínio de choque frio (<i>cspD</i>)	PA2622	-2,03 (0,2089)
provável regulador transcricional	PA3458	+1,86 (0,0333)*
proteína A de choque de fago hipotética	PA3731 [KT]	-1,57 (0,1302)
regulador de resposta do sistema de dois componentes NarL (<i>narL</i>)	PA3879 [TK]	+2,01 (0,1887)
acetil-CoA sintetase hipotética	PA5475 [KR]	+2,11 (0,2163)

Tradução, estrutura ribossomal e biogênese [J]

proteína repressora PtrB (<i>ptrB</i>)	PA0612	+2,73 (0,1173)
proteína hipotética	PA1746	+1,72 (0,0005)*
provável proteína contendo o domínio DUF883	PA2754	+2,22 (0,3440)
provável N-acetilglutaminilglutamina sintetase	PA3460 [HJ]	+1,73 (0,0810)
proteína ribossomal S10 30S (<i>rpsJ</i>)	PA4264	-1,54 (0,9831)
proteína ribossômica 30S S20 (<i>rpsT</i>)	PA4563	-1,98 (0,4153)
proteína hipotética	PA4577	+2,07 (0,0943)

Não categorizada pelo COG

proteína contendo o domínio DUF3079 hipotética	PA0200	+2,65 (0,3467)
proteína hipotética	PA0614	+3,30 (0,0001)*
proteína hipotética	PA0621	+2,03 (0,0072)*
proteína hipotética	PA0631	+1,72 (0,0006)*
proteína hipotética	PA0633	+2,13 (0,0207)*

proteína hipotética	PA0635	+2,14 (0,0011)*
proteína hipotética	PA0646	+1,67 (0,0079)*
provável proteína da família do fago holin parcial (<i>alpC</i>)	PA0909	+1,72 (0,0005)*
proteína hipotética (<i>alpE</i>)	PA0911	+1,62 (0,0056)*
provável proteína contendo o domínio DUF5064	PA1076	+1,99 (0,5124)
proteína flagelar FliT**	PA1096	-2,05 (0,0112)*
proteína de imunidade pyocin-S2 (<i>imm2</i>)	PA1151	-2,06 (0,1631)
proteína hipotética	PA1324	+1,78 (0,4821)
proteína hipotética	PA1404	+1,65 (0,5466)
proteína hipotética	PA1545	-2,03 (0,3513)
proteína hipotética	PA1852	-2,15 (0,2880)
proteína hipotética	PA2170	+1,67 (0,0778)
provável proteína contendo o domínio DUF4280	PA2375	-1,54 (0,0135)*
proteína hipotética	PA2433	+1,80 (0,5954)
lectina (<i>lecA</i>)	PA2570	-1,67 (0,4062)
provável proteína contendo o domínio DUF5064	PA2753	+2,74 (0,0800)
proteína contendo o domínio DUF4404 hipotética	PA2805	+1,55 (0,6275)
proteína hipotética	PA2937	-1,65 (0,5770)
proteína hipotética	PA3572	+2,03 (0,1833)
proteína contendo domínio DUF4345 hipotética	PA3788	+1,67 (0,3386)
proteína hipotética	PA4139	-2,28 (0,0364)*
proteína hipotética	PA4220	-1,54 (0,0397)*
proteína hipotética	PA4377	-2,57 (0,0009)*
proteína hipotética	PA4469	-1,50 (0,2612)
proteína hipotética	PA4570	-1,84 (0,0225)*
proteína hipotética	PA4881	+1,55 (0,0584)
proteína hipotética	PA5481	+1,71 (0,5066)

Os asteriscos (*) indicam valores significativamente diferentes estatisticamente, com $p < 0,05$. Asteriscos (**) indicam a proteína flagelar FliT (PA1096) não categorizada pelo COG, que de acordo com o banco de dados (The Pseudomonas Genome Database <https://www.pseudomonas.com/>), poderia estar incluída na categoria Motilidade celular [N]. Genes incluídos em mais de uma categoria estão indicados pelas suas respectivas siglas entre colchetes.

Esses dados revelam um padrão de repressão de genes flagelares, que pode estar diretamente relacionado a fenótipos de motilidade de cepas deficientes em *rhIA*, conforme descrito anteriormente (Köhler et al., 2000; Déziel et al., 2003; Caiazza et al., 2005; Tremblay et al., 2007). De maneira semelhante, a proteína PA3731, anotada como uma proteína de choque fágico, por ter uma estrutura secundária prevista semelhante à de PspA de *E. coli*, foi reprimida na cepa mutante *rhIA*. O gene PA3731 tem um efeito positivo na formação de biofilme e na motilidade de *swarming* em *P. aeruginosa* (Macé et al., 2008).

Por outro lado, foi observada a regulação positiva de *pilO*, um gene que codifica uma proteína envolvida na biossíntese da fímbria tipo IV (Leighton et al., 2015), essencial para a adesão à superfície e a motilidade do tipo *twitching*. Outras categorias funcionais de genes responderam à ausência de RhlA e seus produtos biossintéticos de maneira semelhante. Notavelmente, o *hcp1*, mapeado dentro de um sistema de secreção do tipo VI (SST6) (Sana et al., 2016; Lacourse et al., 2018) de *P. aeruginosa*, mostrou uma regulação positiva (Tabela 6). Vários *loci* que codificam sistemas de dois componentes (TCS) tiveram sua expressão induzida, incluindo *narL* (Francis et al., 2017) e um sensor quinase hipotético (PA1180). A expressão de vários reguladores transcricionais hipotéticos também foi induzida: PA0535 (+1,62), PA3458 (+1,86), PA1196 (+2,58) e PA2020 (+2,65).

Um padrão de indução de expressão gênica foi observado no Mobiloma, uma categoria recentemente incluída no COG, que compreende profagos e transposons [X]: PA0623 (+2,80), PA0620 (+1,96), PA0618 (+2,49), PA0628 (+2,40), PA0616 (+3,30), PA0617 (+1,75), PA0627 (+1,52), PA0619 (+2,36), PA0622 (+1,98), PA0641 (+1,77), PA0625 (+1,57), PA0638 (+1,79) e PA0636 (+3,06). A maioria dos genomas bacterianos contém genomas de fagos, conhecidos como profagos, mantidos em um estado inativo ou lisogênico. A replicação de fagos no ciclo lisogênico é freqüentemente suprimida e a expressão da maioria dos genes de fagos é reprimida (Owen et al., 2020). No entanto, um subconjunto de genes de profago pode ser expresso como uma adaptação evolutiva ao fago, conferindo uma vantagem de condicionamento físico ao hospedeiro bacteriano (Tsao et al., 2018).

Nós investigamos categorias funcionais de *loci* diferencialmente expressos que correspondem a 134 genes na anotação publicada do genoma de *P. aeruginosa*. Conforme ilustrado na Figura 7, as proteínas descritas e seus respectivos IDs foram organizados de acordo com as categorias funcionais obtidas através do banco de dados do COG, mostrando um número expressivo de genes que codificam proteínas envolvidas com a sinalização e mecanismos básicos do metabolismo, sendo positivamente regulados.

Curiosamente, podemos notar que uma parte relevante dos genes que codificam proteínas envolvidas na motilidade celular estão sendo reprimidos. Por outro lado, genes que codificam proteínas relacionadas a mecanismos de defesa, que incluem o sistema SST6 e alguns fatores de virulência, estão sendo regulados positivamente (Figura 7). Vários genes que codificam proteínas hipotéticas ou putativas com funções desconhecidas também tiveram sua expressão gênica induzida.

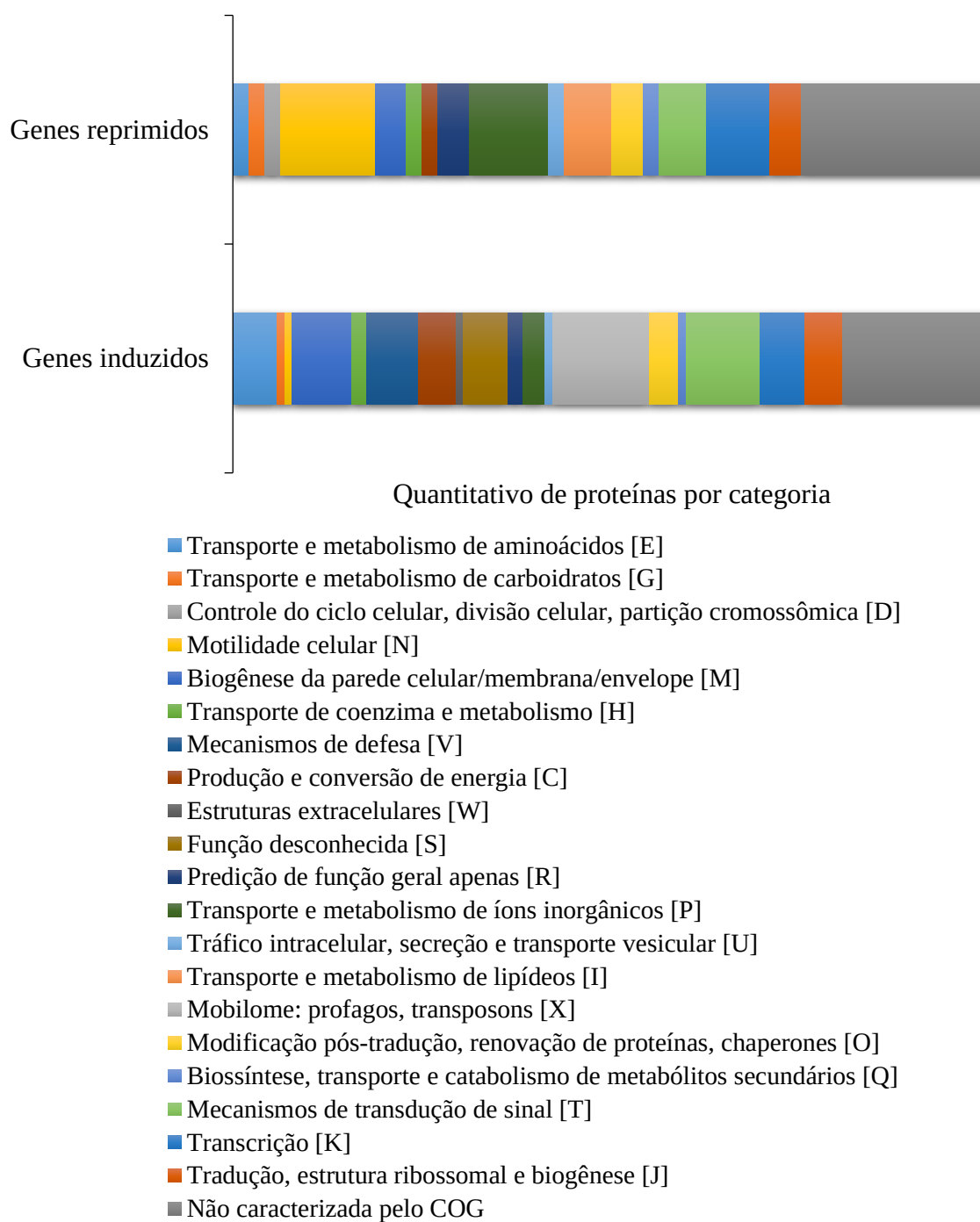


Figura 7. Categorias funcionais dos genes diferencialmente expressos nas análises de microarranjos. Mutante nocaute PAO1 *ΔrhIA* em comparação com a cepa selvagem PAO1 (fold change $\leq -1,5$ ou $\geq 1,5$). A análise foi realizada a partir do banco de dados do COG.

O dendrograma revelou que as amostras de PAO1 (selvagem - réplica 1, réplica 2 e réplica 3) e de *ΔrhIA* (mutante - réplica 1, réplica 2 e réplica 3) estavam agrupadas e em ramos

diferentes, sugerindo uniformidade e reprodutibilidade entre as réplicas biológicas de cada linhagem (Figura 8).

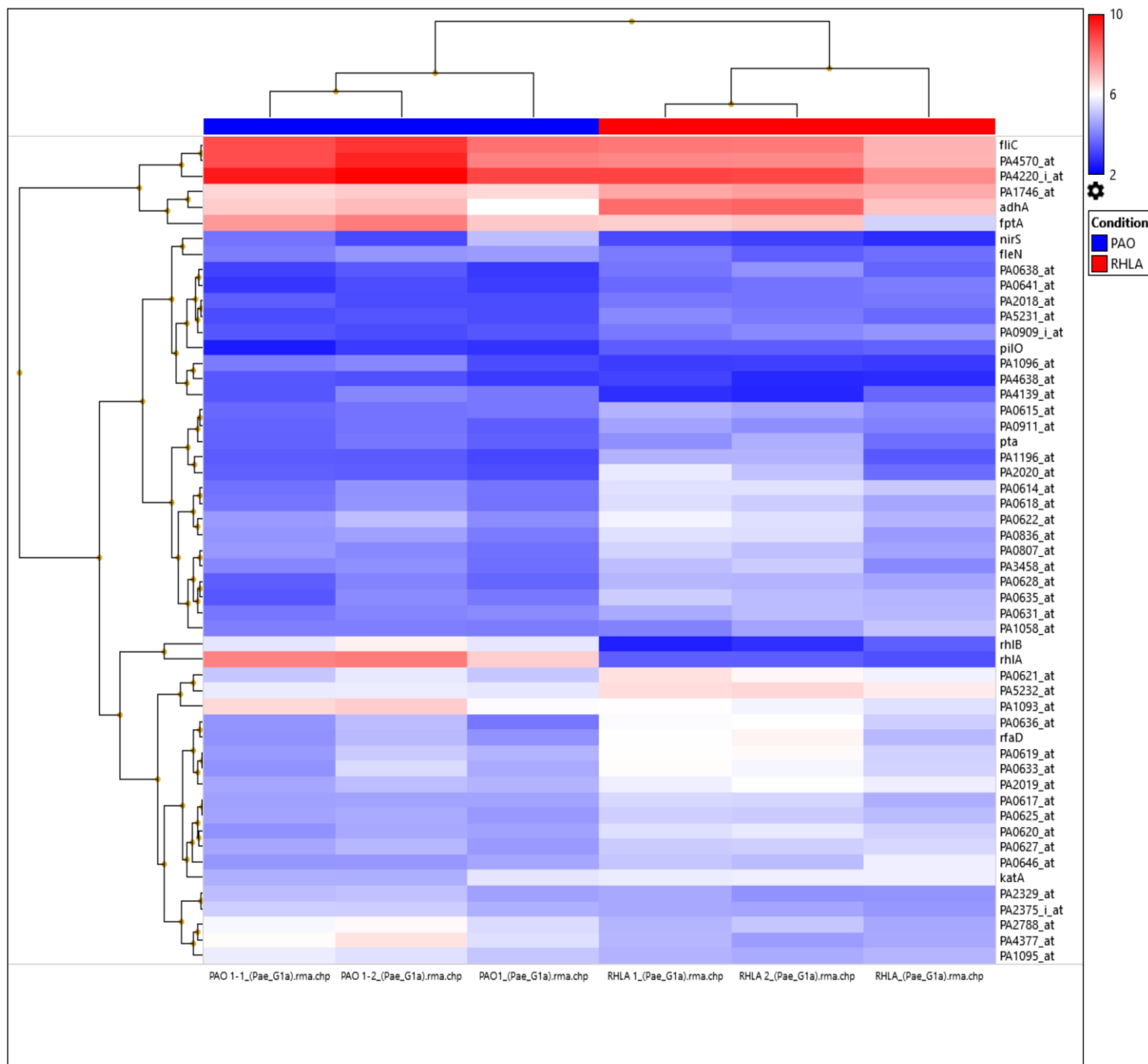


Figura 8. Dendrograma construído a partir dos 53 genes diferencialmente expressos ($p < 0,05$) entre os três grupos de amostras PAO1 e PAO1 Δ rhIA. As diferenças relativas na expressão gênica são proporcionais à intensidade da coloração (heatmap), com o azul se referindo à diminuição da expressão e o vermelho ao aumento (PAO - réplicas 1, 2 e 3 e RHLA - réplicas 1, 2 e 3).

Interessantemente, a maioria dos genes expressos diferencialmente são regulados positivamente na cepa mutante, que não apresenta atividade da enzima RhIA, responsável pela produção de HAA, precursor dos ramípolídeos (Figura 9).

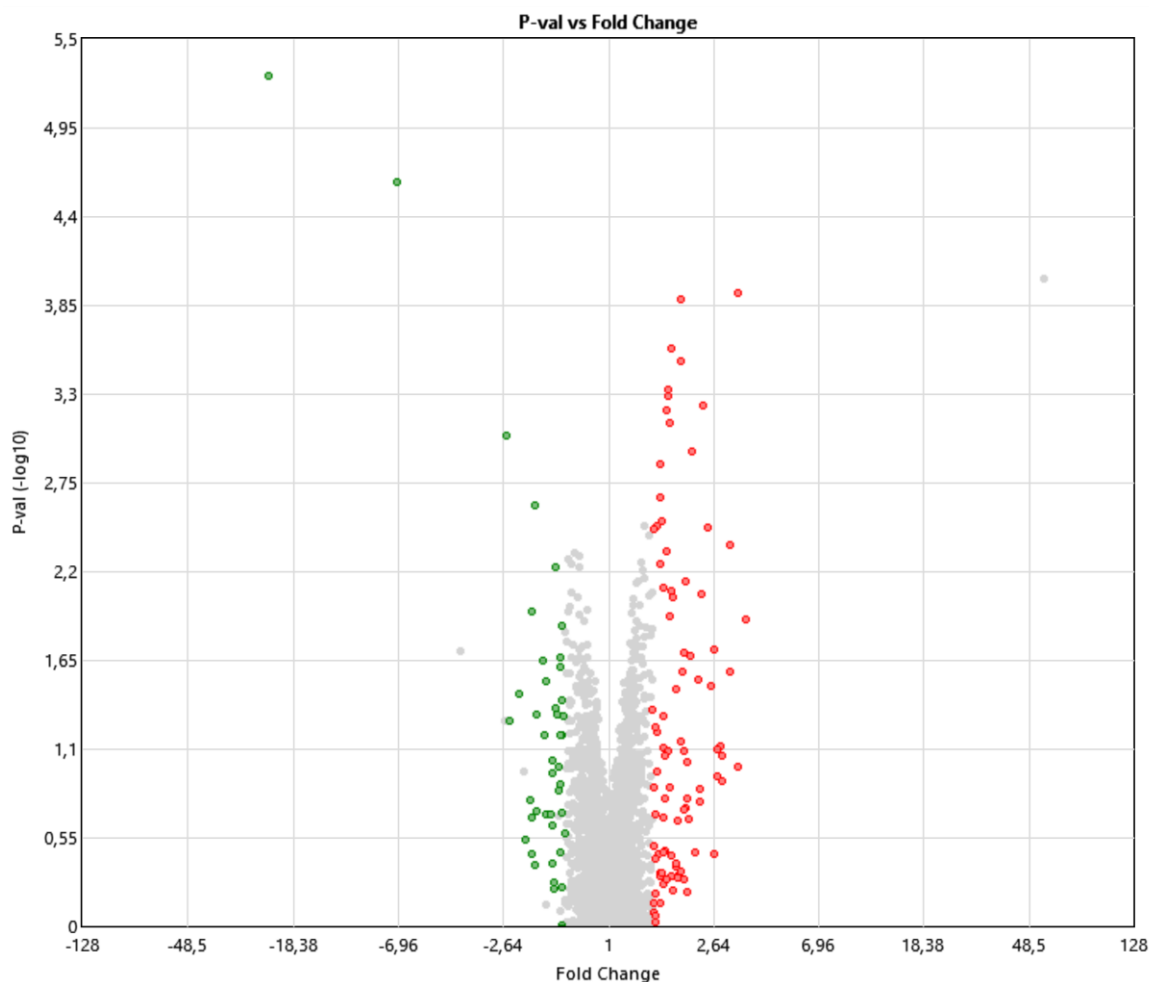


Figura 9. Gráfico de Volcano dos 134 genes expressos diferencialmente na análise de microarranjos. Os pontos verdes são genes regulados negativamente, enquanto os vermelhos são representados como positivamente regulados na mutante PAO1 $\Delta rhIA$ em comparação com a cepa PAO1 ($fold\ change \leq -1,5$ ou $\geq 1,5$).

Os 43 genes que exibiram diminuição da expressão gênica (Tabela 5), foram usados para a construção de uma rede funcional através da ferramenta STRING, onde pudemos identificar o grupo de proteínas relacionado com a biossíntese flagelar (Figura 10).

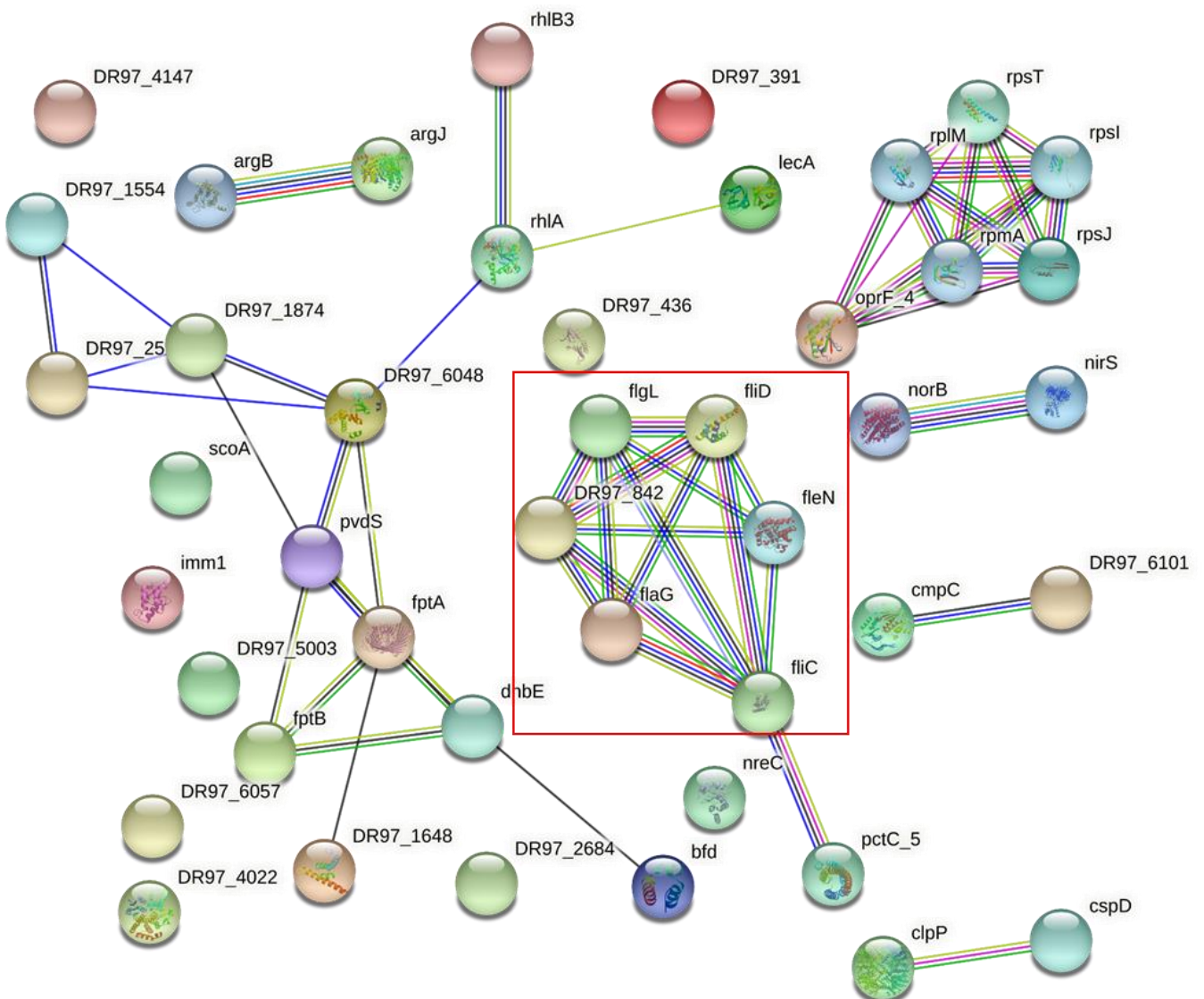


Figura 10. Rede funcional dos 43 genes regulados negativamente na análise de microarranjos. A rede funcional foi construída a partir da análise de múltiplas sequências proteicas. O quadro vermelho destaca as interações entre o grupo que corresponde às proteínas envolvidas com a biossíntese flagelar em *P. aeruginosa*. Os nós da rede indicam as proteínas. Os nós coloridos representam a primeira linha de interação enquanto os brancos compreendem a segunda linha. Os nós vazios representam proteínas de estrutura 3D desconhecida. Os nós preenchidos indicam que alguma estrutura 3D é conhecida ou prevista. As linhas ou arestas representam associações proteína-proteína. As interações conhecidas a partir de bancos de dados com curadoria estão indicadas pela cor azul claro. As interações determinadas experimentalmente são indicadas pela cor lilás. Em verde escuro se encontram as interações previstas a partir dos genes adjacentes; em laranja genes fusionados; e em azul escuro a coocorrência de genes. As demais interações são determinadas por mineração do texto (verde claro), coexpressão (preto) e homologia de proteínas (cinza azulado).

5.2. Genes Envolvidos com a Biossíntese Flagelar Regulados Negativamente na Cepa PAO1 $\Delta rhIA$: Confirmação da Análise de Microarranjos de DNA por RT-qPCR

Para confirmação da abordagem utilizada no presente estudo e comprovação do padrão de repressão gênica dos genes flagelares observados nos resultados do *microarray*, utilizamos a RT-qPCR. Quatro genes flagelares significativamente reprimidos *fliC*, *flgL*, *fliD* e *fliT* foram selecionados com base em sua localização em diferentes *loci* cromossômicos, dentro de operons distintos (Dasgupta et al., 2004). Esses genes são representantes de três níveis diferentes de regulação hierárquica da biossíntese flagelar (Figura 11): classe III (*flgL*), classe II (*fliD* e *fliT*) e classe IV (*fliC*, que codifica uma flagelina do tipo b) (Dasgupta et al., 2004). Além disso, a expressão e montagem flagelar desempenha um papel essencial nas características fenotípicas de *P. aeruginosa* que também estão diretamente associadas à produção de HAA e raminolipídeos, especialmente na motilidade *swarming* (Kohler et al., 2000; Déziel et al., 2003; Caiazza et al., 2005; Tremblay et al., 2007).

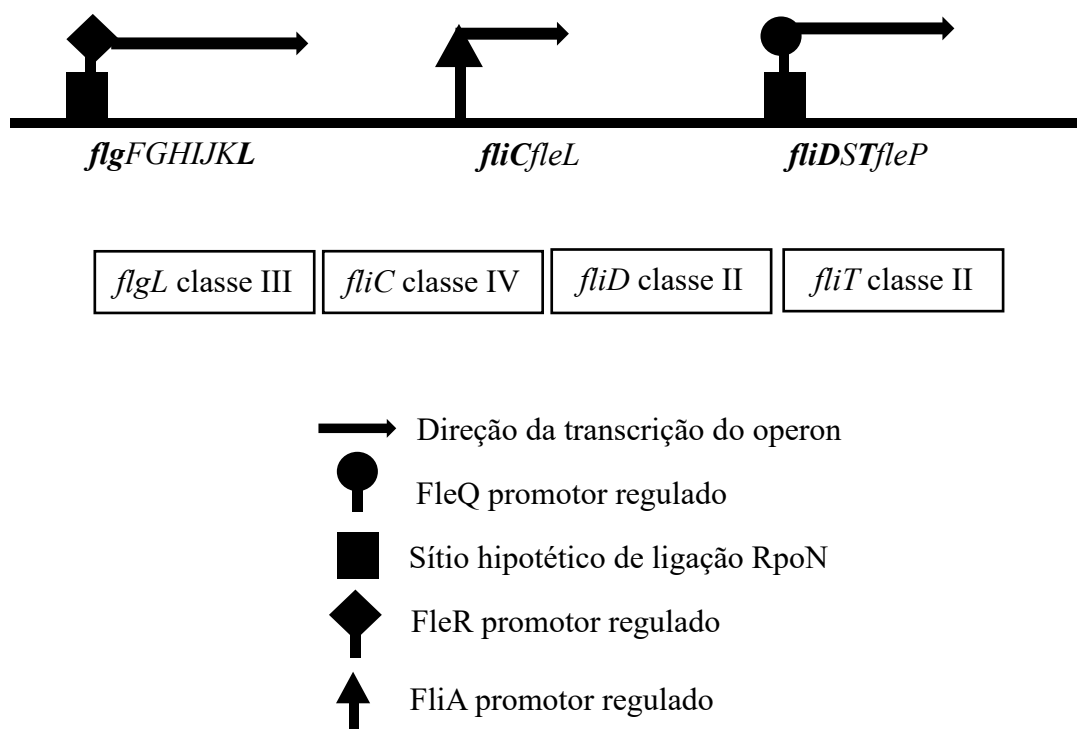


Figura 11. Regulação hierárquica da biossíntese flagelar. Os genes *fliC*, *flgL*, *fliD* e *fliT* se localizam em diferentes operons e compõem diferentes classes no sistema flagelar de *P. aeruginosa*. O gene *fliT* produz uma chaperona que atua em *fliD* (Adaptada de Dasgupta et al., 2004).

A repressão dos genes acima relacionados foi confirmada por RT-qPCR e pode ser observada na Figura 12.

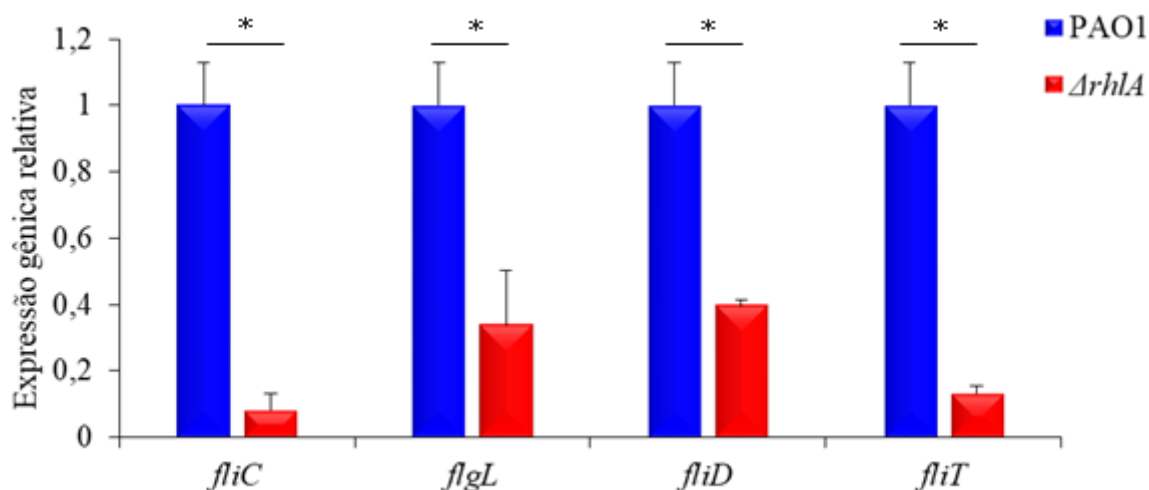


Figura 12. Quantificação da expressão gênica por RT-qPCR dos genes envolvidos com a biossíntese flagelar em *Pseudomonas aeruginosa*. O gráfico representa os níveis de mRNA normalizados nos genes *fliC*, *flgL*, *fliD* e *fliT* pelos níveis do gene *16sRNA*, que foi utilizado como controle endógeno. As barras indicam $\pm$ erro padrão. A expressão relativa foi calculada através do método comparativo de $\Delta\Delta C_q$. Os valores de expressão para os genes de motilidade flagelar da cepa PAO1 $\Delta rhlA$ são relativos ao controle (cepa selvagem PAO1), considerado valor 1,0. Asteriscos (*) indicam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ com o teste t pareado.

A repressão dos genes *fliC* (PA1092), *flgL* (PA1087), *fliD* (PA1094) e *fliT* (PA1096) na cepa deficiente em *rhlA* em comparação com PAO1 foi estatisticamente significativa. O gene *fliC* mostrou 91% de repressão, de acordo com a Tabela 7.

Tabela 7. Percentual de inibição e valores de expressão por RT-qPCR dos genes de biossíntese flagelar validados.

Genes	Expressão Gênica Relativa (RT-qPCR)	Percentual de Inibição %	Valor-p*
<i>fliC</i>	0,0813	91%	0,0220
<i>flgL</i>	0,3383	66%	0,0284
<i>fliD</i>	0,3950	60%	0,0208
<i>fliT</i>	0,1312	86%	0,0021

As proteínas FlgL, FliD e FliC que compõem a estrutura do flagelo estão presentes no meio extracelular (Minamino et al., 2013; Altegoer & Bange, 2015; Diepold & Armitage, 2015). FliT é uma chaperona que garante a exportação adequada e a montagem de proteínas que compõem a maquinaria flagelar, incluindo FliD, que é uma proteína de capeamento do flagelo (Khanra et al., 2016; Xing et al., 2018).

A representação da montagem da estrutura flagelar de *P. aeruginosa*, com destaque para as proteínas FlgL, FliD, FliC e FliT está ilustrada a seguir, na Figura 13.

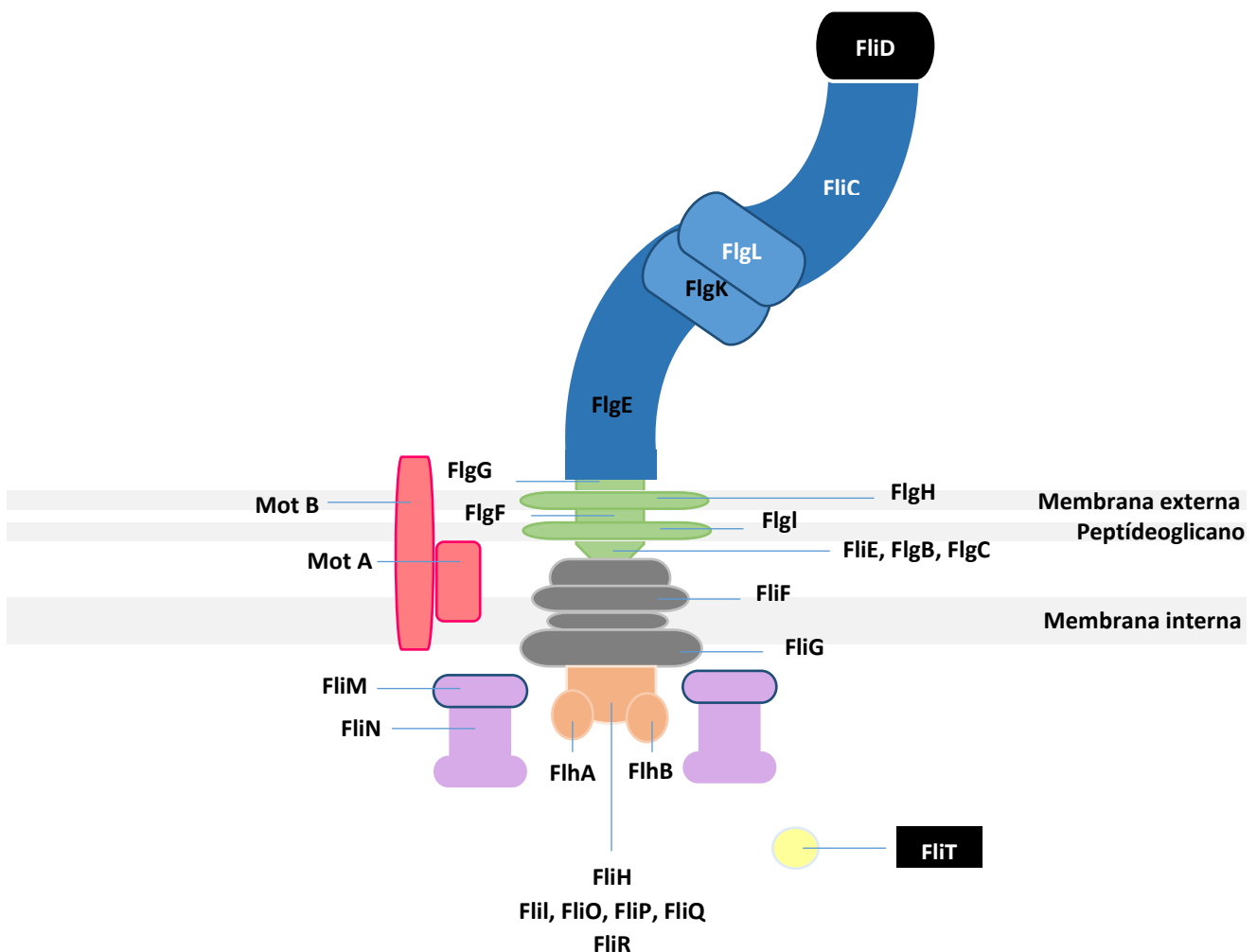


Figura 13. Montagem da estrutura flagelar de *Pseudomonas aeruginosa*. As proteínas FlgL, FliC, FliD e FliT estão destacadas na cor branca. A chaperona FliT está representada no meio intracelular (Adaptada de Nolan et al., 2018).

O flagelo polar único de *P. aeruginosa* é um importante fator de virulência e de colonização desse patógeno oportunista, tendo sido atribuídos papéis fundamentais na formação de biofilme e na motilidade bacteriana (Barken et al., 2008; Kazmierczak et al., 2015).

5.3. Avaliação Fenotípica da Motilidade *Swarming* das Cepas PAO1, PAO1 $\Delta rhIA$ e PAO1 $\Delta rhIA$ Suplementada com Mistura Exógena de HAA e Raminolipídeos

Muitos estudos demonstraram que o *swarming* de *P. aeruginosa* é um processo de adaptação complexo em superfícies sólidas, em um meio viscoso, controlado por um número substancial de genes cooperantes, incluindo *rhIA* (Overhage et al., 2008; Xavier et al., 2011). Dessa forma, para compreendermos melhor o papel dos produtos biossintéticos da enzima *RhIA* no *swarming*, um ensaio em placa foi realizado com a cepa selvagem *P. aeruginosa* PAO1 e sua mutante isogênica PAO1 $\Delta rhIA$.

Para determinar se a cepa mutante de *rhIA* não móvel responde à adição de raminolipídeos exógenos e de HAA, as células foram pré-condicionadas com um extrato raminolipídico obtido do sobrenadante de cultura da cepa selvagem, imediatamente antes da adição do inóculo às placas de *swarming*. Na Figura 14 podemos observar placas contendo meios semissólidos com os padrões de migração de *swarming* da cepa selvagem PAO1, da mutante PAO1 $\Delta rhIA$, que é incapaz de biossintetizar HAA e raminolipídeos, e a mesma cepa mutante após suplementação com um extrato exógeno contendo uma mistura de HAA e raminolipídeos.

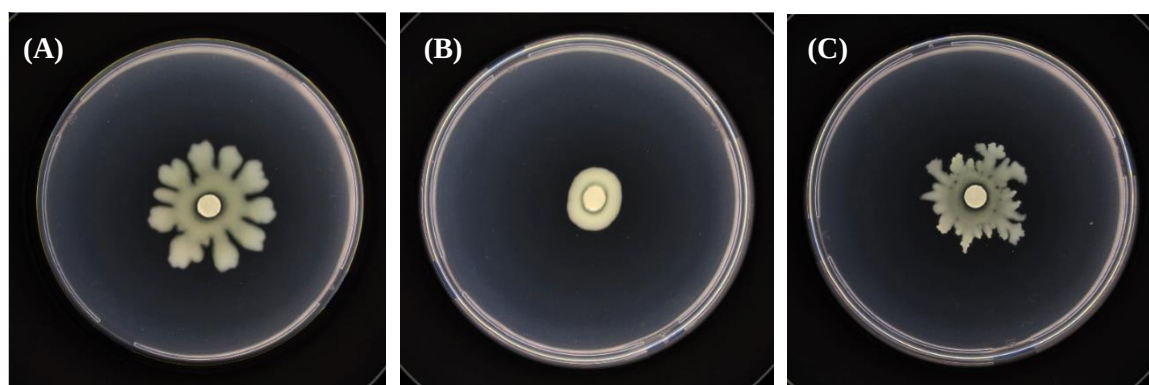


Figura 14. Ensaio de motilidade do tipo *swarming* em *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. (A) *P. aeruginosa* PAO1 selvagem. (B) *P. aeruginosa* nocaute PAO1 $\Delta rhIA::Gm^R$. (C) *P. aeruginosa* nocaute PAO1 $\Delta rhIA::Gm^R$ suplementada com adição exógena de uma mistura contendo HAA e raminolipídeos.

Os padrões de migração observados indicam que o extrato contendo HAA, mono-raminolipídeos e di-raminolipídeos modula o *swarming* na cepa PAO1 $\Delta rhIA$, que responde com a formação de dendritos que migram em direção às regiões periféricas do *swarming* (mais próximas da borda da placa). Portanto, raminolipídeos e/ou HAA atuam como indutores de células natatórias.

5.4. Análise da Expressão de Genes Relacionados à Biossíntese dos Exopolissacarídeos Pel, Psl e Alginato em *P. aeruginosa* PAO1 e sua Derivada Mutante $\Delta rhIA$

Tendo em vista que a expressão dos genes envolvidos na biossíntese dos exopolissacarídeos (EPS) não se mostrou significativamente alterada nas análises de microarranjos de DNA, essa determinação foi realizada diretamente por RT-qPCR. Também avaliamos a expressão do gene *pilA* envolvido na biossíntese da fímbria tipo IV, pois o mesmo não se mostrou diferencialmente expresso na avaliação transcriptômica global.

Estudos já demonstraram a relação inversa entre a motilidade por *swarming*, formação de biofilme e biossíntese de EPS (Caiazza et al., 2007; Merritt et al., 2007). Dessa forma, compreender como os EPSs e a motilidade bacteriana atuam para moldar a arquitetura do biofilme, pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias de controle, particularmente, nos biofilmes de *P. aeruginosa* e sua importância em infecções crônicas e persistentes. Portanto, tivemos o interesse em investigar o perfil de expressão de genes relacionados com a biossíntese de EPS na cepa deficiente na produção de raminolipídeos em comparação com a cepa selvagem, utilizando as mesmas amostras obtidas para as análises de microarranjos de DNA.

De acordo com os nossos resultados (Figura 15), podemos verificar uma indução da expressão gênica dos genes envolvidos na biossíntese dos exopolissacarídeos (*algD*, *pelF*, *pslA* e *pslC*) em *P. aeruginosa* PAO1 $\Delta rhIA$, deficiente na produção de raminolipídeos, quando comparamos com a expressão na cepa selvagem PAO1. Notamos que na ausência de biosurfactantes raminolipídicos e HAA ocorre a repressão da biossíntese flagelar, mas, por outro lado, verificamos que a expressão dos genes biossintéticos dos EPSs Pel e Psl foi regulada positivamente. Os dados obtidos apontam para uma possível relação antagônica entre a regulação dos EPSs e a presença dos raminolipídeos.

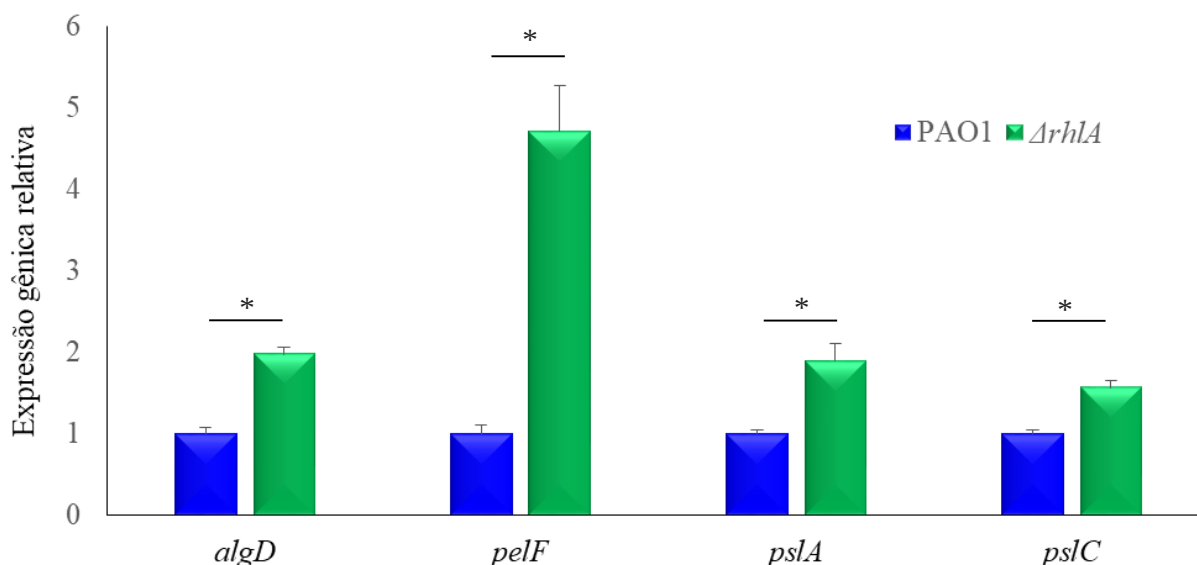


Figura 15. Análise da expressão gênica de genes relacionados com a produção de EPS e motilidade bacteriana em *Pseudomonas aeruginosa*. Os gráficos representam os níveis de RNAm normalizados pelos níveis do gene *16sRNA*, que foi utilizado como controle interno. A expressão relativa foi calculada através do método comparativo de $\Delta\Delta Cq$. Os valores de expressão da mutante PAO1 $\Delta rhlA$ são relativos ao controle - cepa selvagem PAO1, considerado valor 1,0. Barras indicam $\pm$ erro padrão. Asteriscos (*) indicam valores significativamente diferentes em relação ao controle, $p < 0,05$ com o teste t pareado.

Um estudo publicado recentemente também apresentou resultados contrastantes muito similares ao que obtivemos em nossas análises. Os autores observaram que mutantes flagelares superexpressavam os exopolissacarídeos Pel e Psl em biofilmes de *P. aeruginosa* em um modelo *in vitro*, assim como em biofilmes isolados de infecções em pacientes fibrocísticos (Harrison et al., 2020).

Com relação ao gene *pilA*, envolvido com a biossíntese da fímbria tipo IV, e com o fenótipo de motilidade bacteriana *twitching*, foi observada a indução da sua expressão gênica, conforme verificamos no Figura 16. A regulação positiva de *pilA* apresentou um padrão semelhante ao que notamos para os genes *algD*, *pelF*, *pslA* e *pslC*.

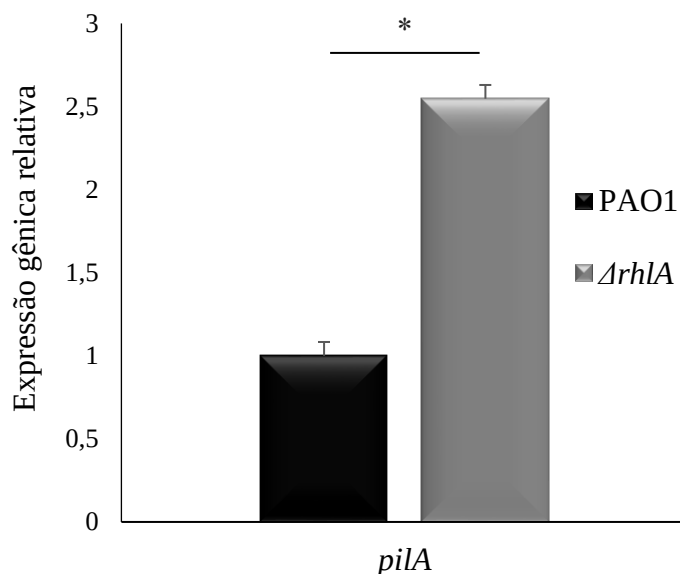


Figura 16. Análise da expressão gênica de *pilA* por RT-qPCR. O gráfico representa os níveis de RNAm normalizados pelos níveis do gene *16sRNA*, que foi utilizado como controle interno. Os valores de expressão da mutante PAO1 $\Delta rhlA$ são relativos ao controle - cepa selvagem PAO1, considerado valor 1,0. A expressão relativa foi calculada através do método comparativo de $\Delta\Delta Cq$. Barras indicam $\pm$ erro padrão. Asteriscos (*) indicam valores significativamente diferentes em relação ao controle, $p < 0,05$ com o teste t pareado.

Alguns estudos já relacionaram o aumento da produção de EPS com a inibição da motilidade do tipo *swarming* (Merritt et al., 2007; Kuchma et al., 2007), fato esse que se corrobora com as nossas observações, onde a cepa nocaute PAO1 $\Delta rhlA$ apresenta a expressão dos genes relacionados à biossíntese de EPS aumentada (*Psl* e *Pel*; Figura 15). Outros autores demonstraram que a produção elevada de *Psl* e/ou *Pel* foi capaz de reduzir a motilidade *swarming* em *P. aeruginosa*. No entanto, foi apontado que a redução observada se sucedeu devido à menor produção de raminolipídeos, porém sem relação com a transcrição de *rhlAB*, dois genes importantes na biossíntese dos biosurfactantes raminolipídicos e HAA. Ou seja, *Psl* e *Pel* não afetaram a transcrição de *rhlAB*, sugerindo que o declínio na produção de raminolipídeos pode envolver mecanismos pós-transcricionais (Wang et al., 2014).

6. DISCUSSÃO

Muitos estudos fornecem evidências de que os raminolipídeos de *P. aeruginosa* podem alterar sua própria membrana celular e também de outras espécies bacterianas levando a danos celulares e aumento da permeabilidade celular, possivelmente devido à sua fração hidrofóbica (Al-Tahhan et al., 2000; Sotirova et al., 2009; Bharali et al., 2013).

Outros estudos relatam que os raminolipídeos dessa bactéria são capazes de perturbar e remover biofilmes de diversas espécies de microrganismos (Irie et al., 2005; Dusane et al., 2010). Os raminolipídeos também se mostraram necessários para a etapa de dispersão do biofilme de *P. aeruginosa* (Boles et al., 2005). Foi demonstrado que a motilidade bacteriana do tipo *swarming* em *P. aeruginosa* é modulada por biosurfactantes raminolipídicos (Kohler et al., 2000; Déziel et al., 2003; Caiazza et al., 2005; Tremblay et al., 2007). Essas moléculas também desempenham um papel importante tanto na manutenção de canais entre as estruturas multicelulares do biofilme de *P. aeruginosa* quanto na dispersão das células planctônicas, que podem então iniciar novas colonizações (Pamp & Tolker-Nielsen, 2007).

Raminolipídeos têm se mostrado importantes fatores de virulência em modelos de infecção *in vitro* e *in vivo*. A cepa *P. aeruginosa* PAO1 $\Delta rhIA$, deficiente na biossíntese de raminolipídeos, foi erradicada mais rapidamente e significativamente em dois modelos diferentes de infecção em comparação com a cepa selvagem (Van Gennip et al., 2009).

Apesar dos múltiplos papéis desempenhados pelos raminolipídeos de *P. aeruginosa*, os mecanismos moleculares bioquímicos envolvidos nesses processos ainda não foram devidamente elucidados. A maioria das funções exercidas por essas moléculas são atribuídas às suas propriedades físico-químicas que foram exaustivamente caracterizadas. No entanto, poucos estudos investigaram possíveis interações bioquímicas entre raminolipídeos e suas células bacterianas produtoras.

DNA *microarrays* e RT-qPCR têm sido amplamente usados para analisar a expressão gênica global de *P. aeruginosa* dentro de seus comportamentos adaptativos complexos, incluindo análises comparativas de biofilme *versus* células planctônicas e o desenvolvimento de um comportamento de *swarming* especializado (Whiteley et al., 2001; Lazazzera, 2005; Shrout et al., 2006; Overhage et al., 2008, Tremblay & Déziel, 2010). No presente, estudo nós investigamos as diferenças entre *P. aeruginosa* selvagem e mutante em resposta à ausência de

genes responsáveis pela produção de raminolipídeos e HAA, através de uma abordagem transcriptômica global.

O modelo experimental proposto foi delineado para análise na fase estacionária de crescimento, em condições dinâmicas, onde a produção de raminolipídeos é significativamente maior (Van Gennip et al., 2009). A cepa PAO1 apresenta baixa produção de raminolipídeos durante o *swarming*, contudo produz quantidades significativas de raminolipídeos em cultura planctônica (Morris et al., 2011). Além disso, também foi verificado que em culturas bacterianas agitadas contendo células planctônicas de *P. aeruginosa* PAO1, o conteúdo raminolipídico se apresentou três vezes maior do que o detectado em biofilmes estáticos (Van Gennip et al., 2009).

Demonstramos que a repressão dos genes flagelares *fliC*, *flgL*, *fliD* e *fliT* envolvidos com motilidade bacteriana do tipo *swarming* e motilidade *swimming* foi bastante expressiva (Tabela 7). Por outro lado, as análises de microarranjos de DNA e o RT-qPCR forneceram dados interessantes onde os genes *pilO* e *pilA*, envolvidos com a biossíntese da fímbria tipo IV e motilidade *twitching*, foram regulados positivamente. A expressão diferencial de um grupo diversificado de genes indica também que há uma diferença fisiológica significativa entre as cepas produtoras e não produtoras de raminolipídeos.

Um estudo publicado em 2004 revelou que muitos dos genes necessários para a formação de biofilmes não são expressos exclusivamente em biofilmes. O grupo identificou genes que foram expressos em células planctônicas em fase estacionária e também são necessários para o desenvolvimento adequado do biofilme de *E. coli* (Beloïn et al., 2004). Além disso, mais recentemente, também foi demonstrado que o biofilme da cepa selvagem PAO1, formado sob condições de agitação, exibiu estruturas porosas semelhantes aos canais e cogumelos que mantêm a arquitetura tridimensional do biofilme, enquanto em condições de crescimento estático, o mesmo se apresentava uniforme, plano e não estruturado (Zheng et al., 2017).

Foi descrito que subpopulações móveis interagem com subpopulações sésseis via sinalização mediada por sideróforos, promovendo movimento para o topo das estruturas das microcolônias, por meio da motilidade mediada por flagelos e raminolipídeos, contribuindo para a arquitetura típica, com a formação de estruturas em forma de cogumelo, observadas em biofilmes maduros de *P. aeruginosa* (Pamp & Tolker-Nielsen, 2007; Barken et al., 2008).

De fato, Pamp e Tolker-Nielsen (2007) demonstraram a completa ausência de estruturas semelhantes a cogumelos em biofilmes formados pela cepa nocaute PAO1 $\Delta rhIA$ deficiente na produção de HAA e raminolipídeos. No entanto, a ausência da expressão de genes flagelares na cepa mutante não foi sugerida à época, fato esse que demonstramos no presente estudo, pela primeira vez.

A capacidade de formar biofilme em *P. aeruginosa* também está associada à presença da fímbria tipo IV, que além de estar relacionada à aderência a superfícies bióticas e abióticas, promove a motilidade do tipo *twitching* e também pode afetar o *swarming*. Foi relatado que o *swarming* em *P. aeruginosa* é dependente de sinalização célula-a-célula, requisitando a presença de flagelos e fímbrias do tipo IV, além da produção de raminolipídeos (Köhler et al., 2000; Caiazza et al., 2005; O'Toole & Kolter, 1998). Apesar disso, do ponto de vista molecular, nenhum mecanismo ou função bioquímica foi atribuída aos raminolipídeos no contexto dos biofilmes e na motilidade bacteriana por *swarming* e/ou *swimming*.

Foi proposto que *P. aeruginosa* requer flagelos durante o *swarming* para superar as interações adesivas mediadas pelas fímbrias tipo IV. O *swarming* diminui na ausência de surfactante raminolipídico (Murray & Kazmierczak, 2008), fato que também demonstramos com o ensaio de motilidade realizado nesse estudo (Figura 11). *P. aeruginosa* é capaz de colonizar, por meio de um tipo de motilidade conhecida como *sliding*, superfícies bióticas deslizantes, sob certas condições em que a expressão flagelar é negativamente regulada, por exemplo, dentro das vias aéreas humanas em pacientes com FC (Wolfgang et al., 2004; Sonawane et al., 2006; Jyot et al., 2007).

Os raminolipídeos estão intimamente relacionados com a motilidade das células bacterianas. A tese mais plausível defende que os raminolipídeos estão envolvidos com o aumento da motilidade microbiana como uma estratégia de se realocar para nichos ricos em nitrogênio e fósforo (Chrzanowski et al., 2012). Evidências de que a produção mais eficaz de raminolipídeos é alcançada quando ocorre uma limitação de nitrogênio, ou seja, na fase de crescimento estacionário e estudos sobre a motilidade celular apoiam essa tese (Soberón-Chávez, 2004; Tremblay et al., 2007; Verstraeten et al., 2008).

Burch e autores (2012) descobriram que a interrupção de genes flagelares precoces ou tardios, envolvidos com a motilidade celular bacteriana poderia causar impactos opostos na produção do biosurfactante HAA por *P. syringae*. Por exemplo, a inativação de *fleQ* (classe I)

resultou em uma deficiência completa na produção de HAA, enquanto a inativação de *fliA* (classe I), *fliF* (classe II) e *flgD* (classe III) resultam na diminuição da produção dessa molécula. Em contraste, a interrupção em *fliC* (classe IV; flagelina) ou *fgt1* e *fgt2* (supostamente necessária para glicosilação flagelar) resultou em superprodução de HAA. Essas descobertas sugerem que a produção de HAA é induzida de forma coordenada com a montagem flagelar precoce, mas que os estágios finais da maturação flagelar agem inversamente para limitar a produção do biossurfactante (Burch et al., 2012; Xu et al., 2012).

Outras evidências mostram que os raminolipídeos podem induzir a liberação da flagelina, um dos principais constituintes do flagelo bacteriano em *P. aeruginosa*, apresentando um papel importante como modulador imunológico (Gerstel et al., 2009). Porém, a maquinaria intracelular envolvida nessa indução ainda não foi esclarecida.

É provável que os biossurfactantes possam regular a expressão gênica e, então, afetar a atividade microbiana, particularmente, em processos relacionados à biodegradação de compostos orgânicos hidrofóbicos (Shao et al., 2017; Li et al., 2015). Por exemplo, na presença de raminolipídeos em um ensaio de biodegradação de fenantreno, foi observada a indução da expressão gênica do gene *nahAc*, no entanto nos tratamentos controle contendo apenas o biossurfactante e na ausência do composto orgânico, a transcrição de *nahAc* não foi detectada (Marlowe et al., 2002). Além disso, também já foi demonstrada a indução da expressão gênica por surfactante pulmonar de genes de virulência em *Staphylococcus aureus*, um patógeno oportunista clinicamente importante (Ishii et al., 2014). Ghelardi e colaboradores (2012) também relataram uma correlação entre o aumento do nível de expressão da flagelina na presença de surfactina em *B. subtilis*. Surfactina é um biossurfactante lipopeptídico produzido por esse microrganismo (Ghelardi et al., 2012).

A molécula de surfactina está envolvida com sinalização parácrina em bactérias e o seu papel como biossurfactante lipopeptídico relacionado com a motilidade *swarming* e a formação de biofilme em *B. subtilis*, está bem caracterizado. A surfactina foi identificada como uma molécula sinalizadora que desencadeia a formação de biofilme através da ativação indireta de KinC via Spo0A. A surfactina ativa indiretamente o receptor de membrana histidina quinase KinC, que fosforila o regulador Spo0A. A surfactina induz o vazamento de potássio estimulando a atividade de uma proteína quinase de membrana, KinC, que governa a expressão de genes envolvidos na formação de biofilme. Spo0A induz a expressão de SinI, que antagoniza

o repressor SinR e causa desrepressão de genes envolvidos na biossíntese da matriz extracelular (Lopez et al., 2009; McLoon et al., 2011; Zeriouh et al., 2014).

Com relação à matriz extracelular do biofilme, um estudo publicado em 2007 demonstrou a relação inversa entre o aumento da produção de exopolissacarídeos (EPS) e a diminuição da motilidade de *swarming* em *P. aeruginosa*. O mutante $\Delta sadC$ resulta em um fenótipo de *hiperswarming*, enquanto a expressão multicópia desse gene promove um fenótipo frequentemente associado à superprodução de EPS (Merritt et al., 2007). Portanto, compreender como os EPSs e a motilidade bacteriana influenciam os diferentes fenótipos de *P. aeruginosa*, pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias de controle de biofilmes presentes em infecções crônicas e persistentes causadas por esse patógeno oportunista.

No presente estudo, também investigamos o perfil de expressão de genes relacionados com a produção de EPS de *P. aeruginosa* PAO1 na ausência de biossurfactantes raminolipídicos e HAA. De acordo com os resultados apresentados, os genes envolvidos com a biossíntese de EPS foram regulados positivamente na cepa PAO1 $\Delta rhIA$ quando comparados à expressão na cepa selvagem. Esses dados, que indicam uma possível relação antagônica entre a expressão dos genes biossintéticos dos EPS e a presença dos raminolipídeos, são corroborados por um estudo publicado recentemente. No trabalho citado, os autores descreveram que mutantes flagelares superexpressaram os exopolissacarídeos Pel e Psl em biofilmes de *P. aeruginosa* crescidos *in vitro* como também em biofilmes isolados de indivíduos com Fibrose Cística (Harrison et al., 2020).

O genoma de *P. aeruginosa* PAO1 codifica um número extraordinário de genes do sistema de dois componentes (TCS) e várias funções celulares são reguladas pela fosforilação His-Asp, incluindo quimiotaxia, aquisição de ferro, produção de alginato e fatores de virulência (Rodrigue et al., 2000; Francis et al., 2017). *P. aeruginosa* tem quatro vias quimiossensoriais diferentes que realizam diversas funções biológicas e são estimuladas pela ligação de sinais a mais de 20 quimiorreceptores. Essas vias medeiam o flagelo bacteriano, a quimiotaxia, além de controlar funções alternativas, como níveis do segundo mensageiro c-di-GMP ou a motilidade de *twitching* (Matilla et al., 2021).

No contexto acima, a análise transcriptômica por *microarrays* revelou a indução da expressão de *narL* e de uma quinase sensora hipotética (PA1180), genes integrantes do sistema de dois componentes (TCS). O regulon NarX-NarL provavelmente inclui genes que são capazes

de modular a motilidade e a formação de biofilme (Gooderham & Hancock, 2009). Um mutante nocaute do regulador de resposta *narL* em PAO1 exibiu um fenótipo de *hiperswarming* que foi proposto como resultado da superprodução de raminolipídeos observada (Van Alst et al., 2007). Entretanto, o estudo apontou que apesar dos mutantes individuais *narX* e *narL* exibirem motilidade *swimming* normal, o duplo mutante *narXL* apresentou motilidade *swimming* reduzida, consistente com a possibilidade de que o sensor quinase e o regulador de resposta sejam necessários em conjunto para a motilidade bacteriana dependente do flagelo (Van Alst et al., 2007).

Foi identificada também a regulação positiva do gene *hcp1* que codifica uma proteína componente do sistema de secreção do tipo VI (H1-T6SS) (Sana et al., 2016) e genes de diversos profagos. Sabe-se que vários profagos desempenham um papel importante na evolução dos genomas bacterianos e na sua patogenicidade (Fortier & Sekulovic, 2013). Um estudo demonstrou que flagelos (FliC) são reduzidos na superfície das células que superexpressaram fagos nas cepas PAO1 e PA14, em contraste com a hiperpiliação (PilA) observada (Tsao et al., 2018). A expressão de fagos também parece causar prejuízos para a motilidade bacteriana.

P. aeruginosa deve sua versatilidade e notável capacidade adaptativa ao seu genoma robusto, com intrincados sistemas reguladores gênicos. O genoma de PAO1 codifica um amplo repertório de sistemas de dois componentes (TCS), com 64 quinases sensoras, 72 reguladores de resposta e 3 proteínas de fosfotransferência de histidina (Hpt) (Stover et al., 2000; Rodrigue et al., 2000; Francis et al., 2017). Essas redes regulatórias desempenham um papel central em várias funções e respostas celulares, incluindo quimiotaxia, detecção de superfície e fatores de virulência. Os TCSs são conhecidos por mediar a regulação de genes flagelares, incluindo a rede GacS, uma rede multiquinase complexa, via SadC (Moscoso et al., 2014) ou HptB (Valentini et al., 2016) que afetam os níveis do segundo mensageiro intracelular c-di-GMP. Além disso, o sistema quimiossensorial Wsp aciona uma matriz de transdução de sinal em resposta ao sensor de superfície, controlando a síntese de c-di-GMP, que promove a formação de biofilmes e diminui a expressão dos genes flagelares (Hickman et al., 2005; O'Connor et al., 2012; Ha et al., 2015).

O principal alvo do c-di-GMP nesta via é o regulador transcricional FleQ, que regula positivamente a expressão de genes flagelares enquanto reprime genes de EPS, como *pel*. Após a interação com c-di-GMP, FleQ é inibido, levando à redução da expressão de genes flagelares e regulação positiva de genes de EPS (Hickman et al., 2005; Hickman et al., 2008). Portanto, a

rede GacS e a via de sinalização Wsp representam sistemas compatíveis com a modulação da expressão flagelar dependente de raminolipídeos observada no presente estudo. Curiosamente, dentro do sistema quimiossensorial Wsp, os genes flagelares e EPS são inversamente regulados, um comportamento que temos consistentemente observado em relação aos raminolipídeos. FleQ, o regulador mestre da biogênese flagelar, é o principal protagonista no sistema Wsp (Hickman et al., 2008). Ainda sim, é preciso ser investigado se os raminolipídeos poderiam agir diretamente sobre qualquer sistema sensorial, ou indiretamente, por meio de sua atividade umectante, controlando a detecção de superfície das bactérias.

Utilizando a abordagem transcriptômica global por microarranjos de DNA demonstramos que a expressão de genes responsivos ao ferro, entre os quais podemos destacar PA4221 e PA4220, foi regulada negativamente, como podemos ver na Tabela 6. Foi relatado que a redução na captação de ferro em mutantes deficientes na aquisição de Fe mediada pela pioverdina, pode prejudicar a formação de biofilme. No entanto, essa deficiência pode favorecer a motilidade *twitching* em *P. aeruginosa*. Ou seja, em condições limitantes de ferro, *P. aeruginosa* apresenta indução da sua motilidade e forma biofilmes planos não estruturados (Patriquin et al., 2008; Glick et al., 2010).

Nas últimas décadas diversas abordagens vêm sendo utilizadas para um melhor entendimento dos mecanismos regulatórios envolvidos na formação de biofilme em *P. aeruginosa*. Por meio de uma análise proteômica, foi identificada uma proteína hipotética codificada pelo gene PA3731. O gene PA3731 foi relacionado à motilidade *swarming* e à biossíntese de raminolipídeos. O mutante Δ PA3731 foi deficiente na formação de biofilme em comparação com a cepa selvagem PAO1 (Macé et al., 2008). Esses dados corroboram com as nossas análises, onde demonstramos a repressão do gene PA3731 na cepa nocaute, deficiente em raminolipídeos, em comparação à cepa selvagem PAO1.

Contudo, os mecanismos moleculares que envolvem o papel fisiológico dos raminolipídeos e seus microrganismos produtores ainda são desconhecidos. Até o momento, acredita-se que os múltiplos papéis fisiológicos desempenhados pelos raminolipídeos são derivados das propriedades físico-químicas dessas moléculas (Herzog et al., 2020). Dessa forma, a partir dos resultados que foram obtidos no presente estudo, sugerimos um possível padrão de regulação gênica dependente da sinalização parácrina, mediada por raminolipídeos e/ou seus precursores HAA, de acordo com o modelo proposto na Figura 17. Nossos dados estão alinhados com os ensaios fenotípicos realizados, que corroboram essa hipótese, visto que

na ausência de raminolipídeos na mutante $\Delta rhIA$, ocorre a redução da motilidade *swarming*, fato que pode ser atribuído à repressão gênica de genes envolvidos na biossíntese flagelar, observada em nossas análises.

Em conjunto, esses resultados mostram evidências significativas de que raminolipídeos e/ou seus precursores HAA, os principais produtos biossintéticos da via *rhIABC*, parecem modular a expressão gênica em *P. aeruginosa*. Uma investigação mais aprofundada é necessária para que possamos compreender os mecanismos bioquímicos e/ou biofísicos envolvidos no processo.

Portanto, a abordagem transcriptômica global por microarranjos de DNA foi uma importante estratégia, que resultou em um *insight* em direção aos mecanismos moleculares envolvidos na dinâmica regulatória dos raminolipídeos e/ou HAA em fenótipos como a formação de biofilmes e a motilidade bacteriana em *P. aeruginosa* PAO1.

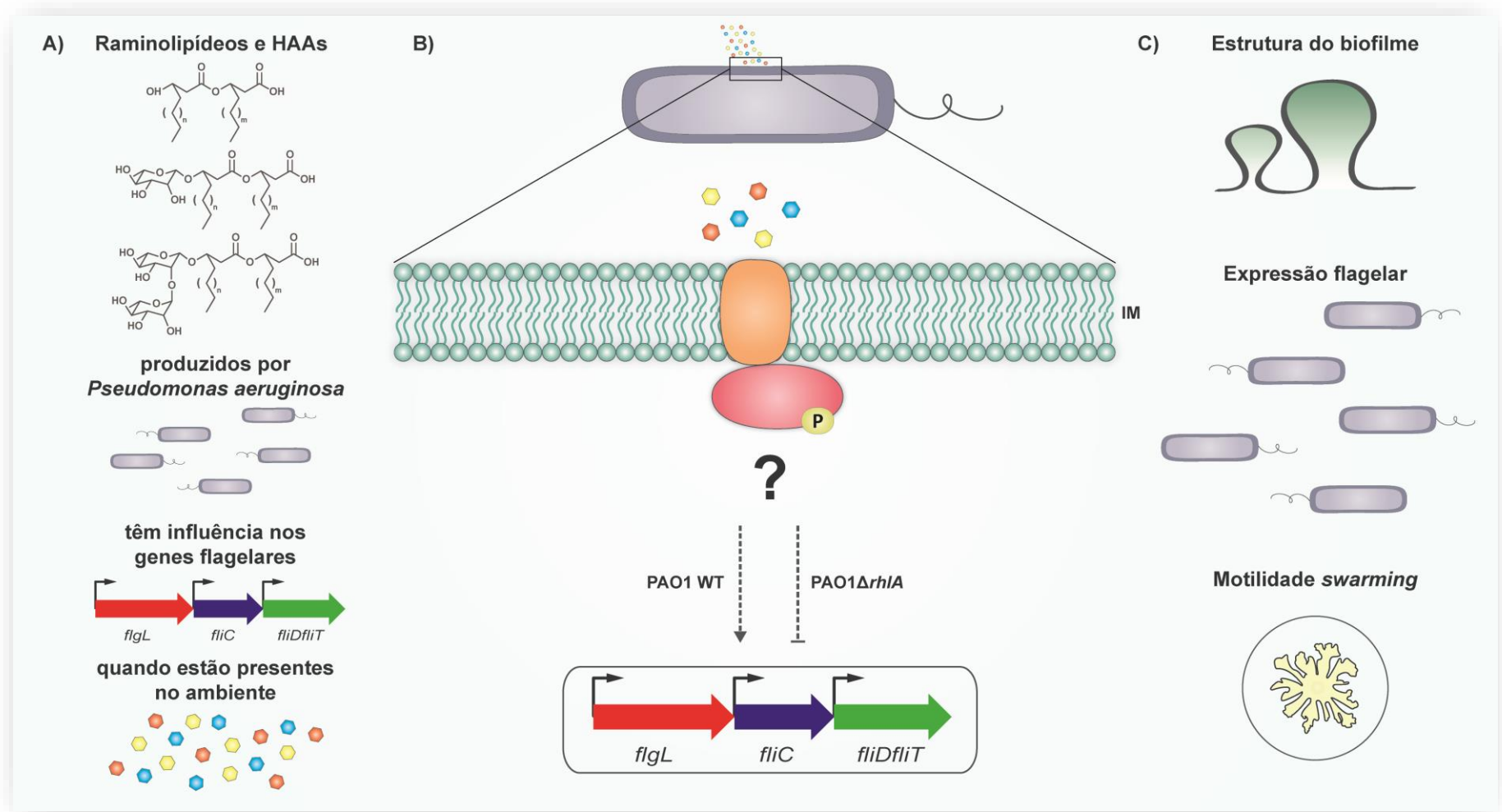


Figura 17. Modelo para modulação da expressão gênica pelos raminolipídeos. Raminolipídeos e/ou seus precursores HAAs produzidos por *P. aeruginosa* PAO1 modulam a expressão gênica de genes envolvidos na biossíntese flagelar, possivelmente através da ativação de uma cascata de sinalização parácrina, mediando os fenótipos de formação de biofilmes e motilidade bacteriana.

7. CONCLUSÃO

- Foram apontados 134 genes diferencialmente expressos na cepa nocaute em relação à cepa selvagem, sendo 91 genes regulados positivamente e 43 negativamente, pertencentes a categorias funcionais diversas.
- A repressão de genes flagelares, tipicamente envolvidos com motilidade do tipo *swarming* foi significativa.
- Foi observada a indução da expressão de *pilO* e *pilA*, genes que codificam proteínas integrantes da fímbria tipo IV, relacionada à motilidade do tipo *swarming* e *twitching*.
- A indução de genes relacionados com virulência - sistema de secreção do tipo VI (*hcp1*) e outros envolvidos com a biossíntese de exopolissacarídeos (EPSs) também foi verificada na cepa mutante deficiente em raminolipídeos.
- Os resultados obtidos sugerem um possível padrão de regulação gênica mediado pelos raminolipídeos de forma direta ou indireta interferindo na mecanossensibilização, através de proteínas que detectam estímulos mecânicos (mecanossensores) modulando a expressão gênica.
- Ensaios fenotípicos reforçam a hipótese de uma possível sinalização parácrina, já que na ausência dos raminolipídeos, conforme observado para a mutante $\Delta rhIA$, ocorre a ausência da motilidade por *swarming*, fenótipo que é parcialmente restaurado pela adição de raminolipídeos exógenos. A supressão da motilidade por *swarming* pode também estar relacionada à repressão gênica dos genes flagelares observada nesse estudo, aliada possivelmente ao aumento da expressão dos genes de EPS.
- A análise transcriptômica global por microarranjos de DNA mostrou-se eficiente para o melhor entendimento dos mecanismos moleculares que implicam na dinâmica regulatória dos raminolipídeos e/ou HAAs sobre diferentes fenótipos de *P. aeruginosa* PAO1, como a formação de biofilmes e motilidade, que são importantes fatores adaptativos e de virulência. No entanto, não detectou alguns genes centrais, como os relacionados à biossíntese dos EPS Pel e Psl.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Avaliar a expressão gênica durante o *swarming* nas cepas estudadas no presente trabalho.
- Investigar através de outros métodos (microscopia eletrônica e/ou *western blot*) a presença e/ou ausência de flagelos funcionais nas cepas PAO1 $\Delta rhIA$ e cepa controle.
- Analisar por RT-qPCR em um ensaio em caldo líquido (similar as condições do *microarray*) com adição de HAA + RLs exógenos, os genes flagelares selecionados no estudo na cepa PAO1 $\Delta rhIA$.
- Realizar um ensaio de motilidade do tipo *swimming* nas cepas PAO1 e PAO1 $\Delta rhIA$.
- Caracterizar fenotipicamente o perfil de motilidade *swarming* e *swimming* das cepas mutantes PAO1 $\Delta rhIB$ e PAO1 $\Delta rhIC$, recentemente adquiridas no nosso laboratório.
- Analisar a expressão gênica durante o *swarming* das cepas mutantes PAO1 $\Delta rhIB$ e PAO1 $\Delta rhIC$.
- Investigar através da análise proteômica (fosfoproteoma) comparativa da cepa PAO1 em relação a PAO1 $\Delta rhIA$, possíveis vias de sinalização relacionadas.
- Realizar ensaios de virulência *in vitro* e *in vivo* com as cepas PAO1 $\Delta rhIA$, PAO1 $\Delta rhIB$ e PAO1 $\Delta rhIC$.
- Avaliar através de uma abordagem transcriptômica utilizando RNA-seq a expressão gênica global da cepa controle PAO1, cepa nocaute PAO1 $\Delta rhIA$ e PAO1 $\Delta rhIA$ suplementada com biossurfactantes purificados e comercializados de *P. aeruginosa*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Mawgoud, A. M., Lépine, F., Déziel, E. (2010). Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(5), 1323-1336.
- Abdel-Mawgoud, A. M., Lépine, F., Déziel, E. (2014). A stereospecific pathway diverts β -oxidation intermediates to the biosynthesis of rhamnolipid biosurfactants. *Chemistry & Biology*, 21(1), 156-164.
- Abdel-Mawgoud, A. M. et al. (2011). *Rhamnolipids: detection, analysis, biosynthesis, genetic regulation, and bioengineering of production*. In: Biosurfactants. Springer, Berlin, Heidelberg, 13-55.
- Aguirre-Ramírez, M., Medina, G., Gonzalez-Valdez, A., Grosso-Becerra, V., Soberon-Chavez, G. (2012). The *Pseudomonas aeruginosa* rmlBDAC operon, encoding dTDP-L-rhamnose biosynthetic enzymes, is regulated by the quorum-sensing transcriptional regulator RhlR and the alternative sigma factor σ S. *Microbiology*, 158(4), 908-916.
- Allard, S. T., Giraud, M. F., Whitfield, C., Messner, P., Naismith, J. H. (2000). The purification, crystallization and structural elucidation of dTDP-D-glucose 4, 6-dehydratase (RmlB), the second enzyme of the dTDP-L-rhamnose synthesis pathway from *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 56(2), 222-225.
- Allesen-Holm, M. et al. (2006). A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Molecular Microbiology*, 59(4), 1114-1128.
- Al-Tahhan, R. A., Sandrin, T. R., Bodour, A. A., Maier, R. M. (2000). Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), 3262-3268.
- Altegoer, F., Bange, G. (2015). Undiscovered regions on the molecular landscape of flagellar assembly. *Current Opinion in Microbiology*, 28(1), 98-105.
- Alvarez-Ortega, C., Harwood, C. S. (2007). Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to low oxygen indicate that growth in the cystic fibrosis lung is by aerobic respiration. *Molecular Microbiology*, 65(1), 153-165.
- Balasubramanian, D., Mathee, K. (2009). Comparative transcriptome analyses of *Pseudomonas aeruginosa*. *Human Genomics*, 3(4), 349.
- Banat, I. M., Satpute, S. K., Cameotra, S. S., Patil, R., Nyayanit, N. V. (2014). Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. *Frontiers in Microbiology*, 5, 697.
- Banin, E., Vasil, M. L., Greenberg, E. P. (2005). Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(31), 11076-11081.
- Barbier, M., et al. (2014). From the environment to the host: re-wiring of the transcriptome of *Pseudomonas aeruginosa* from 22 C to 37 C. *PloS One*, 9(2), e89941.
- Barken, K. B., et al. (2008). Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental Microbiology*, 10(9), 2331-2343.
- Bazire, A., Dufour, A. (2014). The *Pseudomonas aeruginosa* *rhlG* and *rhlAB* genes are inversely regulated and RhlG is not required for rhamnolipid synthesis. *BMC Microbiology*, 14(1), 160.
- Beal, R., Betts, W. B. (2000). Role of rhamnolipid biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Microbiology*, 89(1), 158-168.

- Beloin, C., et al. (2004). Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Molecular Microbiology*, 51(3), 659-674.
- Benincasa, M., Contiero, J., Manresa, M. A., Moraes, I. O. (2002). Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. *Journal of Food Engineering*, 54(4), 283-288.
- Benincasa, M. (2007). Rhamnolipid produced from agroindustrial wastes enhances hydrocarbon biodegradation in contaminated soil. *Current Microbiology*, 54(6), 445-449.
- Bergström, S., Theorell, H., Davide, H. (1947) On a metabolic Product of *Ps. pyocyanea*, pyolipic acid, active against *nycobact. tuberculosis*. *Nature*.
- Bertani, I., Ševo, M., Kojic, M., Venturi, V. (2003). Role of GacA, LasI, RhII, Ppk, PsrA, Vfr and ClpXP in the regulation of the stationary-phase sigma factor rpoS/RpoS in *Pseudomonas*. *Archives of microbiology*, 180(4), 264-271.
- Beuker, J. et al. (2016). High titer heterologous rhamnolipid production. *AMB Express*, 6(1), 1-7.
- Bharali, P., Saikia, J. P., Ray, A., Konwar, B. K. (2013). Rhamnolipid (RL) from *Pseudomonas aeruginosa* OBP1: a novel chemotaxis and antibacterial agent. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 103, 502-509.
- Bjarnsholt, T. et al. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent. *Microbiology*, 151(2), 373-383.
- Blankenfeldt, W., Asuncion, M., Lam, J. S., Naismith, J. H. (2000). The structural basis of the catalytic mechanism and regulation of glucose-1-phosphate thymidyltransferase (RmlA). *The EMBO journal*, 19(24), 6652-6663.
- Blevess, S. et al. (2010). Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: a wealth of pathogenic weapons. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(8), 534-543.
- Bodey, G. P. et al. (1983) Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Reviews of Infectious Diseases*, 5(2), 279-313.
- Boles, B. R., Thoendel, M., & Singh, P. K. (2005). Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Molecular microbiology*, 57(5), 1210-1223.
- Borlee, B. R. et al. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. *Molecular Microbiology*, 75(4), 827-842.
- Branny, P., Pearson, J. P., Pesci, E. C., Köhler, T., Iglewski, B. H., Van Delden, C. (2001). Inhibition of quorum sensing by a *Pseudomonas aeruginosa* dksA homologue. *Journal of Bacteriology*, 183(5), 1531-1539.
- Brencic, A., McFarland, K. A., McManus, H. R., Castang, S., Mogno, I., Dove, S. L., Lory, S. (2009). The GacS/GacA signal transduction system of *Pseudomonas aeruginosa* acts exclusively through its control over the transcription of the RsmY and RsmZ regulatory small RNAs. *Molecular Microbiology*, 73(3), 434-445.
- Buchfink, B., Xie, C., Huson, D. H. (2015). Fast and sensitive protein alignment using diamond. *Nature Methods*, 12(1), 59.
- Burch, A. Y., Shimada, B. K., Mullin, S. W., Dunlap, C. A., Bowman, M. J., Lindow, S. E. (2012). *Pseudomonas syringae* coordinates production of a motility-enabling surfactant with flagellar assembly. *Journal of Bacteriology*, 194(6), 1287-1298.
- Bustin, S. A., et al. (2009). The MIQE Guidelines: M inimum I nformation for Publication of Q uantitative Real-Time PCR E xperiments.

- Byrd, M. S., et al. (2009). Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production. *Molecular Microbiology*, 73(4), 622-638.
- Cabrera-Valladares, N. et al. (2006). Monorhamnolipids and 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanoic acids (HAAs) production using *Escherichia coli* as a heterologous host. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(1), 187-194.
- Caiazza, N. C. et al. (2007). Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Journal of Bacteriology*, 189(9), 3603-3612.
- Caiazza, N. C., Shanks, R. M. Q., O'toole, G. A. (2005). Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 187(21), 7351-7361.
- Campos-García, J., Caro, A. D., Nájera, R., Miller-Maier, R. M., Al-Tahhan, R. A., Soberón-Chávez, G. (1998). The *Pseudomonas aeruginosa* *rhlG* gene encodes an NADPH-dependent β -ketoacyl reductase which is specifically involved in rhamnolipid synthesis. *Journal of Bacteriology*, 180(17), 4442-4451.
- Cha, M. et al. (2008). Heterologous production of *Pseudomonas aeruginosa* EMS1 biosurfactant in *Pseudomonas putida*. *Bioresource Technology*, 99(7), 2192-2199.
- Chang, W., Small, D. A., Toghrol, F., Bentley, W. E. (2005). Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* reveals induction of pyocin genes in response to hydrogen peroxide. *BMC genomics*, 6(1), 115.
- Chayabutra, C., Wu, J., Ju, L. (2001). Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* under denitrification: effects of limiting nutrients and carbon substrates. *Biotechnology and Bioengineering*, 72(1), 25-33.
- Chrzanowski, Ł., Ławniczak, Ł., Czaczyk, K. (2012). Why do microorganisms produce rhamnolipids? *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(2), 401-419.
- Claret, L., Hughes, C. (2000). Rapid turnover of FlhD and FlhC, the flagellar regulon transcriptional activator proteins, during *Proteus* swarming. *Journal of Bacteriology*, 182(3), 833-836.
- Coggan, K. A., Wolfgang, M. C. (2012). Global regulatory pathways and cross-talk control *Pseudomonas aeruginosa* environmental lifestyle and virulence phenotype. *Current Issues in Molecular Biology*, 14(2), 47.
- Conrad, J. C. et al. (2011). Flagella and pili-mediated near-surface single-cell motility mechanisms in *P. aeruginosa*. *Biophysical Journal*, 100(7), 1608-1616.
- Copeland, M. F., Weibel, D. B. (2009). Bacterial swarming: a model system for studying dynamic self-assembly. *Soft Matter*, 5(6), 1174-1187.
- Costerton, J. W. et al. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Reviews in Microbiology*, 41(1), 435-464.
- Costerton, J. W. et al. (1995). Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, 49(1), 711-745.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318-1322.
- Christofi, N., & Ivshina, I. B. (2002). Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *Journal of Applied Microbiology*, 93(6), 915-929.
- Croda-García, G., Grosso-Becerra, V., Gonzalez-Valdez, A., Servín-González, L., Soberon-Chavez, G. (2011). Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* *rhlR*: role of the CRP orthologue

- Vfr (virulence factor regulator) and quorum-sensing regulators LasR and RhlR. *Microbiology*, 157(9), 2545-2555.
- Dasgupta, N., Arora, S. K., Ramphal, R. (2004). The flagellar system of *Pseudomonas aeruginosa*. In *Pseudomonas*. Springer, Boston, MA, 675-698.
- Dasgupta, N. et al. (2003). A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 50(3), 809-824.
- Davey, M. E., Caiazza, N. C., O'Toole, G. A. (2003). Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, 185(3), 1027-1036.
- Davey, M. E., O'toole, G. A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 847-867.
- Davies, D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature reviews Drug discovery*, 2(2), 114-122.
- Davies, D. G., Geesey, G. G. (1995). Regulation of the alginate biosynthesis gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. *Applied Environmental Microbiology*, 61(3), 860-867.
- De Kievit, T. R., Kakai, Y., Register, J. K., Pesci, E. C., Iglewski, B. H. (2002). Role of the *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in rhlI regulation. *FEMS Microbiology Letters*, 212(1), 101-106.
- De Kievit, T., Seed, P. C., Nezezon, J., Passador, L., Iglewski, B. H. (1999). RsaL, a novel repressor of virulence gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 181(7), 2175-2184.
- De La Fuente-Núñez, C., et al. (2012). Inhibition of bacterial biofilm formation and swarming motility by a small synthetic cationic peptide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(5), 2696-2704.
- Dekimpe, V., Deziel, E. (2009). Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhlR regulates LasR-specific factors. *Microbiology*, 155(3), 712-723.
- Desai, J. D., Banat, I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(1), 47-64.
- Déziel, E. et al. (1999). Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1440(2-3), 244-252.
- Deziel, E., Lepine, F., Milot, S., Villemur, R. (2003). rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology*, 149(8), 2005-2013.
- Déziel, E., Lépine, F., Milot, S., He, J., Mindrinos, M. N., Tompkins, R. G., Rahme, L. G. (2004). Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(5), 1339-1344.
- Diepold, A., Armitage, J. P. (2015). Type III secretion systems: the bacterial flagellum and the injectisome. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1679), 20150020.
- Diggle, S. P., Winzer, K., Chhabra, S. R., Worrall, K. E., Cámara, M., Williams, P. (2003). The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the

- quorum sensing hierarchy, regulates rhl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Molecular Microbiology*, 50(1), 29-43.
- do Valle Gomes, M. Z., Nitschke, M. (2012). Evaluation of rhamnolipid and surfactin to reduce the adhesion and remove biofilms of individual and mixed cultures of food pathogenic bacteria. *Food control*, 25(2), 441-447.
- Dobler, L et al. (2017) Enhanced rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing estA in a simple medium. *PloS One*, 12(8), e0183857.
- Dobler, Leticia et al. (2016). Rhamnolipids in perspective: gene regulatory pathways, metabolic engineering, production and technological forecasting. *New biotechnology*, 33(1), 123-135.
- Driscoll, J. A., Brody, S. L., Kollef, M. H. (2007). The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs*, 67(3), 351-368.
- Dubeau, D., Déziel, E., Woods, D. E., Lépine, F. (2009). Burkholderia thailandensis harbors two identical rhl gene clusters responsible for the biosynthesis of rhamnolipids. *BMC Microbiology*, 9(1), 263.
- Dufour, A., Furness, R. B., Hughes, C. (1998). Novel genes that upregulate the *Proteus mirabilis* flhDC master operon controlling flagellar biogenesis and swarming. *Molecular Microbiology*, 29(3), 741-751.
- Dusane, D. H., Nanchaiah, Y. V., Zinjarde, S. S., Venugopalan, V. P. (2010). Rhamnolipid mediated disruption of marine *Bacillus pumilus* biofilms. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81(1), 242-248.
- Dusane, D. H. et al. (2010). Quorum sensing: implications on rhamnolipid biosurfactant production. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 27 (1), 159-184.
- Edwards, J. R., Hayashi, J. A. (1965). Structure of a rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 111(2), 415-421.
- Engel, J., Balachandran, P. (2009). Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Current Opinion in Microbiology*, 12(1), 61-66.
- Eslami, P., Hajfarajollah, H., Bazsefidpar, S. (2020). Recent advancements in the production of rhamnolipid biosurfactants by *Pseudomonas aeruginosa*. *RSC Advances*, 10(56), 34014-34032.
- Falcone, M. et al. (2018). The small RNA ErsA of *Pseudomonas aeruginosa* contributes to biofilm development and motility through post-transcriptional modulation of AmrZ. *Frontiers in Microbiology*, 9(1), 238.
- Fauvart, M., Phillips, P., Bachaspatimayum, D., Verstraeten, N., Fransaer, J., Michiels, J., Vermant, J. (2012). Surface tension gradient control of bacterial swarming in colonies of *Pseudomonas aeruginosa*. *Soft Matter*, 8(1), 70-76.
- Firoved, A. M., Deretic, V. (2003). Microarray analysis of global gene expression in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 185(3), 1071-1081.
- Flemming, H. C., Neu, T. R., Wozniak, D. J. (2007). The EPS matrix: the “house of biofilm cells”. *Journal of Bacteriology*, 189(22), 7945-7947.
- Fortier, L. C., Sekulovic, O. (2013). Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. *Virulence*, 4(5), 354-365.
- Francis, V. I., Stevenson, E. C., Porter, S. L. (2007). Two-component systems required for virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*, 364(11), 104.

- Friedman, L., Kolter, R. (2004). Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Molecular Microbiology*, 51(3), 675-690.
- Funston, S. J. et al. (2016). Characterising rhamnolipid production in *Burkholderia thailandensis* E264, a non-pathogenic producer. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(18), 7945-7956.
- Gallagher, L. A., McKnight, S. L., Kuznetsova, M. S., Pesci, E. C., Manoil, C. (2002). Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 184(23), 6472-6480.
- Gellatly, S. L., Hancock, R. E. (2013) *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and Disease*, 67(3), 159-173.
- Germer, A., et al. (2020). Exploiting the natural diversity of RhlA acyltransferases for the synthesis of the rhamnolipid precursor 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanoic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(6).
- Gerstel, U., Czapp, M., Bartels, J., Schröder, J. M. (2009). Rhamnolipid-induced shedding of flagellin from *Pseudomonas aeruginosa* provokes hBD-2 and IL-8 response in human keratinocytes. *Cellular microbiology*, 11(5), 842-853.
- Ghanbari, Azadeh et al. (2016). Inoculation density and nutrient level determine the formation of mushroom-shaped structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Scientific Reports*, 6(1), 1-12.
- Ghelardi, E., Salvetti, S., Ceragioli, M., Gueye, S. A., Celandroni, F., Senesi, S. (2012). Contribution of surfactin and SwrA to flagellin expression, swimming, and surface motility in *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(18), 6540-6544.
- Giraud, M. F., Naismith, J. H. (2000). The rhamnose pathway. *Current Opinion in Structural Biology*, 10(6), 687-696.
- Glick, R. et al. (2010). Increase in rhamnolipid synthesis under iron-limiting conditions influences surface motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 192(12), 2973-2980.
- Gooderham, W. J., Hancock, R. E. (2009). Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(2), 279-294.
- Goodman, A. L., Lory, S. (2004). Analysis of regulatory networks in *Pseudomonas aeruginosa* by genomewide transcriptional profiling. *Current Opinion in Microbiology*, 7(1), 39-44.
- Goodman, A. L., Kulasekara, B., Rietsch, A., Boyd, D., Smith, R. S., Lory, S. (2004). A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Developmental cell*, 7(5), 745-754.
- Graninger, M., Nidetzky, B., Heinrichs, D. E., Whitfield, C., Messner, P. (1999). Characterization of dTDP-4-dehydrorhamnose 3, 5-epimerase and dTDP-4-dehydrorhamnose reductase, required for dTDP-L-rhamnose biosynthesis in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Journal of Biological Chemistry*, 274(35), 25069-25077.
- Guerra-Santos, L., Käppeli, O., Fiechter, A. (1984) *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(2), 301-305.
- Gunther, N. W. et al. (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a nonpathogenic bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5), 2288-2293.
- Guttenplan, S. B., Kearns, D. B. (2013). Regulation of flagellar motility during biofilm formation. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(6), 849-871.

- Ha, D. G., O'Toole, G. A. (2015). c-di-GMP and its effects on biofilm formation and dispersion: a *Pseudomonas aeruginosa* review. *Microbial Biofilms*, 1(1), 301-317.
- Ha, D. G., Kuchma, S. L., O'Toole, G. A. (2014). Plate-based assay for swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*. In *Pseudomonas methods and protocols*. Humana Press, New York, NY, 67-72.
- Haba, E. et al. (2003). Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044. *Biotechnology and Bioengineering*, 81(3), 316-322.
- Haba, E. et al. (2000). Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(3) 379-387.
- Hachani, A., Lossi, N. S., Hamilton, A., Jones, C., Bleves, S., Albesa-Jové, D., Filloux, A. (2011). Type VI secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*: secretion and multimerization of VgrG proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 286(14), 12317-12327.
- Hardalo, C., Edberg, S. C. (1997). *Pseudomonas aeruginosa*: assessment of risk from drinking water. *Critical Reviews in Microbiology*, 23(1), 47-75.
- Harmsen, M. et al. (2010). An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 59(3), 253-268.
- Harrison, J. J. et al. (2020). Elevated exopolysaccharide levels in *Pseudomonas aeruginosa* flagellar mutants have implications for biofilm growth and chronic infections. *Plos Genetics*, 16(6), e1008848.
- Hauser, A. R. (2009). The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nature Reviews Microbiology*, 7(9). 654.
- Heacock-Kang, Y., et al. (2017). Spatial transcriptomes within the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm architecture. *Molecular Microbiology*, 106(6), 976-985.
- Henkel, M. et al. (2012). Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: concepts for next-generation rhamnolipid production. *Process Biochemistry*, 47(8), 1207-1219.
- Hentzer, Á., Eberl, Á., Givskov, Á. (2005). Transcriptome analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: anaerobic respiration and iron limitation. *Biofilms*, 2(1), 37.
- Hentzer, M., et al. (2003). Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *The EMBO Journal*, 22(15), 3803-3815.
- Hervás, A. B., Canosa, I., Little, R., Dixon, R., Santero, E. (2009). NtrC-dependent regulatory network for nitrogen assimilation in *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology*, 191(19), 6123-6135.
- Herzog, M., Tiso, T., Blank, L. M., Winter, R. (2020). Interaction of rhamnolipids with model biomembranes of varying complexity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 183431.
- Heydorn, A. et al. (2002). Statistical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: impact of mutations in genes involved in twitching motility, cell-to-cell signaling, and stationary-phase sigma factor expression. *Applied Environmental Microbiology*, 68(4), 2008-2017.
- Hickman, J. W., Harwood, C. S. (2008). Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as ac-di-GMP-responsive transcription factor. *Molecular Microbiology*, 69(2), 376-389.
- Hickman, J. W., Tifrea, D. F., Harwood, C. S. (2005). A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(40), 14422-14427.

- Hogardt, M., Heesemann, J. (2010). Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during persistence in the cystic fibrosis lung. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(8), 557-562.
- Høiby, N., Johansen, H. K., Moser, C., Song, Z., Ciofu, O., Kharazmi, A. (2001). *Pseudomonas aeruginosa* and the in vitro and in vivo biofilm mode of growth. *Microbes and Infection*, 3(1), 23-35.
- Høiby, N., Ciofu, O., Bjarnsholt, T. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiology*, 5(11), 1663-1674.
- Hori, K., Ichinohe, R., Unno, H., Marsudi, S. (2011). Simultaneous syntheses of polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* IFO3924 at various temperatures and from various fatty acids. *Biochemical Engineering Journal*, 53(2), 196-202.
- Irie, Y., O'toole, G. A., Yuk, M. H. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids disperse *Bordetella bronchiseptica* biofilms. *FEMS Microbiology Letters*, 250(2), 237-243.
- Ishii, K., Adachi, T., Yasukawa, J., Suzuki, Y., Hamamoto, H., Sekimizu, K. (2014). Induction of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus* by pulmonary surfactant. *Infection and Immunity*, 82(4), 1500-1510.
- Jackson, K. D. et al. (2004). Identification of *psl*, a locus encoding a potential exopolysaccharide that is essential for *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 186(14), 4466-4475.
- Jefferson, K. K. (2004). What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters*, 236(2), 163-173.
- Jensen, P. Ø., et al. (2007). Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 153(5), 1329-1338.
- Jimenez, P. N et al. (2012). The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(1), 46-65.
- Johnson, M. K., Boese-Marrazzo, D. (1980). Production and properties of heat-stable extracellular hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, 29(3), 1028-1033.
- Jyot, J. et al. (2007). Genetic mechanisms involved in the repression of flagellar assembly by *Pseudomonas aeruginosa* in human mucus. *Molecular Microbiology*, 63(4), 1026-1038.
- Kamatkar, N. G., Shrout, J. D. (2011). Surface hardness impairment of quorum sensing and swarming for *Pseudomonas aeruginosa*. *PloS One*, 6(6), e20888.
- Kang, Y., McMillan, I., Norris, M. H., Hoang, T. T. (2015). Single prokaryotic cell isolation and total transcript amplification protocol for transcriptomic analysis. *Nature Protocols*, 10(7), 974-984.
- Kang, Y., Norris, M. H., Zarzycki-Siek, J., Nierman, W. C., Donachie, S. P., Hoang, T. T. (2011). Transcript amplification from single bacterium for transcriptome analysis. *Genome Research*, 21(6), 925-935.
- Kaplan, J. Á. (2010). Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *Journal of Dental Research*, 89(3), 205-218.
- Kazmierczak, B. I., Schniederberend, M., Jain, R. (2015) Cross-regulation of *Pseudomonas* motility systems: the intimate relationship between flagella, pili and virulence. *Current Opinion in Microbiology*, 28(1), 78-82.
- Kearns, D. B. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 634-644.

- Khanra, N. et al. (2016). Recognition and targeting mechanisms by chaperones in flagellum assembly and operation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(35), 9798-9803.
- Kilmury, S. L. N., Burrows, L. L. (2018). The *Pseudomonas aeruginosa* PilSR two-component system regulates both twitching and swimming motilities. *Mbio*, 9(4).
- Kim, L. H., Jung, Y., Yu, H. W., Chae, K. J., Kim, I. S. (2015). Physicochemical interactions between rhamnolipids and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm layers. *Environmental Science & Technology*, 49(6), 3718-3726.
- King, J D. et al. (2009). Lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Innate Immunity*, 15(5), 261-312.
- Klausen, M. et al. (2003). Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Molecular Microbiology*, 48(6), 1511-1524.
- Klockgether, J. et al. (2010). Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 laboratory strains. *Journal of Bacteriology*, 192(4), 1113-1121.
- Köhler, T. et al. (2000). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *Journal of Bacteriology*, 182(21), 5990-5996.
- Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., Hultgren, S. J. (2013). Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 3(4), a010306.
- Kuchma, S. L. et al. (2007). BifA, a cyclic-Di-GMP phosphodiesterase, inversely regulates biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Journal of Bacteriology*, 189(22), 8165-8178.
- Lacourse, K. D. et al. (2018). Conditional toxicity and synergy drive diversity among antibacterial effectors. *Nature Microbiology*, 3(4), 440-446.
- Lang, S., Wullbrandt, D. (1999) Rhamnolipids—biosynthesis, microbial production and application potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(1), 22-32.
- Lapouge, K., Schubert, M., Allain, F. H. T., Haas, D. (2008). Gac/Rsm signal transduction pathway of γ -proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Molecular Microbiology*, 67(2), 241-253.
- Lau, G. W. et al. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice. *Infection and Immunity*, 72(7), 4275-4278.
- Lazazzera, B. A. (2005). Lessons from DNA microarray analysis: the gene expression profile of biofilms. *Current Opinion in Microbiology*, 8(2), 222-227.
- Ledgham, F., Ventre, I., Soscia, C., Foglino, M., Sturgis, J. N., Lazdunski, A. (2003). Interactions of the quorum sensing regulator QscR: interaction with itself and the other regulators of *Pseudomonas aeruginosa* LasR and RhIR. *Molecular Microbiology*, 48(1), 199-210.
- Lee, J., Zhang, L. (2015). The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & Cell*, 6(1), 26-41.
- Lee, J., et al. (2013). A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. *Nature chemical biology*, 9(5), 339.
- Leighton, T L. et al. (2015). Biogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili and regulation of their function. *Environmental Microbiology*, 17(11), 4148-4163.

- Lequette, Y., Greenberg, E. P. (2005). Timing and localization of rhamnolipid synthesis gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Journal of Bacteriology*, 187(1), 37-44.
- Lessie, T. G., Phibbs Jr, P. V. (1984). Alternative pathways of carbohydrate utilization in pseudomonads. *Annual Review of Microbiology*, 38(1), 359-388.
- Li, F., Zhu, L., Wang, L., Zhan, Y. (2015). Gene expression of an arthrobacter in surfactant-enhanced biodegradation of a hydrophobic organic compound. *Environmental Science & Technology*, 49(6), 3698-3704.
- Liang, H., Deng, X., Ji, Q., Sun, F., Shen, T., He, C. (2012). The *Pseudomonas aeruginosa* global regulator VqsR directly inhibits QscR to control quorum-sensing and virulence gene expression. *Journal of Bacteriology*, 194(12), 3098-3108.
- Lindhout, T., Lau, P. C., Brewer, D., Lam, J. S. (2009). Truncation in the core oligosaccharide of lipopolysaccharide affects flagella-mediated motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 via modulation of cell surface attachment. *Microbiology*, 155(10), 3449-3460.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- López, D., Vlamakis, H., Losick, R., Kolter, R. (2009). Paracrine signaling in a bacterium. *Genes & Development*, 23(14), 1631-1638.
- Lorenz, A. et al. (2019). Importance of flagella in acute and chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Environmental Microbiology*, 21(3), 883-897.
- Lyczak, J. B., Cannon, C. L., Pier, G. B. (2000). Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes and Infection*, 2(9), 1051-1060.
- Ma, L., Jackson, K. D., Landry, R. M., Parsek, M. R., Wozniak, D. J. (2006). Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* conditional psl variants reveals roles for the psl polysaccharide in adhesion and maintaining biofilm structure postattachment. *Journal of bacteriology*, 188(23), 8213-8221.
- Ma, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, M. R., Bayles, K., Wozniak, D. J. (2009). Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathogen*, 5(3), e1000354.
- Macé, C. et al. (2008). Identification of biofilm-associated cluster (bac) in *Pseudomonas aeruginosa* involved in biofilm formation and virulence. *PloS One*, 3(12), e3897.
- MacElwee, C. G., Lee, H., Trevors, J. T. (1990). Production of extracellular emulsifying agent by *Pseudomonas aeruginosa* UG1. *Journal of Industrial Microbiology*, 5(1), 25-31.
- Mah, T. F., Pitts, B., Pellock, B., Walker, G. C., Stewart, P. S., O'toole, G. A. (2003). A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature*, 426(6964), 306-310.
- Mah, T. et al. (2003). A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature*, 426(6964), 306.
- Maier, R. M., Soberon-Chavez, G. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(5), 625-633.
- Maira-Litran, T., Allison, D. G., Gilbert, P. (2000). An evaluation of the potential of the multiple antibiotic resistance operon (mar) and the multidrug efflux pump acrAB to moderate resistance towards ciprofloxacin in *Escherichia coli* biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45(6), 789-795.
- Malgaonkar, A., Nair, M. (2019). Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* mediated by RhlR is regulated by a small RNA PhrD. *Scientific reports*, 9(1), 1-11.

- Marchant, R., Banat, I. M. (2012). Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. *Trends in Biotechnology*, 30(11), 558-565.
- Marlowe, E. M., Wang, J. M., Pepper, I. L., Maier, R. M. (2002). Application of a Reverse Transcription-PCR assay to monitor regulation of the catabolic nahAc gene during phenanthrene degradation. *Biodegradation*, 13(4), 251-260.
- Mathee, K. et al. (2008). Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(8), 3100-3105.
- Matilla, M. A., Martín-Mora, D., Gavira, J. A., Krell, T. (2021). *Pseudomonas aeruginosa* as a model to study chemosensory pathway signaling. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 85(1).
- Matsukawa, M., Greenberg, E. P. (2004). Putative exopolysaccharide synthesis genes influence *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Journal of Bacteriology*, 186(14), 4449-4456.
- McKnight, S. L., Iglewski, B. H., Pesci, E. C. (2000). The *Pseudomonas* quinolone signal regulates rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 182(10), 2702-2708.
- McLoon, A. L., Kolodkin-Gal, I., Rubinstein, S. M., Kolter, R., Losick, R. (2011). Spatial regulation of histidine kinases governing biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 193(3), 679-685.
- Medina, G., Juarez, K., Díaz, R., Soberón-Chávez, G. (2003). Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* rhlR, encoding a quorum-sensing regulatory protein. *Microbiology*, 149(11), 3073-3081.
- Merritt, J. H. et al. (2007). SadC reciprocally influences biofilm formation and swarming motility via modulation of exopolysaccharide production and flagellar function. *Journal of Bacteriology*, 189(22), 8154-8164.
- Mikkelsen, H., McMullan, R., Filloux, A. (2011). The *Pseudomonas aeruginosa* reference strain PA14 displays increased virulence due to a mutation in ladS. *PloS One*, 6(12), e29113.
- Miller, D. J., Zhang, Y. M., Rock, C. O., White, S. W. (2006). Structure of RhlG, an essential β -ketoacyl reductase in the rhamnolipid biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(26), 18025-18032.
- Mills, E. et al. (2011). The bacterial second messenger c-di-GMP: mechanisms of signalling. *Cellular Microbiology*, 13(8), 1122-1129.
- Minamino, T. (2014). Protein export through the bacterial flagellar type III export pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1843(8), 1642-1648.
- Morris, J. D., et al. (2011). Imaging and analysis of *Pseudomonas aeruginosa* swarming and rhamnolipid production. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(23), 8310-8317.
- Moscoso, J. A., Jaeger, T., Valentini, M., Hui, K., Jenal, U., Filloux, A. (2014). The diguanylate cyclase SadC is a central player in Gac/Rsm-mediated biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 196(23), 4081-4088.
- Moscoso, J. A. et al. (2011). The *Pseudomonas aeruginosa* sensor RetS switches Type III and Type VI secretion via c-di-GMP signalling. *Environmental Microbiology*, 13(12), 3128-3138.
- Mulcahy, L. R., Isabella, V. M., Lewis, K. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. *Microbial Ecology*, 68(1), 1-12.
- Murray, T. S., Kazmierczak, B. I. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* exhibits sliding motility in the absence of type IV pili and flagella. *Journal of Bacteriology*, 190(8), 2700-2708.

- Nguyen, T. T. et al. (2008). Rhamnolipid biosurfactant mixtures for environmental remediation. *Water Research*, 42(6-7), 1735-1743.
- Nickzad, A., Déziel, E. (2014). The involvement of rhamnolipids in microbial cell adhesion and biofilm development—an approach for control? *Letters in applied microbiology*, 58(5), 447-453.
- Nitschke, M., Costa, D. G., Contiero, J. (2005). Rhamnolipid surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. *Biotechnology Progress*, 21(6), 1593-1600.
- Nitschke, M., Costa, D. G., Contiero, J. (2010). Structure and applications of a rhamnolipid surfactant produced in soybean oil waste. *Applied biochemistry and biotechnology*, 160(7), 2066-2074.
- Nitschke, M., Pastore G. M. (2002). Biossurfactantes: propriedades e aplicações. *Química Nova*, 25(5), 772-776.
- Nolan, L. M., et al. (2018). A global genomic approach uncovers novel components for twitching motility-mediated biofilm expansion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial genomics*, 4(11).
- Nozawa, T., et al. (2007). Rhamnolipid-Dependent Spreading Growth of *Pseudomonas aeruginosa* on a High-Agar Medium: Marked Enhancement under CO₂-Rich Anaerobic Conditions. *Microbiology and immunology*, 51(8), 703-712.
- Oberhardt, M. A. et al. (2008). Genome-scale metabolic network analysis of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, 190(8), 2790-2803.
- Ochsner, U. A., Reiser, J. (1995). Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(14), 6424-6428.
- Ochsner, U. A., Fiechter, A., Reiser, J. (1994). Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlAB genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 269(31), 19787-19795.
- O'Connor, J. R., Kuwada, N. J., Huangyutitham, V., Wiggins, P. A., Harwood, C. S. (2012). Surface sensing and lateral subcellular localization of WspA, the receptor in a chemosensory-like system leading to c-di-GMP production. *Molecular Microbiology*, 86(3), 720-729.
- Olvera, C., Goldberg, J. B., Sánchez, R., Soberón-Chávez, G. (1999). The *Pseudomonas aeruginosa* algC gene product participates in rhamnolipid biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, 179(1), 85-90.
- O'toole, G. A., Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, 30(2), 295-304.
- O'toole, G., Kaplan, H. B., Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 49-79.
- Oura, H., et al. (2015). Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility by 1-naphthol and other bicyclic compounds bearing hydroxyl groups. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(8), 2808-2818.
- Overhage, J., Bains, M., Brazas, M. D., Hancock, R. E. (2008). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance. *Journal of Bacteriology*, 190(8), 2671-2679.
- Owen, S. V. et al. (2020). A window into lysogeny: revealing temperate phage biology with transcriptomics. *Microbial Genomics*, 6(2).

- Pamp, S. J. et al. (2008). Tolerance to the antimicrobial peptide colistin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is linked to metabolically active cells, and depends on the pmr and mexAB-oprM genes. *Molecular Microbiology*, 68(1), 223-240.
- Pamp, S. J., Tolker-Nielsen, T. (2007). Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 189(6), 2531-2539.
- Parsek, M. R., Greenberg, E. P. (2005). Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends in Microbiology*, 13(1), 27-33.
- Patriquin, G. M. et al. (2008). Influence of quorum sensing and iron on twitching motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 190(2), 662-671.
- Pearson, J. P. et al. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signaling is required for virulence in a model of acute pulmonary infection. *Infection and Immunity*, 68(7), 4331-4334.
- Phale, S. et al. (1995). Production of biosurfactant "Biosur-Pm" by *Pseudomonas maltophilia* CSV89: characterization and role in hydrocarbon uptake. *Archives of Microbiology*, 163(6), 424-431.
- Pham, T. H., Webb, J. S., Rehm, B. H. (2004). The role of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa* in rhamnolipid and alginate production as well as stress tolerance and biofilm formation. *Microbiology*, 150(10), 3405-3413.
- Piljac, T., Piljac, G. (2007). *Use of rhamnolipids in wound healing, treating burn shock, atherosclerosis, organ transplants, depression, schizophrenia and cosmetics*. U.S. Patent n. 7,262,171, 28.08.
- Platt, M. D. et al. (2008). Proteomic, microarray, and signature-tagged mutagenesis analyses of anaerobic *Pseudomonas aeruginosa* at pH 6.5, likely representing chronic, late-stage cystic fibrosis airway conditions. *Journal of Bacteriology*, 190(8), 2739-2758.
- Potvin, E., Sanschagrin, F., Levesque, R. C. (2008). Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(1), 38-55.
- Rahim, R. et al. (2001). Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlC gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Molecular Microbiology*, 40(3), 708-718.
- Rahman, K. S. M. et al. (2002). Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. *Biotechnology Progress*, 18(6), 1277-1281.
- Rahmani-Badi, A., Sepehr, S., Fallahi, H., Heidari-Keshel, S. (2015). Dissection of the cis-2-decenoic acid signaling network in *Pseudomonas aeruginosa* using microarray technique. *Frontiers in Microbiology*, 6(1), 383.
- Rahme, L. G. et al. (1995). Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science*, 268(5219), 1899-1902.
- Rampioni, G., et al. (2016). Unravelling the genome-wide contributions of specific 2-alkyl-4-quinolones and PqsE to quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathogens*, 12(11), e1006029.
- Rampioni, G., et al. (2017). Effect of efflux pump inhibition on *Pseudomonas aeruginosa* transcriptome and virulence. *Scientific reports*, 7(1), 1-14.
- Rampioni, G., Polticelli, F., Bertani, I., Righetti, K., Venturi, V., Zennaro, E., Leoni, L. (2007). The *Pseudomonas* quorum-sensing regulator RsaL belongs to the tetrahelical superclass of HTH proteins. *Journal of Bacteriology*, 189(5), 1922-1930.

- Rashid, M. H., Kornberg, A. (2000). Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(9), 4885-4890.
- Rehm, B. H., Mitsky, T. A., Steinbüchel, A. (2001). Role of fatty acid de novo biosynthesis in polyhydroxyalkanoic acid (PHA) and rhamnolipid synthesis by pseudomonads: establishment of the transacylase (PhaG)-mediated pathway for pha biosynthesis in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 3102-3109.
- Reimann, C., Beyeler, M., Latifi, A., Winteler, H., Foglino, M., Lazdunski, A., Haas, D. (1997). The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer N-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase. *Molecular Microbiology*, 24(2), 309-319.
- Reis, R. S., Pereira, A. G., Neves, B. C., Freire, D. M. (2011). Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa*—a review. *Bioresource Technology*, 102(11), 6377-6384.
- Renfro, T. D. et al. (2014). Rhamnolipid surface thermodynamic properties and transport in agricultural soil. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 115(1), 317-322.
- Richmond, C. S., Glasner, J. D., Mau, R., Jin, H., Blattner, F. R. (1999). Genome-wide expression profiling in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Research*, 27(19), 3821-3835.
- Rick, W. Y., Wang, T., Bedzyk, L., Croker, K. M. (2001). Applications of DNA microarrays in microbial systems. *Journal of Microbiological Methods*, 47(3), 257-272.
- Robitaille, S., Groleau, M. C., Déziel, E. (2020). Swarming motility growth favours the emergence of a subpopulation of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing mutants. *Environmental Microbiology*, 22(7), 2892-2906.
- Rodrigue, A. et al (2000). Cell signalling by oligosaccharides. Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many? *Trends in Microbiology*, 8(11), 498-504.
- Sadikot, R. T. et al. (2005). Pathogen–host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 171(11), 1209-1223.
- Salunkhe, P., Töpfer, T., Buer, J., Tümmler, B. (2005). Genome-wide transcriptional profiling of the steady-state response of *Pseudomonas aeruginosa* to hydrogen peroxide. *Journal of Bacteriology*, 187(8), 2565-2572.
- Sana, T. G., Berni, B., Bleves, S. (2016). The T6SSs of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 and their effectors: beyond bacterial-cell targeting. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6(1), 61.
- Santa Anna, L. M., Sebastian, G. V., Menezes, E. P., Alves, T. L. M., Santos, A. S., Pereira Jr, N., Freire, D. M. G. (2002). Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA 1 isolated in oil environments. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 19(2), 159-166.
- Sauer, K. et al. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of Bacteriology*, 184(4), 1140-1154.
- Sawa, T. et al. (1998). In Vitro Cellular Toxicity Predicts *Pseudomonas aeruginosa* Virulence in Lung Infections. *Infection and Immunity*, 66(7), 3242-3249.
- Schmidt, K. D., Tümmler, B., Römling, U. (1996). Comparative genome mapping of *Pseudomonas aeruginosa* PAO with *P. aeruginosa* C, which belongs to a major clone in cystic fibrosis patients and aquatic habitats. *Journal of Bacteriology*, 178(1), 85-93.
- Schuster, M., Greenberg, E. P. (2007). Early activation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* reveals the architecture of a complex regulon. *BMC genomics*, 8(1), 287.

- Schuster, M., Lostroh, C. P., Ogi, T., Greenberg, E. P. (2003). Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *Journal of Bacteriology*, 185(7), 2066-2079.
- Seed, P. C., Passador, L., Iglewski, B. H. (1995). Activation of the *Pseudomonas aeruginosa* lasI gene by LasR and the *Pseudomonas* autoinducer PAI: an autoinduction regulatory hierarchy. *Journal of Bacteriology*, 177(3), 654-659.
- Shao, B., et al. (2017). Effects of rhamnolipids on microorganism characteristics and applications in composting: a review. *Microbiological Research*, 200, 33-44.
- Sharma, V., Noriega, C. E., Rowe, J. J. (2006). Involvement of NarK1 and NarK2 proteins in transport of nitrate and nitrite in the denitrifying bacterium *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Applied Environmental Microbiology*, 72(1), 695-701.
- Shrout, J. D., Chopp, D. L., Just, C. L., Hentzer, M., Givskov, M., Parsek, M. R. (2006). The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Molecular Microbiology*, 62(5), 1264-1277.
- Silby, M. W. et al. (2011). *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(4), 652-680.
- Sim, L., Ward, O. P., Li, Z. Y. (1997). Production and characterisation of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19(4), 232-238.
- Small, D. A., Chang, W., Toghrol, F., Bentley, W. E. (2007). Comparative global transcription analysis of sodium hypochlorite, peracetic acid, and hydrogen peroxide on *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(5), 1093-1105.
- Soberón-Chávez, G. (2004). Biosynthesis of rhamnolipids. In *Pseudomonas*. Springer, Boston, MA, 173-189.
- Soberón-Chávez, G., González-Valdez, A., Soto-Aceves, M. P., Cocotl-Yañez, M. (2020). Rhamnolipids produced by *Pseudomonas*: from molecular genetics to the market. *Microbial Biotechnology*, 14(1), 136-146.
- Soberón-Chávez, G., Lépine, F., Déziel, E. (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(6), 718-725.
- Sodagari, M., Invally, K., Ju, L. (2018). Maximize rhamnolipid production with low foaming and high yield. *Enzyme and Microbial Technology*, 110(1), 79-86.
- Soltani, D., Soroosh, M., Ju, L. (2016). Rhamnolipids as environmentally friendly biopesticide against plant pathogen *Phytophthora sojae*. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 35(1), 169-173.
- Sonawane, A. et al. (2006). Neutrophil elastase, an innate immunity effector molecule, represses flagellin transcription in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, 74(12), 6682-6689.
- Sotirova, A., Spasova, D., Vasileva-Tonkova, E., Galabova, D. (2009). Effects of rhamnolipid-biosurfactant on cell surface of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiological Research*. 164(3), 297-303.
- Stapper, A. P. et al. (2004). Alginate production affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development and architecture, but is not essential for biofilm formation. *Journal of Medical Microbiology*, 53(7), 679-690.
- Stoodley, P. et al. (2005). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Reviews in Microbiology*, 56(1), 187-209.

- Stover, C. K. et al. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406(6799), 959.
- Strateva, T., Mitov, I. (2011). Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Annals of Microbiology*, 61(4), 717-732.
- Strehmel, J., Neidig, A., Nusser, M., Geffers, R., Brenner-Weiss, G., Overhage, J. (2015). Sensor kinase PA4398 modulates swarming motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(4), 1274-1285.
- Suci, P. A., Mittelman, M. W., Yu, F. P., Geesey, G. G. (1994). Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38(9), 2125-2133.
- Suh, S. J., Silo-Suh, L., Woods, D. E., Hassett, D. J., West, S. E., Ohman, D. E. (1999). Effect of rpoS mutation on the stress response and expression of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 181(13), 3890-3897.
- Suh, S., Invally, K., Ju, L. (2019). Rhamnolipids: Pathways, Productivities, and Potential. In: Biobased Surfactants. AOCs Press, 169-203.
- Sutherland, I. W. (2001). The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology*, 9(5), 222-227.
- Takahashi, C., Nozawa, T., Tanikawa, T., Nakagawa, Y., Wakita, J., Matsushita, M., Matsuyama, T. (2008). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 without differentiation into elongated hyperflagellates on hard agar minimal medium. *FEMS Microbiology Letters*, 280(2), 169-175.
- Tang, H. B. et al. (1996). Contribution of specific *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors to pathogenesis of pneumonia in a neonatal mouse model of infection. *Infection and Immunity*, 64(1), 37-43.
- Tao, H., Bausch, C., Richmond, C., Blattner, F. R., Conway, T. (1999). Functional genomics: expression analysis of *Escherichia coli* growing on minimal and rich media. *Journal of Bacteriology*, 181(20), 6425-6440.
- Tatusov, R. L. et al. (2000). The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 33-36.
- Tavares, L. F. D et al. (2013). Characterization of rhamnolipids produced by wild-type and engineered *Burkholderia kururiensis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(5), 1909-1921.
- Thornton, B., Basu, C. (2011). Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 39(2), 145-154.
- Toutain, C. M., Zegans, M. E., O'toole, G. A. (2005). Evidence for two flagellar stators and their role in the motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 187(2), 771-777.
- Tremblay, J., Déziel, E. (2010). Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility. *BMC genomics*, 11(1), 587.
- Tremblay, J. et al. (2007). Self-produced extracellular stimuli modulate the *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility behaviour. *Environmental Microbiology*, 9(10), 2622-2630.
- Tsao, Y. et al. (2018). Phage morons play an important role in *Pseudomonas aeruginosa* phenotypes. *Journal of Bacteriology*, 200(22).
- Untergasser, A. et al. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research*, 35(2), 71-74.

- Valentini, M., Laventie, B. J., Moscoso, J., Jenal, U., Filloux, A. (2016). The diguanylate cyclase HsbD intersects with the HptB regulatory cascade to control *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and motility. *PLoS Genetics*, 12(10), e1006354.
- Van Alst, N. E., Picardo, K. F., Iglewski, B. H., Haidaris, C. G. (2007). Nitrate sensing and metabolism modulate motility, biofilm formation, and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, 75(8), 3780-3790.
- Van Delden, C., Comte, R., Bally, M. (2001). Stringent Response Activates Quorum Sensing and Modulates Cell Density-Dependent Gene Expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 183(18), 5376-5384.
- Van Gennip, M. et al. (2009). Inactivation of the *rhIA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* prevents rhamnolipid production, disabling the protection against polymorphonuclear leukocytes. *Apmis*, 117(7), 537-546.
- Varjani, S. J., Upasani, V. N. (2016). Carbon spectrum utilization by an indigenous strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514: Production, characterization and surface active properties of biosurfactant. *Bioresource Technology*, 221(1), 510-516.
- Vasseur, P. et al. (2005). The *pel* genes of the *Pseudomonas aeruginosa* PAK strain are involved at early and late stages of biofilm formation. *Microbiology*, 151(3), 985-997.
- Ventre, I., et al. (2006). Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(1), 171-176.
- Verstraeten, N., Braeken, K., Debkumari, B., Fauvart, M., Fransaer, J., Vermant, J., Michiels, J. (2008). Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends in Microbiology*, 16(10), 496-506.
- Wagner, V. E., Bushnell, D., Passador, L., Brooks, A. I., Iglewski, B. H. (2003). Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *Journal of Bacteriology*, 185(7), 2080-2095.
- Wagner, V. E., Gillis, R. J., Iglewski, B. H. (2004). Transcriptome analysis of quorum-sensing regulation and virulence factor expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Vaccine*, 22, S15-S20.
- Wang, Q., Suzuki, A., Mariconda, S., Porwollik, S., Harshey, R. M. (2005). Sensing wetness: a new role for the bacterial flagellum. *The EMBO Journal*, 24(11), 2034-2042.
- Wang, S. et al. (2014). Coordination of swarming motility, biosurfactant synthesis, and biofilm matrix exopolysaccharide production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Environmental Microbiology*, 80(21), 6724-6732.
- Wenner, N., Maes, A., Cotado-Sampayo, M., Lapouge, K. (2014). NrsZ: a novel, processed, nitrogen-dependent, small non-coding RNA that regulates *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1 virulence. *Environmental Microbiology*, 16(4), 1053-1068.
- Whang, L. et al. (2008). Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *Journal of Hazardous Materials*, 151(1), 155-163.
- Whiteley, M., Banger, M. G., Bumgarner, R. E., Parsek, M. R., Teitzel, G. M., Lory, S., Greenberg, E. P. (2001). Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*, 413(6858), 860-864.
- Whiteley, M., Parsek, M. R., Greenberg, E. P. (2000). Regulation of Quorum Sensing by RpoS in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 182(15), 4356-4360.

- Wilhelm, S. et al. (2007). The autotransporter esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* is required for rhamnolipid production, cell motility, and biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 189(18), 6695-6703.
- Williams, P., Cámara, M. (2009). Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Current Opinion in Microbiology*, 12(2), 182-191.
- Williams, P. A., Worsey, M. J. (1976). Ubiquity of plasmids in coding for toluene and xylene metabolism in soil bacteria: evidence for the existence of new TOL plasmids. *Journal of Bacteriology*, 125(3), 818-828.
- Williamson, K. S., Richards, L. A., Perez-Osorio, A. C., Pitts, B., McInnerney, K., Stewart, P. S., Franklin, M. J. (2012). Heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms includes expression of ribosome hibernation factors in the antibiotic-tolerant subpopulation and hypoxia-induced stress response in the metabolically active population. *Journal of Bacteriology*, 194(8), 2062-2073.
- Winsor, G. L. et al. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* Genome Database and PseudoCAP: facilitating community-based, continually updated, genome annotation. *Nucleic Acids Research*, 33(1), 338-343.
- Wittgens, A., et al. (2011). Growth independent rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic *Pseudomonas putida* KT2440. *Microbial Cell Factories*, 10(1), 80.
- Wittgens, A. et al. (2017). Novel insights into biosynthesis and uptake of rhamnolipids and their precursors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(7), 2865-2878.
- Wolfgang, M. C. et al. (2004) *Pseudomonas aeruginosa* regulates flagellin expression as part of a global response to airway fluid from cystic fibrosis patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(17), 6664-6668.
- Wood, T. L., Gong, T., Zhu, L., Miller, J., Miller, D. S., Yin, B., Wood, T. K. (2018). Rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* disperse the biofilms of sulfate-reducing bacteria. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 4(1), 1-8.
- Wozniak, D. J. et al. (2003). Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100 (13), 7907-7912.
- Wu, J. Y., Yeh, K. L., Lu, W. B., Lin, C. L., Chang, J. S. (2008). Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site. *Bioresource Technology*, 99(5), 1157-1164.
- Xavier, J. B., Kim, W., Foster, K. R. (2011). A molecular mechanism that stabilizes cooperative secretions in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 79(1), 166-179.
- Xia, W. et al. (2011). Comparative study of biosurfactant produced by microorganisms isolated from formation water of petroleum reservoir. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 392(1), 124-130.
- Xiao, G., et al. (2006). MvfR, a key *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity LTTR-class regulatory protein, has dual ligands. *Molecular Microbiology*, 62(6), 1689-1699.
- Xing, Q. et al. (2018). Structures of chaperone-substrate complexes docked onto the export gate in a type III secretion system. *Nature Communications*, 9(1), 1-9.
- Xu, J., Platt, T. G., Fuqua, C. (2012). Regulatory linkages between flagella and surfactant during swarming behavior: lubricating the flagellar propeller? *Journal of Bacteriology*, 194(6), 1283-1286.
- Yang, L. et al. (2011). Distinct roles of extracellular polymeric substances in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Environmental Microbiology*, 13(7), 1705-1717.

- Yeung, A. T., Torfs, E. C., Jamshidi, F., Bains, M., Wiegand, I., Hancock, R. E., Overhage, J. (2009). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is controlled by a broad spectrum of transcriptional regulators, including MetR. *Journal of Bacteriology*, 191(18), 5592-5602.
- Young, G. M., Smith, M. J., Minnich, S. A., Miller, V. L. (1999). The *Yersinia enterocolitica* motility master regulatory operon, *flhDC*, is required for flagellin production, swimming motility, and swarming motility. *Journal of Bacteriology*, 181(9), 2823-2833.
- Yu, S. et al. (2016). A survival strategy for *Pseudomonas aeruginosa* that uses exopolysaccharides to sequester and store iron to stimulate Psl-dependent biofilm formation. *Applied Environmental Microbiology*, 82(21), 6403-6413.
- Zerrouh, H., de Vicente, A., Pérez-García, A., Romero, D. (2014). Surfactin triggers biofilm formation of *Bacillus subtilis* in melon phylloplane and contributes to the biocontrol activity. *Environmental Microbiology*, 16(7), 2196-2211.
- Zhang, L., Veres-Schalnat, T. A., Somogyi, A., Pemberton, J. E., Maier, R. M. (2012). Fatty acid cosubstrates provide β -oxidation precursors for rhamnolipid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*, as evidenced by isotope tracing and gene expression assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(24), 8611-8622.
- Zhang, X. X., Rainey, P. B. (2008). Regulation of copper homeostasis in *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *Environmental Microbiology*, 10(12), 3284-3294.
- Zhang, Y., Miller, R. M. (1995). Effect of rhamnolipid (biosurfactant) structure on solubilization and biodegradation of n-alkanes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(6), 2247-2251.
- Zheng, H. et al. (2017). Synthetic analogs of rhamnolipids modulate structured biofilms formed by rhamnolipid-nonproducing mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(6), 1830-1838.
- Zhu, K., Rock, C. O. (2006). RhlA converts β -hydroxyacyl-acyl carrier protein intermediates in fatty acid synthesis to the β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate component of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 190(9), 3147-3154.
- Zulianello, L., Canard, C., Köhler, T., Caille, D., Lacroix, J. S., Meda, P. (2006). Rhamnolipids are virulence factors that promote early infiltration of primary human airway epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, 74(6), 3134-3147.