

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

NATALIA FERNANDA BUENO

**Caracterização de dois pares efetor/inibidor
associados ao Sistema de Secreção Tipo IV de
*Xanthomonas citri***

Versão corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o programa)

São Paulo

2018

NATALIA FERNANDA BUENO

**Caracterização de dois pares efetor/inibidor
associados ao Sistema de Secreção Tipo IV de
*Xanthomonas citri***

Dissertação apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Mestre em Ciências, área Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Shaker Chuck Farah

São Paulo
2018

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL O PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MÉDIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO
E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

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

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:

Marlene Aparecida Vieira –CRB-8/5562

B928c Bueno, Natalia Fernanda
Caracterização de dois pares efetor/inibidor
associados ao Sistema de Secreção Tipo IV de
Xanthomonas citri / Natalia Fernanda Bueno. - São
Paulo, 2018.
159 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da
Universidade de São Paulo. Departamento de
Bioquímica.

Orientador: Farah, Shaker Chuck

1. Bioquímica microbiana. 2. Biologia estrutural.
3. Sistema de Secreção Tipo IV (T4SS). 4.
Xanthomonas citri. 5. Sistema efetor/inibidor. I.
T. II. Farah, Shaker Chuck, orientador.

*Dedico este trabalho a minha mãe
por não ceder na sua luta de viver
e a minha avó que faz tempo
é um todo com o universo.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço o exemplo de superação, dedicação e fortaleza que sempre tive de minha avó e minha mãe, porque isso fez em mim manter meu desejo de quer continuar no caminho da pesquisa que desde o início se apresentou como um sonho difícil e distante. O sonho de tentar entender a natureza sempre foi muito mais forte que todos os obstáculos apresentados no caminho para assumir o risco de seguir na frente onde meu único conforto foi acreditar que era possível.

Ao meu orientador Chuck Farah por me acolher em seu laboratório e mostrar para mim o apaixonante mundo da biologia estrutural e funcional.

Aos meus queridos amigos Griselda Perona, Edgar Llontop e Germán Sgro por dar-me o melhor presente que podia receber o valioso tempo compartilhado entre risadas, brincadeiras, conselhos, experimentos, música e sushi. A Ilda Souza e Camila Schroeder por ser muito mais que só colegas de trabalho, por se importar por meu bem-estar.

Aos meus companheiros do laboratório, do laboratório do professor Roberto Salinas, da professora Iolanda Cuccovia e da professora Cristiane Guzzo pela boa convivência, a discussão acadêmica e a troca de ideias para novas abordagens metodológicas.

Às professoras Iolanda Cuccovia do IQ-USP e Denize Favaro da UNICAMP pela boa disposição tempo todo para me ensinar e ajudar-me no desenvolvimento de meus experimentos.

À Superintendência de Assistência Social (SAS) da USP pelo apoio estudantil, porque sem essa grande ajuda com certeza não ia conseguir concluir meu mestrado.

Às agências de fomento CAPES e FAPESP

“Não tive uma educação científica, porém sempre há um caminho para quem quer aprender”

- Ada E. Yonath-

“Uma grande vantagem da análise de raios-X como método de análise de estrutura química é o seu poder de mostrar alguma estrutura totalmente inesperada e surpreendente, com ao mesmo tempo, total certeza”

-Dorothy Crowfoot Hodgkin-

“Eu sou uma daquelas que pensam que a ciência tem uma grande beleza. Um sábio em seu laboratório não é apenas um teórico. Ele também é uma criança colocada diante dos fenômenos naturais que o impressionam como um conto de fadas”

-Marie Curie-

RESUMO

Bueno, N.F. **Caracterização de dois pares efetor/inibidor associados ao Sistema de Secreção Tipo IV de *Xanthomonas citri***. 2018. 159p. Dissertação – Programa de Pós-graduação em Ciências (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O sistema de secreção tipo IV (T4SS) da família de bactérias Xanthomonadaceae transfere efetores (X-Tfes) com a capacidade de matar outras bactérias, conferindo uma vantagem em comunidades bacterianas mistas para colonizar diferentes nichos como o solo ou as superfícies das plantas. Os X-Tfes possuem diferentes domínios putativos com atividades hidrolíticas contra componentes do envelope celular bacteriano do tipo: glicohidrolases, transglicosilases, amidases e lipases. Os X-Tfes por sua atividade biológica inata podem ocasionar dano intracelular para a bactéria que os produz. Para se proteger contra estas atividades, também são produzidas lipoproteínas com função inibitória (X-Tfis) localizadas no periplasma. Os genes que codificam os X-Tfes e os X-Tfis estão organizados em operons, o que permite gerar os pares efetor/inibidor simultaneamente.

Entre os potenciais X-Tfes do fitopatógeno *Xanthomonas citri* estão Xac1918 e Xac0574. Xac1918 é uma proteína com um domínio da superfamília da lisozima e um domínio conhecido como RTX (“Repeats in Toxin”) de ligação ao cálcio, enquanto Xac0574 tem um domínio da superfamília da lipase 3. Os seus possíveis inibidores, Xac1917 e Xac0573 respectivamente, apresentam um peptídeo sinal no N-terminal contendo o lipobox representativo das lipoproteínas.

As proteínas Xac0574 e Xac0573 são monômeros em solução que formam um complexo estável 1:1, favorecido termodinamicamente ($\Delta G^\circ = -12$ Kcal/mol) com uma constante de dissociação de 2,45 nM, garantindo que a bactéria fique protegida contra os efeitos nocivos de Xac0574 quando é produzida intracelularmente. Xac0574 é uma fosfolipase A_1 , sem atividade lisofosfolipase, com a capacidade de hidrolisar os três fosfolípidios majoritários que compõem a membrana celular bacteriana, fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina e fosfatidiletanolamina (PE), mostrando uma aparente preferência pelo último. A atividade enzimática de Xac0574 explica a forte inibição do crescimento celular em *E. coli* após da sua indução heteróloga, já que gera uma diminuição de quase 10 vezes da população celular comparada com a cultura não induzida com a mesma construção. Por

outro lado, Xac0573 inibe efetivamente a atividade enzimática de Xac0574 ao formar o complexo, além de não ter atividade fosfolipase nem lisofosfolipase.

Foram produzidos cristais da Xac1918 e Xac0573 que difrataram com uma resolução de 3,0 e 2,5 Å, respectivamente. Porém, só foi gerado um modelo de Xac0573. Xac0573 está composta por duas folhas β antiparalelas com uma topologia característica de β sanduíche Com uma pequena hélice α e duas voltas. Um alinhamento de homólogos de Xac0573 identificou nas extremidades da proteína as regiões conservadas, constituindo duas possíveis interfaces de interação que podem ser as responsáveis por bloquear o acesso dos fosfolipídios ao sítio catalítico ou impedir os rearranjos estruturais de Xac0574 que são necessários para a sua atividade enzimática. Adicionalmente, a topologia da Xac0573 é semelhante do domínio C2, conhecido em eucariotos como domínio de ligação ao lipídio e ao cálcio, e está envolvido em processos de sinalização de segundos mensageiros lipídicos, proteínas de tráfego de membranas e mecanismos de fusão de membranas. Nossos resultados apontam para uma nova função biológica do domínio C2 como um inibidor enzimático intracelular em bactérias.

Palavras-chave: Sistema de Secreção Tipo IV (T4SS), *Xanthomonas*, efetor (X-Tfe), inibidor (X-Tfi), fosfolipase A₁, membrana bacteriana.

ABSTRACT

Bueno, N.F. **Characterization of the two effector/inhibitor pair associated with the type IV secretion system of *Xanthomonas citri***. 2018. 159p. Masters Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The type IV secretion system (T4SS) of the bacteria family Xanthomonadaceae transfers effectors (X-Tfes) with that can kill other bacterial cells, conferring an advantage to the bacterial community during colonization of different niches in the soil or on the plant surface. The X-Tfes possess different putative domains with hydrolytic activity against components of the bacterial cellular envelope, including glycohydrolase, transglycolase, amidase and lipase domain. The innate biological activity of X-Tfes can cause intracellular damage. Therefore, the bacteria that produce them also produce lipoproteins with inhibitor function (X-Tfis) located in the periplasm for their protection. The genes that code for X-Tfes and X-Tfis are organized in operons that allow for their simultaneous expression.

Among the X-Tfes of the phytopathogen *Xanthomonas citri* are Xac1918 and Xac0574. Xac1918 carries a lysozyme superfamily domain, as well as a domain known as RTX (Repeats in Toxic) predict to bind calcium, while, Xac0574 has a domain belonging to the lipase 3 superfamily. Their possible inhibitors, Xac1917 e Xac0573 respectively, carry an N-terminal signal peptide containing a lipobox found in bacterial lipoproteins.

The Xac0574 and Xac0573 proteins are both monomers in solution, They can form a stable 1:1 complex, that is thermodynamically favored ($\Delta G^\circ = -12$ Kcal/mol) with a dissociation constant of 2,45 nM. This affinity ensure that the bacterium is protected against the harmful effects of Xac0574 when it is produced intracellularly. We show that Xac0574 is a phospholipase A₁, without lysophospholipase activity, and is able to hydrolyze the three most common phospholipids found in the membranes of Gram negative bacteria, namely phosphatidylglycerol (PG), cardiolipin and phosphatidylethanolamine (PE), presenting an apparent preference for PE. The enzymatic activity of Xac0574 explains the strong inhibition of growth of *E. coli* cells after its heterologous induction: a nearly 10-fold decrease in the cell population is observed when compared to the non-induced culture with the same construct. On the other hand, Xac0573 effectively inhibits the enzymatic activity of Xac0574. Furthermore, Xac0573 does not possess when forming the complex, besides not having phospholipase nor lysophospholipase activity.

Crystals of Xac1918 and Xac0573 were produced which diffracted with to resolution of 3.0 and 2.5 Å, respectively. However, we were able to resolve the structure of only Xac0573. Xac0573 is composed of two anti-parallel β sheet that form a β -sandwich with three small helices. An alignment to Xac0573 homologs identified conserved regions at the ends of the protein that constitute two possible interfaces of interaction that may be responsible for blocking the access of the phospholipids to the catalytic site or impede the structural rearrangements of Xac0574 that are necessary for its enzymatic activity. Additionally, the topology of Xac0573 is similar to that to C2 domains, known in eukaryotes to bind lipids and calcium and to be involved in signaling processes mediated by lipid second messengers, membrane trafficking and membrane fusion mechanisms. Our results point to a new biological function of the C2 domain as an intracellular enzyme inhibitor in bacteria.

Keywords: The type IV secretion system (T4SS), *Xanthomonas*, effector (X-Tfe), inhibitor (X-Tfi), phospholipase A₁, bacterial membrane.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Representação da organização do sistema de secreção tipo IV (T4SS). a) Esquema de cada uma das subunidades que compõem o T4SS. b) Mapa de densidade eletrônica obtido por Cryo-EM do plasmídeo pKM101 mostrando o complexo de membrana externa (OMC) e o complexo de membrana interna (IMC). As imagens foram modificadas de (Trokter, Felisberto-Rodrigues, Christie, & Waksman, 2014). 32
- Figura 2. Alinhamento do domínio conservado XVIPCD das proteínas identificadas por ensaios de duplo híbrido que interagem com VirD4. Os resíduos em negrito foram encontrados em seis dos doze XVIPCDs, e por isso são indicados com Cons na parte final do alinhamento. Os números na parte inferior do alinhamento indicam o número total de XVIPCDs que apresentam o resíduo conservado nessa posição. (*) indica os resíduos altamente conservados em 10 ou mais XVIPCDs. Tomado de (Alegria et al., 2005). 37
- Figura 3. Representação dos domínios identificados como efetores (X-Tfe) e do peptídeo sinal em seus inibidores (X-Tfi) de *Xanthomonas citri*. a) Os domínios identificados por análise de bioinformática dos efetores foram: PGB (domínio de ligação ao peptidoglicano), GH19 (família 19 glicohidrolase), SLT (transglicosilase lítica solúvel), Ca⁺² (domínio de ligação ao cálcio), AHH (domínio nuclease). Em azul o domínio XVIPCD. b) Sequência dos inibidores ressaltando em vermelho o lipobox do peptídeo sinal (Souza et al., 2015). 39
- Figura 4. Sequência das proteínas Xac1917 e Xac0573 anotadas no genoma de *X. citri*, ressaltando o peptídeo sinal característico das lipoproteínas. Para Xac1917 em azul claro está a sequência sinal desde o resíduo 101 até 119 e em sublinhado o lipobox (resíduo 116 até 119). Para Xac0573 em azul escuro está a sequência sinal desde o resíduo 1 até 27 e em sublinhado o lipobox (resíduo 24 até 27). 40
- Figura 5. Representação do processo geral de biossíntese das lipoproteínas. Lgt: prolipoproteína diacilgliceril transferase. LspA: Peptidase sinal específica de lipoproteína Lnt: Apolipoproteína N-aciltransferase. Em roxo, a região n e h ancorada na membrana interna. Em verde ligação tioéter na cisteína do lipobox. Modificado de (Narita & Tokuda, 2017). 42
- Figura 6. Sequência da proteína Xac1918 anotada no genoma de *X. citri*, ressaltando os domínios identificados. Em laranja está o domínio “lyzosome like” (desde o resíduo 91 até 181). * Os resíduos Asp99 (D) e Glu110 (E) como possíveis resíduos catalíticos. Em vermelho o domínio RTX de ligação ao Ca²⁺ (desde o resíduo 328 até 366), que está composto por quatro repetições sobrepostas. Em verde o XVIPCD (desde o resíduo 477 até 606). 44
- Figura 7. Representação dos dois possíveis mecanismos catalíticos da lisozima. O Mecanismo A corresponde ao mecanismo proposto por Koshland e o Mecanismo B é o mecanismo proposto por Phillips. Modificado de (Vocadlo, Davies, Laine, & Withers, 2001). 45
- Figura 8. Modelo da protease alcalina de *Pseudomonas aeruginosa* que possui as repetições RTX em forma de β -roll. a) Visão da parte superior do motivo. b) Projeção dos resíduos envolvidos na ligação do cálcio. Adaptado de (Linhartova et al., 2010). 46
- Figura 9. Sequência da proteína Xac0574 anotada no genoma de *X. citri*, ressaltando o domínio identificados. Em marrom o domínio lipase tipo III, no qual está a sequência consenso em negrito e sublinhado (resíduos 125 até 129) do motivo que contém a (*) serina catalítica. Em verde o XVIPCD desde o resíduo 317 até 440/47
- Figura 10. Representação da reação de hidrólise de um triglicerídeo por catálise de uma lipase. a) Substrato intacto. b) Produtos de reação: glicerol e ácidos orgânicos (Jaeger et al., 1994). 47
- Figura 11. Representação da estrutura do enovelamento da superfamília de α/β hidrolase. As hélices α estão representadas por cilindros e as fitas β por setas. Os pontos pretos são a representação dos resíduos da tríade catalítica, composto pelo nucleofilo (serina, depois da fita β_5), o resíduo de aspartato ou glutamato (depois da β_7) e finalmente o resíduo de histidina (na alça antes da hélice α_F). Modificado de (Jaeger et al., 1999). 49
- Figura 12. Esquema do mecanismo de reação da tríada catalítica Serina-Histidina-Aspartato na lipase. 1) Ligação ao lipídio e ativação do resíduo nucleófilo da serina. 2) Intermediário tetraédrico. 3) Intermediário covalente no qual o componente ácido do substrato é esterificado pelo resíduo de serina da enzima. 4) Ativação do resíduo de serina por receber um próton do resíduo de histidina (Jaeger, Dijkstra, & Reetz, 1999). 50
- Figura 13. Mapa de restrição dos vetores de propagação pGEM-T e pJET1.2/Blunt. 54
- Figura 14. Mapa de restrição dos vetores de expressão pET3a, pET11a e pET28a 56
- Figura 15. Esquema representativo das construções dos efetores Xac0574 e Xac1918 com seus possíveis inibidores Xac0573 e Xac1917 respectivamente. A primeira linha da figura é a representação de cada proteína completa. Em baixo, estão as representações das construções feitas, indicando o início e fim de cada uma com o número do resíduo correspondente. XVIPCD: *Xanthomonas* VirD4 Interacting Proteins Conserved

Domain. LIPOB: Sequência consenso do lipobox. LYZ: Possível motivo conservado de lisozima. RTX: Repeats in toxin. Domínio LIPIII: Domínio conservado de lipase tipo três.	79
Figura 16. Representação da estrutura secundária dos trechos próximos aos domínios XVIPCD e as sequência de lipobox para o desenho das construções das proteínas Xac1917, Xac1918, Xac0573 e Xac0574. A análise e representação da estrutura secundária foram feitas no programa PSIPRED (Buchan, Minneci, Nugent, Bryson, & Jones, 2013). a) Representação dos resíduos 81 até 160 da proteína Xac1917, a estrela indica a provável metionina de iniciação (Souza et al., 2015). b) Representação dos resíduos 401 até 520 da proteína Xac1918. c) Representação dos resíduos 1 até 80 da proteína Xac0573. d) Representação dos resíduos 281 até 360 da proteína Xac0574. Na caixa azul está ressaltado a sequência correspondente ao lipobox para X-Tfis Xac1917 e Xac0573. Na caixa verde está ressaltado a sequência correspondente ao início do domínio XVIPCD nos X-Tfis Xac1918 e Xac0574. Nas caixas vermelhas estão os aminoácidos de início de cada construção dos X-Tfis. Nas caixas laranja o aminoácido do final de cada construção dos X-Tfis.	80
Figura 17. Teste de solubilidade de Xac1917 ^{His 135-262} após expressão na cepa <i>E. coli BL21(DE3)</i> . a) Tampão 1: 50 mM Tris pH 7,0, 500 mM NaCl, 5 mM imidazol, sacarose ao 25 % (p/v), variando a concentração de glicerol (v/v) em 0 %, 5 %, 7,5 % e 10 %. b) Tampão 2: 50 mM Tris pH 8,0, 500 mM NaCl, 5 mM imidazol, sacarose ao 25 % (p/v), variando a concentração de glicerol (v/v) em 0 %, 5 %, 7,5 % e 10 %. NI: Não induzido. P: Material insolúvel. S: Sobrenadante. PM: Padrão de peso molecular.	82
Figura 18. Teste de expressão e solubilidade de Xac1917 ^{His 135-262} em <i>E. coli BL21(DE3)Arctic</i> . NI: Não induzido. I: Induzido. P: Material insolúvel. S: Sobrenadante. 0.2 mM: 0.2 mM IPTG. 0.4 mM: 0.4 mM IPTG. 0.6 mM: 0.6 mM IPTG. PM: Padrão de peso molecular.	83
Figura 19. Teste de co-expressão de Xac1917 ^{His 135-262} e Thioredoxina redutase em <i>E. coli BL21(DE3)</i> com 0.4 mM IPTG. NI: Não induzido. I: Induzido. P: Material insolúvel. S: Sobrenadante. PM: Padrão de peso molecular.	83
Figura 20. Etapas de purificação de Xac1918 ^{His 1-473} . a) Cromatograma da cromatografia de afinidade no comprimento de onda de 280nm. b) SDS-PAGE das frações da cromatografia de afinidade. c) Cromatograma da cromatografia de exclusão molecular no comprimento de onda de 280 nm. d) SDS-PAGE das frações da cromatografia de exclusão molecular. NI: Não induzido, I: Induzido, P: Material insolúvel, S: Sobrenadante, FT: Flow through, LAV: Lavado, F: Frações. PM: Padrão de massa molecular.	85
Figura 21. Etapas de purificação de Xac0574 ^{His 1-309} . a) Cromatograma da cromatografia de afinidade no comprimento de onda de 280 nm. b) SDS-PAGE das frações da cromatografia de afinidade. c) Cromatograma da cromatografia de exclusão molecular no comprimento de onda de 280 nm. d) SDS-PAGE das frações da cromatografia de exclusão molecular. NI: Não induzido, I: Induzido, P: Material insolúvel, S: Sobrenadante, FT: Flow through, LAV: Lavado, F: Frações, In: inibidor Xac0573. PM: Padrão de massa molecular.	85
Figura 22. Etapas de purificação de Xac0573 ^{His 49-232} . a) Cromatograma da cromatografia de afinidade no comprimento de onda de 280 nm. b) SDS-PAGE das frações da cromatografia de afinidade. c) Cromatograma da cromatografia de exclusão molecular no comprimento de onda de 280 nm. d) SDS-PAGE das frações da cromatografia de exclusão molecular. NI: Não induzido, I: Induzido, P: Material insolúvel, S: Sobrenadante, FT: Flow through, LAV: Lavado, F: Frações. PM: Padrão de massa molecular.	86
Figura 23. Espectros de dicroísmo circular das proteínas Xac0573 ^{His 49-232} , Xac0574 ^{His 1-309} e o complexo formado entre elas. A concentração das proteínas para os ensaios foi 15 µM, usando como unidades MRE (elipticidade média por resíduo) em função do comprimento de onda. a) Sobreposição dos espectros Xac0573 ^{His 49-232} , Xac0574 ^{His 1-309} e o complexo. b)	87
Figura 24. Determinação do estado oligomérico de Xac0573 ⁴⁹⁻²³² por cromatografia de exclusão molecular. Sobreposição dos cromatogramas obtidos a temperatura ambiente, no comprimento de onda de 280 nm, nas concentrações 75 µM (verde), 150 µM (azul) e 300 µM (marrom) usando a coluna analítica Superdex 200 10/300. a) Calibração da coluna analítica Superdex 200 10/300. b) Gel SDS-PAGE das frações 17 nas diferentes concentrações avaliadas. PM: Padrão de massa molecular.	89
Figura 25. Determinação do estado oligomérico de Xac0574 ¹⁻³⁰⁹ por cromatografia de exclusão molecular. Sobreposição dos cromatogramas obtidos a 10 °C, no comprimento de onda de 220 nm, nas concentrações 50 µM (verde), 75 µM (azul claro) e 100 µM (marrom) usando a coluna analítica Superdex 200 10/300. a) Calibração da coluna analítica Superdex 200 10/300. b) Gel SDS-PAGE das frações 16 nas diferentes concentrações avaliadas. PM: Padrão de massa molecular.	90
Figura 27. Efeito do aumento da concentração do inibidor na estequiometria do complexo Xac0574 ¹⁻³⁰⁹ e Xac0573 ⁴⁹⁻²³² . a) Sobreposição dos cromatogramas com absorvância normalizada usando a coluna analítica Superdex 200 10/300 a temperatura ambiente. Em verde claro o complexo na proporção 1:1,6, e em verde escuro a proporção 1:3. b) Gel SDS-PAGE das frações de cada corrida analítica. As frações 14 até 17 da esquerda são da proporção 1:1,6 enquanto as frações 14 até 18 da direita são da relação 1:3. M é a mistura na proporção 1:3 antes de ser injetada no equipamento. PM: Padrão de massa molecular.	91
Figura 26. Determinação do estado oligomérico do complexo Xac0574 ¹⁻³⁰⁹ e Xac0573 ⁴⁹⁻²³² por cromatografia de exclusão molecular. a) Sobreposição dos cromatogramas com absorvância normalizada usando a coluna	

- analítica Superdex 200 10/300 a 10 °C. Em marrom o complexo na proporção 1:1, em verde Xac0574^{His 1-309} e em azul Xac0573^{His 49-232}. b) Gel SDS-PAGE das frações do complexo na proporção 1:1. 91
- Figura 28. Purificação por cromatografia de afinidade do complexo Xac0574^{His 1-309}-Xac0573^{His 49-232}. a) Cromatograma da cromatografia de afinidade com níquel, no comprimento de onda de 280 nm. b,c) SDS-PAGE das frações que aluíram na cromatografia. NI: Não induzido, I: Induzido, 0573: Xac0573 purificada sem cauda, L: lisado de *E. coli* expressando Xac0574 e com a adição de Xac0573, P: Material insolúvel, S: Sobrenadante, FT: Flow through, LAV: Lavado, F: Frações. PM: Padrão de massa molecular. 92
- Figura 29. Purificação do complexo Xac0574^{His 1-309}-Xac0573^{His 49-232} por cromatografia de exclusão molecular em coluna preparativa. a) Cromatograma no comprimento de onda de 280 nm, obtido usando a coluna Superdex 200. b) Gel SDS-PAGE das frações 37 até 46 da cromatografia. PM: Padrão de massa molecular. 92
- Figura 30. Determinação da massa molar por SEC-MALS de Xac0574^{His 1-309}, Xac0573^{His 49-232} e o complexo entre elas. O ensaio foi feito com uma concentração de 15 µM de cada proteína no tampão 50 mM Tris HCl pH 8, 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂ e 0,02 % (p/v) azida de sódio, onde a linha que atravessa o pico representa a distribuição da massa molar calculada, sendo para Xac0574^{His 1-309} (marrom) 38,2 KDa, para Xac0573^{His 49-232} (azul) 22,8 KDa e para o complexo Xac0574^{His 1-309}-Xac0573^{His 49-232} (verde) 58,1 KDa. 93
- Figura 31. Perfil de titulação isotérmica da interação de Xac0573^{His 49-232} e Xac0574^{His 1-309}. A titulação à 30 °C empregou uma concentração de 200 µM na pipeta de Xac0573^{His 49-232} e 10 µM na célula de reação de Xac0574^{His 1-309}. Ambas proteínas foram diluídas em 20 mM Tris HCl pH 8, 100 mM NaCl e 5 % (v/v) de glicerol. Dados brutos da calorimetria e a linha de base estão no painel superior. A isoterma da titulação, que representa o calor liberado após cada injeção, foi normalizada pela molaridade do titulante (eixo das ordenadas) em função da razão molar de titulante por titulado (eixo das abscissas) no painel inferior. 94
- Figura 32. Perfil de desnaturação térmica por DSC de Xac0573^{His 49-232}, Xac0574^{His 1-309} e o complexo Xac0573^{His 49-232}-Xac0574^{His 1-309}. Em vermelho Xac0574^{His 1-309}, em preto Xac0573^{His 49-232} e em azul o complexo 1:1 Xac0574^{His 1-309}-Xac0573^{His 49-232}. Ensaio feito por triplicata. 98
- Figura 33. Curvas de crescimento dos diferentes insertos no vetor pET28 em *E. coli* BL21(DE3)pLysS. A curva em azul corresponde ao vetor vazio pET28 em presença e ausência de IPTG. A curva em verde corresponde ao pET28a com o inserto de Xac0573 em presença e ausência de IPTG. A curva em roxo corresponde ao pET28a com o inserto de Lip4 em presença e ausência de IPTG e a curva em laranja corresponde ao pET28a com o inserto de Xac0574 em presença e ausência de IPTG. 102
- Figura 34. Ensaio de crescimento em placa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS expressando os diferentes insertos no vetor pET28a por indução com IPTG. 1) *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformada com pET28a sem inserto. 2) *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformada com Xac0574. 3) *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformada com Xac0573. 4) *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformada com Lip4. a) Placa sem IPTG. b) Placa com 25 µM de IPTG. Todas as cepas transformadas têm diluições seriadas desde 10⁰ (direita) até 10⁻⁶ (esquerda). 104
- Figura 35. Cromatografia de capa fina em sílica da reação de Xac0574^{His 1-309} com lecitina de ovo e azeite de oliva. a) Placa de sílica revelada com solução de trióxido de molibdênio e ácido sulfúrico. b) Placa de sílica carbonizada a 120 °C após de ser revelada com solução de trióxido de molibdênio e ácido sulfúrico. v) Frente de corrida. w) Banda correspondente aos ácidos graxos. x) Banda correspondente ao deoxicolato de sódio. y) Banda correspondente à lecitina. z) Banda correspondente à lisolecitina. 1) Branco da reação com lecitina. 2) Lecitina em presença de Xac0574^{His 1-309}. 3) Lecitina em presença de Xac0574^{His 1-309} descongelada. 4) Branco da reação com azeite de oliva. 5) Azeite de oliva em presença de Xac0574^{His 1-309}. 6) Azeite de oliva em presença de Xac0574^{His 1-309} descongelada. 7) Deoxicolato de sódio em água. 105
- Figura 36. Reação de Xac0574^{His 1-309} com lecitina na presença e ausência do cloreto de cálcio e do deoxicolato de sódio. Placa de sílica revelada com solução de trióxido de molibdênio e ácido sulfúrico. 1) Branco da reação contendo 20 mM Tris HCl pH 8 e 6,13 mM de lecitina de ovo. 2) Mistura da reação composta por 20 mM Tris HCl pH 8, 6,13 mM de lecitina de ovo e 1,4 µM de Xac0574^{His 1-309}. 3) Branco da reação com deoxicolato de sódio constituído por 20 mM Tris HCl pH 8, 6,13 mM lecitina de ovo e 40 mM de deoxicolato de sódio. 4) Reação com deoxicolato de sódio, composta por 20 mM Tris HCl pH 8, 6,13 mM lecitina de ovo, 40 mM de deoxicolato de sódio e 1,4 µM de Xac0574^{His 1-309}. y) Banda de lecitina. z) Banda de lisolecitina. 106
- Figura 37. Efeito da variação do pH na atividade enzimática de Xac0574^{His 1-309}. Todas as reações estiveram compostas por: 6,13 mM de lecitina de ovo, 1 µM de Xac0574^{His 1-309} e 23 mM do tampão correspondente de cada pH, e foram conduzidas à 30 °C. 1) Branco do substrato composto por 6,13 mM de lecitina de ovo ressuspendida em água. 2) Reação de lecitina de ovo ressuspendida com acetato de sódio pH 4. 3) Reação de lecitina de ovo ressuspendida com citrato de sódio pH 5. 4) Reação de lecitina de ovo ressuspendida com Bis Tris HCl pH 6. 5) Reação de lecitina de ovo ressuspendida com Bis Tris propano pH 7. 6) Reação de lecitina de ovo ressuspendida com Tris HCl pH 8. y) Banda de lecitina. z) Banda de lisolecitina. 107
- Figura 38. Efeito da concentração de Xac0574^{His 1-309} na detecção do produto de reação em função do tempo. a) Reação com 0,5 µM de Xac0574^{His 1-309}. b) Reação com 1 µM de Xac0574^{His 1-309}. x) Banda de lecitina. y) Banda de lisolecitina. 1) Branco de reação composto por 9,2 mM de lecitina em 50 mM Tris HCl pH 8. 2) Tempo de reação 5 minutos. 3) Tempo de reação 10 minutos. 4) Tempo de reação 15 minutos. 5) Tempo de reação 30 minutos. 6) Tempo de reação 60 minutos. 7) Tempo de reação 120 minutos. 8) Tempo de reação

180 minutos. 9) Tempo de reação 240 minutos.....	107
Figura 39. Inibição enzimática de Xac0574 ^{His 1-309} pela presença de Xac0573 ^{His 49-232} . 1) Branco do substrato composto por 5,0 mM de lecitina de ovo ressuspendida em água. 2) Reação composta por 5,0 mM de lecitina de ovo, 30 mM de Tris HCl pH 8 e 1 µM de Xac0574 ^{His 1-309} . 3) Reação composta por 5,0 mM de lecitina de ovo, 30 mM de Tris HCl pH 8 e 1 µM de Xac0573 ^{His 49-232} . 4) Reação composta com 5,0 mM de lecitina de ovo, 30 mM de Tris HCl pH 8, 1 µM de Xac0574 ^{His 1-309} e 1 µM de Xac0573 ^{His 49-232} . y) Banda de lecitina. z) Banda de lisolecitina.	108
Figura 40. Esquema dos possíveis sítios de corte das diferentes fosfolipase em um fosfolípido. PLA ₁ : Fosfolipase A ₁ . PLA ₂ : Fosfolipase A ₂ . LysoPLA: Lisofosfolipase A. PLB: Fosfolipase B. PLC: Fosfolipase C. PLD: Fosfolipase D (Richmond & Smith, 2011).	109
Figura 41. Estrutura molecular dos fosfolípidios usados como substratos nos ensaios <i>in vitro</i> de Xac0574 ^{His 1-309} . a) POPC. b) POPG. c) Cardiolipina bovina (18:2) ₄ . d) DOPE. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database: CID=5283539 (Cardiolipina), CID=5497103 (POPC), CID=5283509 (POPG) e CID=6437392 (DOPE). (Acessado: 26/01/2018).	110
Figura 42. TLC dos produtos da reação <i>in vitro</i> de Xac0574 ^{His 1-309} com os fosfolípidios POPC, POPG, DOPE e cardiolipina. 1) Branco da reação com POPC. 2) Reação com POPC. 3) Branco da reação com cardiolipina. 4) Reação com cardiolipina. 5) Branco da reação com DOPE. 6) Reação com DOPE. 7) Branco da reação com POPG. 8) Reação com POPG. a) POPC. b) LPC (Lisofosfatidilcolina). c) Possível produto de degradação da cardiolipina. d) Cardiolipina. e) DOPE. f) Deoxicolato de sódio. g) LPE (lisofosfatidiletanolamina). h) POPG. i) LPG (Lisofosfatidilglicerol).	111
Figura 43 Cromatograma dos íons identificados por LC/MS da reação de Xac0574 ^{His 1-309} com POPC em 20 mM Tris HCl pH 8. a) Estrutura do POPC ressaltando os possíveis sítios das quebras das ligações pela reação enzimática. b) Cromatograma correspondente ao LPC 18:1 (m/z 580,362) e LPC 16:0 (m/z 554,346). c) Cromatograma dos ácidos graxos palmítico (16:0) (m/z 255,233) e oleico (18:1) (m/z 281,249). d) Cromatograma correspondente ao POPC-Acetato (m/z 818,592). Os tempos de reação comparados foram: 2 horas (rosa), 4 horas (laranja), 22 horas (verde) com o controle da reação (azul).	112
Figura 44. Cromatograma dos íons identificados por LC/MS da reação de POPG em 20 mM Tris HCl pH 8. a) Estrutura do POPG ressaltando os possíveis sítios das quebras das ligações pela reação enzimática. b) Cromatograma correspondente ao LPG 18:1 (m/z 509,285) e LPG 16:0 (m/z 483,269). c) Cromatograma dos ácidos graxos palmítico (16:0) (m/z 255,232) e oleico (18:1) (m/z 281,247). d) Cromatograma correspondente ao POPG ionizado (m/z 747,518). Os tempos de reação comparados foram: 10 minutos (rosa), 20 minutos (vermelho), 30 minutos (amarelo), 45 minutos (verde), 90 minutos (azul claro) com o controle da reação (azul).	114
Figura 45. Cromatograma dos íons identificados por LC/MS da reação de DOPE em 20 mM Tris HCl pH 8 e 4,76 mM de deoxicolato de sódio. a) Estrutura do DOPE ressaltando os possíveis sítios das quebras das ligações pela reação enzimática b) Cromatograma correspondente ao LPE 18:1 (m/z 478,295). c) Cromatograma do ácido oleico (18:1) (m/z 281,250). d) Cromatograma correspondente ao DOPE ionizado (m/z 742,539). Os tempos de reação comparados foram: 5 minutos (rosa), 30 minutos (laranja), 60 minutos (verde), 90 minutos (amarelo) com o controle da reação (azul).	115
Figura 46. Cromatograma dos íons identificados por LC/MS da reação de cardiolipina bovina em 20 mM Tris HCl pH 8. a) Estrutura da cardiolipina bovina com os sítios das quebras pela ionização. M: Monoacilglicerolfosfato. D: diacilglicerolfosfato. b) Cromatograma correspondente ao ácido linoleico 18:2 (m/z 279,235). c) Cromatograma correspondente à cardiolipina ionizada (m/z 1447,959). Os tempos de reação comparados foram: 30 minutos (rosa), 45 minutos (laranja), 60 minutos (verde) com o controle da reação (azul).	115
Figura 47. Reação <i>in vitro</i> com Xac0574 ^{His 1-309} utilizando como substrato L-α-lisofosfatidilcolina. 1) Branco da reação com 5 mM de lecitina de ovo ressuspendida em água. 2) Reação composta por 5 mM de lecitina de ovo, 30 mM de Tris HCl pH 8 e 1 µM de Xac0574 ^{His 1-309} . 3) Reação composta por 5 mM de lecitina de ovo, 30 mM de Tris HCl pH 8 e 1 µM de Xac0573 ^{His 49-232} . 4) Reação composta por 5 mM de lecitina de ovo, 30 mM de Tris HCl pH 8, 1 µM de Xac0574 ^{His 1-309} e 1 µM de Xac0573 ^{His 49-232} . 5) Branco da reação com 5 mM L-α-lisofosfatidilcolina ressuspendida em água. 2) Reação composta por 5 mM L-α-lisofosfatidilcolina, 30 mM de Tris HCl pH 8 e 1 µM de Xac0574 ^{His 1-309} . 3) Reação composta por 5 mM L-α-lisofosfatidilcolina, 30 mM de Tris HCl pH 8 e 1 µM de Xac0573 ^{His 49-232} . y) Banda de lecitina. z) Banda de lisolecitina.....	117
Figura 48. Cristais de Xac1918 ^{His1-473} obtidos nas diferentes metodologias de refinamento. a) Cristais obtidos do refinamento por variação das concentrações do composto precipitante e o pH da solução. Condição: 0,1 M (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 0,1 M Bis Tris pH 6,4; 24 % PEG 3350. b) Cristais obtidos pela técnica de microseeding na condição: 0,1 M HEPES pH 7,5; 19 % PEG 3350. c) Cristais obtidos com o kit Additive screen na condição: 0,1 M (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 0,1 M Bis Tris pH 6,4; 24 % PEG 3350 suplementada com 2,0 M NDSB - 211. d) Cristais obtidos com o kit Silver bullets na condição: 0,1 M (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 0,1 M Bis Tris pH 6,4; 24 % PEG 3350 suplementada com 0,2 % (p/v) 1,4-Diaminobutano, 0,2 % (p/v) 1,8-Diaminooctano, 0,2 % (p/v) cadaverina, 0,2 % (p/v) Dicloridrato de cistamina, 0,2 % (p/v) Espermidina e 0,02 M HEPES de sódio pH 6,8.	120
Figura 49. Proteólise controlada de Xac1918 ^{His1-473} com diluições de quimotripsina e tripsina a 30°C por duas	

horas. Gel SDS PAGE de tricina 12%. PM: Padrão de massa molecular.....	121
Figura 50. Comparação dos cromatogramas de Xac1918 ^{His 1-473} das proteólises controlada com quimotripsina e tripsina e a proteína sem digerir. Corrida cromatográfica acompanhada no comprimento de onda de 280 nm.	121
Figura 51. Western blot anti-His na reação de proteólise controlada em Xac1918 ^{His 1-473} com quimotripsina e tripsina. a) SDS-PAGE e Western blot Anti-His das frações eluídas do pico cromatográfico da proteólise com quimotripsina. b) SDS-PAGE e Western blot Anti-His das frações eluídas do pico cromatográfico da proteólise com tripsina. F: Frações da eluição. PM: Peso molecular.	122
Figura 52. Cristais de Xac0573 ⁴⁹⁻²³² obtidos por refinamento tradicional e proteólise <i>in situ</i> . a) Cristal gerado na condição 0,22 M de CaCl ₂ e 24 % (p/v) PEG 3350. b) Cristal formado na condição 0,05 M de ácido cítrico, 0,05 M Bis Tris propano pH 5,0 e 16 % (p/v) PEG 3350 . c) Cristal produzido da proteólise com tripsina (1/1000) na condição 0,10 M citrato de amônio e 24 % (p/v) PEG 3350.	125
Figura 53. Cristais de Xac0574 ¹⁻³⁰⁹ obtidos por refinamento tradicional. a) Cristal de sal. b) Cristal obtido no teste inicial com o kit Crystal screen 2 na condição 0,2 M fosfato de amônio monobásico, 0,1 M Tris pH 8,5 e 50 % (v/v) MDP. c,d) Refinamento da condição b variando o pH e a porcentagem de MDP.....	126
Figura 54. Cristais do complexo Xac0574 ¹⁻³⁰⁹ -Xac0573 ⁴⁹⁻²³² . a) Cristal obtido com o Kit Crystal screen 2 na condição 0,2 M fosfato monobásico de amônio, 0,1 M Tris pH 8,5 e 50 % (v/v) MDP. b) Cristal obtido com o kit Index na condição 0,2 M acetato de amônio monobásico, 0,1 M Bis Tris pH 5,5 e 25 % (p/v) PEG 3350. c) Cristais gerados na condição 0,2 M CaCl ₂ e 20 % (p/v) PEG 3350 do kit PEG ION. d) Cristais gerados com o kit PEGRX 2 na condição 0,2 M cloreto de magnésio, 0,1 M citrato de sódio tribásico e 10 % (p/v) PEG 20000.	127
Figura 55. Purificação por cromatografia de afinidade do complexo Xac0574 pET11a-Xac0573 pET28a. a) Cromatograma da cromatografia de afinidade HiTrap obtido no comprimento de onda de 280 nm. b) SDS-PAGE das frações que aluíram na cromatografia. M: Mistura de células, P: Material insolúvel, S: Sobrenadante, FT: Flow through, LAV: Lavado, F: Frações. PM: Padrão de massa molecular.	129
Figura 56. Diagrama da topologia de Xac0573. O enovelamento majoritariamente em arquitetura de β sanduíche	132
Figura 57. Modelo em cartoon de Xac0573 que destaca as estruturas secundárias após da rotação de 90°. Estruturas resolvida por Se-SAD à 2,4 Å de resolução. Em azul escuro as folhas β, em verde as hélice α, em azul claro as alças, em vermelho as moléculas de água e em verde claro o átomo de cálcio	133
Figura 58 Núcleo hidrofóbico da estrutura de Xac0573. Os resíduos que compõem o núcleo são: Val70, Ala86, Val117, Leu131, Ala154, Val156, Ile173 e Leu225.	135
Figura 59 Ponte dissulfeto entre os resíduos da cisteína 98 e cisteína 143.....	136
Figura 60. Interação eletrostática entre Xac0573 e um íon de cálcio favorecido pelas condições de cristalização. a) Interação do átomo de cálcio com o Glu95. Os resíduos pertos à interação são Val92 e Ile111. b) Mapa de potencial eletrostático da região envolvida na interação com o cálcio. Em vermelho são apresentadas as moléculas de água.	137
Figura 61. Estrutura e topologia dos dois domínios C2 determinados por cristalografia de raios X. a) Representação das duas topologias do domínio C2, (I) Sinaptotagmina I –Tipo I (PDB 1DYS), (II) PLC-δ1 – Tipo II (PDB 1DJ1) (Nalefski & Falke, 1996). b) Representação da estrutura em cartoon da topologia I da PCKα e a topologia II da PLCδ (Corbalan-Garcia & Gomez-Fernandez, 2014).	139
Figura 62. Análise de resíduos conservados de Xac0573. a) Sobreposição entre Xac0573 ⁴⁹⁻²³² e domínio C2 de E3 Ubiquitin ligase Smurf1 (PDB 3pyc-A). b) Regiões conservadas de Xac0573. c) Mapeamento das regiões conservadas sobre a superfície de Xac0573 ⁴⁹⁻²³² realizada pelo CONSURF (Ashkenazy, Erez, Martz, Pupko, & Ben-Tal, 2010).	141
Figura 63 Análise da estrutura de Xac0573 ⁴⁹⁻²³² e o domínio C2 de PI-PLC. a) Sobreposição da Xac0573 ⁴⁹⁻²³² e o domínio C2 de PI-PLC. b) Sobreposição de Xac0573 na estrutura de PI-PLC mostrando os domínio “EF-hand”, C2 e catalítico. c) Estrutura cristalográfica da PI-PLC (PDB 2ISD).....	143

LISTA DE TABLAS

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos usados nos diferentes processos de clonagem. Em negrito e sublinhado as sequências do sítio de corte das enzimas de restrição.....	52
Tabela 2. Ciclos de amplificação utilizados nas PCRs para Xac0574 ¹⁻³⁰⁹ e Xac0573 ⁴⁹⁻²³² . O tempo de extensão, Y, de 45 segundos para Xac0574 e 30 segundos para Xac0573.....	53
Tabela 3. Ciclos de amplificação utilizados nas PCRs para as construções Xac1918 ¹⁻⁴²⁶ , Xac1918 ¹⁻⁴⁵¹ e Xac1917 ¹²⁰⁻²⁶²	53
Tabela 4. Ciclos de amplificação utilizados nas PCRs das colônias. A temperatura de anelamento, Y, é a mesma empregada para a amplificação no template do DNA genômico correspondente de cada construção descritas nas tabelas 2 e 3.....	57
Tabela 5. Ciclos de amplificação da reação de seqüenciamento usando BigDye das diferentes construções.....	57
Tabela 6. Tampões usados na cromatografia de afinidade e de exclusão molecular para as proteínas Xac1918 ^{His 1-473} , Xac0574 ^{His 1-309} e Xac0573 ^{His 49-232} . Todos os processos de purificação das proteínas foram conduzidos em um intervalo de temperatura 6 a 8 °C.....	63
Tabela 7. Porcentagens calculadas de Hélice α , Folha β e regiões desenoveladas das proteínas Xac1917, Xac1918, Xac0573 e Xac0574, utilizado o programa Phyre 2 (Kelley et al., 2015).....	79
Tabela 8. Construções finais de cada proteína efetora (X-Tfe) e de imunidade (X-Tfi) nos vetores de expressão.....	81
Tabela 9. Condições de expressão das proteínas em estudo na cepa <i>E. coli</i> . TR: Thioredoxina Redutase pET11a. NT: Proteína não testada para a determinação das condições de expressão.....	84
Tabela 10. Porcentagens das proteínas Xac0573 ^{His 49-232} , Xac0574 ^{His 1-309} e o complexo formado entre elas processado nos softwares K2D3 e Bestsel. (*) Medição experimental.....	88
Tabela 11. Análise das proteínas Xac0574 ^{His 1-309} , Xac0573 ^{His 49-232} e o complexo Xac0574 ^{His 1-309} -Xac0573 ^{His 49-232} por SEC-MALS.....	94
Tabela 12. Determinação dos parâmetros termodinâmicos da interação Xac0573 ^{His 49-232} e Xac0574 ^{His 1-309} por calorimetria de titulação isotérmica (ITC). A reação foi conduzida à 30 °C no tampão 20 mM Tris HCl pH 8,100 mM NaCl e 5 % (v/v) de glicerol. Todos os valores determinados foram medidos em duplicata.....	95
Tabela 13. Parâmetros termodinâmicos determinados por desnaturação térmica por DSC das proteínas Xac0574 ^{His 1-309} , Xac0573 ^{His 49-232} e complexo Xac0573 ^{His 49-232} -Xac0574 ^{His 1-309} . Todos os valores determinados foram medidos em triplicata. $\Delta T_{1/2}$: Representa a largura média do pico e indica a cooperatividade do processo. Reversibilidade: É uma medida que indica a porcentagem das moléculas que voltaram a sua condição nativa logo do processo de desnaturação.....	99
Tabela 14. Caracterização por espectrometria de massas dos fosfolipídios POPC, POPG, DOPE, cardioplipina bovina e dos produtos de cada um deles nas reações com Xac0574 ^{His 1-309}	118
Tabela 15. Principais condições de cristalização da construção Xac1918 ^{His 1-473} . A condição para os testes feitos com os kits Additive screen e Silver Bullets foi 0,1 M Sulfato de amônio, 0,1 M Bis Tris pH 6,5 e 24 % (p/v) PEG 3350. NT: Cristal não testado em experimentos de difração. PC-quimotripsina: Proteólise controlada com quimotripsina. Convencional: Procedimento usado inicialmente com os kits de screen.....	123
Tabela 16. Dados estatísticos da coleta do cristal nativo de Xac1918 ¹⁻⁴⁷³ . Os dados para a camada de maior resolução são mostrados em parênteses.....	130
Tabela 17. Dados estatísticos da coleta dos cristais de Xac0573 ⁴⁹⁻²³² incorporando selênio-metionina e a proteólise <i>in vitro</i> . Os dados para a camada de maior resolução são mostrados em parênteses.....	131
Tabela 18. Refinamento dos dados de difração de raios-X de Xac0573 ⁴⁹⁻²³²	132
Tabela 19. Área de superfície acessível de proteína monoméricas. MM: Massa molecular. ASA: Área de superfície acessível ao solvente.....	134
Tabela 20. Alinhamento estrutural de Xac0573 realizado no Dali Server. Z-Score: Medida da confiança do resultado da busca. RMSD ("Root mean square deviation"): Medida da distância média da posição entre os átomos da cadeia principal da proteína e Xac0573. Lali: Número de posições alinhadas nos dois modelos. Nres: Número de resíduos na estrutura. %i d: Identidade entre as duas proteínas.....	138

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ATP** - Adenosina trifosfato
- BCIP** - 5-Bromo-4-clor-3-indol-fosfato (*5-Bromo-4-Chloro-3-Indoly-Phosphate*)
- BSA** - Albumina de soro bovino
- D.I.T** - Tiempo de intregração de dados
- D.O.** - Densidade ótica
- D.O_(600nm)** - Densidade ótica no comprimento de onda de 600 nanômetros
- DOPE** - 1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina
- DSC** - Calorimetria diferencial de varredura (*Differential scanning calorimetry*)
- DTT** - Ditiotreitól
- GPC** - Glicerofosfocolina
- IPTG** - Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
- ITC** - Calorimetria de titulação isotérmica (*Isothermal Titration Calorimetry*)
- K_d** - Constante de dissociação
- LC/MS** - Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
- LPC** - Lisofosfatidilcolina
- LPE** - Lisofosfatidilestanolamina
- LPG** - Lisofosfatidilglicerol
- LPL** - Lisofosfolipídio
- LysoPLA** - Lisofosfolipase A
- MAD** - Método de espalhamento anômalo
- MDP** - 2-metil-2,4-pentanediol
- MRE** - Elipticidade média de resíduos
- MTBE** - Metil *tert*-butil éter
- NBT** - Cloreto de nitroblue tetrazólio (*Nitroblue tetrazolium chloride*)
- PBS** - Tampão fosfato salino
- PC** - Fosfatidilcolina
- PCR** - Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain Reaction*)
- PDB** - Banco de Dados de Proteínas (*Protein Data Bank*)
- PE** - Fosfatidiletanolamina
- PEG** - Polietilenoglicol
- PG** - Fosfatidilglicerol
- PLA₁** - Fosfolipase A₁
- PLA₂** - Fosfolipase A₂

PLB - Fosfolipase B

PLC - Fosfolipase C

PLD - Fosfolipase D

PMSF - Fluoreto de fenilmetilsulfonilo

POPC - 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfocolina

POPG - 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfoglicerol

SAD - *Single-wavelength anomalous dispersion*

SDS - Dodecilsulfato de sódio

SDS-PAGE - Electroforese em gel de poliacrilamida com SDS

T4SS - Sistema de secreção do Tipo IV

TLC - Cromatografia de capa fina

Tris HCl - Solução de tris-(hidroximetil)-aminometano ajustado o pH com a adição de ácido clorídrico

Xac - *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	28
1.1 O gênero Xanthomonas	28
1.2 Sistemas de Secreção Bacterianos	30
1.3 Sistema de Secreção Tipo IV (T4SS)	31
1.3.1 Funções dos Sistemas de Secreção Tipo IV (T4SSs)	35
1.3.2 Nova função do T4SS em <i>Xanthomonas spp</i>	37
1.3.3 Os efetores putativos (X-Tfes) Xac1918 e Xac0574 e seus inibidores (X-Tfis) Xac1917 e Xac0573.....	39
2. OBJETIVOS	51
2.1 Objetivos Geral	51
2.2 Objetivos Específicos	51
3. MATERIAIS E MÉTODOS	52
3.1 Clonagem gênica e técnicas de biologia molecular	52
3.1.1 Amplificação de DNA pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR)....	52
3.1.2 Clonagem nos vetores de propagação de DNA pGEM-T Easy e pJET 1.2 blunt ..	54
3.1.3 Clonagem nos vetores de expressão pET3a, pET11a e pET28a	55
3.2 Expressão e purificação de proteínas heterólogas	58
3.2.1 Expressão de proteínas heterólogas em meio 2XTY	58
3.2.2 Expressão de proteínas heterólogas marcadas com selênio-metionina em meio mínimo M9	59
3.2.3 Co-expressão de proteína heterólogas.....	61
3.2.4 Purificação de proteínas heterólogas	61
3.2.5 Remoção da cauda de poli-histidina e quantificação de proteínas.....	64
3.2.6 Western Blot.....	65
3.3 Estudos de interação Proteína-Proteína	67
3.3.1 Estudos de dicroísmo circular.....	67
3.3.2 Determinação do estado oligomérico do complexo Xac0574 ^{His 1-309} -Xac0573 ^{His 49-232} por cromatografia de exclusão molecular analítica.....	67
3.3.3 Determinação do estado oligomérico do complexo Xac0574 ^{His 1-309} -Xac0573 ^{His 49-232} por SEC-MALS.....	68
3.3.4 Caracterização termodinâmica da interação Xac0574 ^{His 1-309} -Xac0573 ^{His 49-232}	68
3.4 Estudos de atividade enzimática e biológica das proteínas Xac0574 e Xac0573	70
3.4.1 Ensaio de crescimento celular <i>E. coli</i>	70
3.4.2 Ensaio de atividade enzimática de Xac0574 com fosfolipídios	71
3.4.3 Identificação de fosfolipídios por cromatografia de capa fina (TLC).....	73

3.4.4 Extração de lipídios totais das reações <i>in vitro</i> com fosfolipídios	73
3.4.5 Análise por espectrometria de massas da extração de lipídios totais das reações <i>in vitro</i>	74
3.5 Cristalografia de proteínas	74
3.5.1 Ensaio de cristalização	74
3.5.2 Proteólise <i>in situ</i> para ensaios de cristalização.....	75
3.5.3 Técnica de sementeamento (seeding).....	76
3.5.4 Coleta e processamento de dados de difração de raios X.....	77
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
4.1 Clonagens dos genes <i>xac1918</i>, <i>xac1917</i>, <i>xac0574</i> e <i>xac0573</i>	79
4.2 Expressão das proteínas heterólogas em <i>E. coli</i>	79
4.2.1 Expressão das proteínas Xac1918 ¹⁻⁴⁷³ , Xac0574 ¹⁻³⁰⁹ e Xac0573 ⁴⁹⁻²³²	81
4.2.2 Expressão da proteína Xac1917 ¹³⁵⁻²⁶²	81
4.3 Purificação das proteínas Xac1918^{His 1-473}, Xac0574^{His 1-309} e Xac0573^{His 49-232}	84
4.4 Estudos de interação das proteínas Xac0574^{His 1-309} e Xac0573^{His 49-232}	86
4.4.1 Estudos de diroísmo circular (CD)	86
4.4.2 Estudos de interação por cromatografia de exclusão molecular	89
4.4.3 Estudos do estado oligomérico do complexo Xac0574 ^{His 1-309} e Xac0573 ^{His 49-232} por SEC-MALS.....	93
4.4.4 Ensaio de calorimetria de titulação isotérmica (ITC)	94
4.4.5 Ensaio de desnaturação térmica por calorimetria diferencial de varrido (DSC).....	97
4.5 Estudos de atividade enzimática e biológica das proteínas Xac0574 e Xac0573	101
4.5.1 Ensaio de crescimento celular e citotoxicidade em <i>E. coli</i>	101
4.5.2 Ensaio <i>in vitro</i> de atividade enzimática de Xac0574 ^{His 1-309} com lecitina de ovo	104
4.5.3 Classificação da atividade fosfolipase de Xac0574 ^{His 1-309}	108
4.6 Ensaio cristalográfico	118
4.6.1 Cristais das proteínas Xac1918 ¹⁻⁴⁷³ , Xac0574 ¹⁻³⁰⁹ , Xac0573 ⁴⁹⁻²³² e o complexo Xac0574 ^{His 1-309} -Xac0573 ^{His 49-232}	119
4.6.1.1 Cristais das proteínas Xac1918 ¹⁻⁴⁷³	119
4.6.1.2 Cristais das proteínas Xac0573 ⁴⁹⁻²³²	124
4.6.1.3 Cristais da proteína Xac0574 ¹⁻³⁰⁹	125
4.6.1.4 Cristais do complexo Xac0574 ^{His 1-309} -Xac0573 ^{His 49-232}	126
4.6.2 Coleta e processamento de dados cristalográficos.....	129
4.6.3 Estrutura de Xac0573 ⁴⁹⁻²³²	132
5. CONCLUSÕES	144
6. REFERÊNCIAS	146
7. APÊNDICE	156

7.1 Espectro ESI-MS de ionização negativa do branco de reação com do POPC-Acetato.....	156
7.2 Espectro ESI-MS de ionização negativa do ácido oleico e o ácido palmítico.....	156
7.3 Espectro ESI-MS de ionização negativa LPC 18:1 e LPC 16:0.....	157
7.4 Espectro ESI-MS de ionização negativa do branco de reação com POPG.....	157
7.5 Espectro ESI-MS de ionização negativa do LPG 18:1 e do LPG 16:0.....	158
7.6 Espectro ESI-MS de ionização negativa da DOPE e LPE 18:1.....	158
7.7 Espectro ESI-MS de ionização negativa da cardioplipina bovina (C18:2)₄.....	159

1. INTRODUÇÃO

1.1 O gênero *Xanthomonas*

A família *Xanthomonadaceae* pertence à classe de γ -proteobactérias, onde seus integrantes são isolados de diferentes nichos como solo, água, lodo, plantas, larvas e amostras clínicas, sendo os gêneros com mais espécies descritas *Lysobacter*, *Pseudoxanthomonas*, *Stenotrophomonas*, *Thermomonas*, *Xanthomonas* e *Xylella*. O gênero *Xanthomonas* é um grupo de bactérias bacilares Gram negativas fitopatogênicas ubíquas com um flagelo polar, que formam em meio sólido colônias circulares, convexas, de cor amarela, semi-translúcidas e com bordas regulares. Elas são aeróbias estritas e têm uma temperatura ótima de crescimento entre 25 até 30 °C (Buttner & Bonas, 2010; Ference et al., 2018; Jin, Kim, Im, Yang, & Lee, 2007).

O gênero *Xanthomonas* tem a capacidade de infectar aproximadamente 124 plantas monocotiledôneas e 268 dicotiledôneas, sendo que *Xanthomonas axonopodis* é o agente causador da doença do cancro cítrico, a qual é classificada em cancro A, B e C dependendo do tipo de cepa que infeta. O cancro A corresponde ao grupo de cepas originárias da Ásia, as quais causam a doença mais severa, sendo *Xanthomonas axonopodis pv citri* (também chamada *Xanthomonas citri pv citri*) o agente causador da doença. O cancro B é causado pelo grupo bacteriano de *Xanthomonas axonopodis pv aurantifolii*, originário do sul da América e afeta o limão mexicano, a laranja ácida e pomelo. O último tipo é o cancro C, também causado pelo grupo de *Xanthomonas axonopodis pv aurantifolii*, mas a diferença é que afeta ao limão mexicano e em algumas ocasiões à laranja ácida no estado de São Paulo no Brasil (Brunings & Gabriel, 2003; Gottwald, Graham, & Schubert, 2002; Graham, Gottwald, Cubero, & Achor, 2004).

As condições ambientais como a temperatura e a chuva tropical e subtropical onde crescem os hospedeiros de *Xanthomonas* favorecem a doença, devido que as chuvas são eventos frequentes e curtos que vão acompanhados de fortes ventos, que gera o transporte da bactéria nas gotas e dá as condições apropriadas para o crescimento celular. Exemplo disso é que os fortes ventos favorecem o aumento da área das feridas nas plantas causando maior incidência e severidade, assim como a umidade prolongada nas folhas aumenta a gravidade do cancro na laranja doce e um rápido desenvolvimento da lesão no limão tahiti (Ference et al., 2018; Graham et al., 2004).

O processo em geral de infecção nos tecidos do hospedeiro inicia pelo transporte das bactérias em gotas de chuva até a planta, onde a bactéria com ajuda do seu flagelo se movimenta até os estômatos ou as feridas no tecido. No interior da planta a bactéria fica aderida pelo pilus tipo IV, onde se multiplica localmente, colonizando o espaço intercelular ou os vasos do xilema para espalhar-se sistematicamente e ao mesmo tempo evade o sistema imune. Nos poucos dias após da infecção iniciam os sintomas de hipertrofia e hiperplasia dos tecidos vegetais, manifestando-se os sintomas aos sete dias se há condições ideais de temperatura, umidade e quantidade de inoculo bacteriano. As lesões locais nos tecidos jovens das folhas, caules e frutos verdes têm um aspecto de carcomidos, sendo que as lesões em folhas e frutos geralmente têm uma margem embebida em água, cercada por um halo clorótico enquanto as lesões em caules não têm ditos halos. Com o passar do tempo as lesões aumentam de diâmetro e têm uma cor marrom e com um crescimento exacerbado pode gerar desfolhação. Por isso, se fala que nos estágios iniciais da doença, a bactéria se alimenta do tecido do hospedeiro com um crescimento controlado, mas em estágios posteriores de infecção causam a morte das células vegetais por usar diferentes fatores de virulência que engloba desde estruturas de superfície bacteriana até proteínas secretadas (Bansal, Midha, Kumar, & Patil, 2017; Ference et al., 2018; Kraepiel & Barny, 2016).

O genoma de *Xanthomonas citri* pode ser dividido em três componentes, um cromossomo circular de 5175554 pb que codifica aproximadamente 4500 genes e dois plasmídeos, pXAC64 de 649201 pb e pXAC33 de 33699 pb. 7 % de todos os genes que possui a bactéria estão envolvidos na patogenicidade, virulência e adaptação ecológica, já que codificam enzimas que degradam a parede celular, proteases, receptores de ferro, proteínas do metabolismo energético, proteínas estruturais de flagelo, proteínas quimiotáticas, macrocomplexos como sistemas de secreção entre outras (Bansal et al., 2017; Ference et al., 2018). Diferentes estudos demonstraram a relevância nos processos infecciosos dos sistemas de secreção para translocar biomoléculas ao meio extracelular ou diretamente no citosol da célula hospedeira e assim gerar doenças, sendo que no caso de *Xanthomonas spp*, ela possui um amplo maquinaria de translocação contendo os sistemas de secreção Tipo I (T1SS), Tipo II (T2SS), Tipo III (T3SS), Tipo IV (T4SS), Tipo V (T5SS), Tipo VI (T6SS), o sistema Sec, o sistema TAT e o sistema de secreção de dois parceiros (TPS) (Bansal et al., 2017; Buttner & Bonas, 2010).

1.2 Sistemas de Secreção Bacterianos

As bactérias são microrganismos com uma alta capacidade de adaptação, a qual permite que elas possam colonizar qualquer ecossistema e por isso estão envolvidas em associações bióticas, associações mutualistas até patogênicas com amplo número de hospedeiros. As bactérias possuem diferentes máquinas macromoleculares que são conhecidas como sistemas de secreção que permitem transportar uma grande variedade de substratos como: pequenas moléculas, proteínas, ácidos nucléicos ou complexos de nucleoproteínas como resposta aos estímulos extracelulares para modular respostas que garantam a sobrevivência no meio ambiente. Dependendo do sistema de secreção, os substratos podem estar associados à membrana bacteriana externa, o espaço extracelular ou ser injetadas em outras células procariotas ou eucariotas (Costa et al., 2015; Tseng, Tyler, & Setubal, 2009).

Os sistemas de secreção são classificados de tipo I até VII devido às diferenças em sua origem evolutiva, localização, composição, função, assim como no reconhecimento de diversos substratos para a secreção. Tendo como parâmetro a localização dos sistemas, eles podem ser agrupados em dois grupos nas bactérias Gram negativas: aqueles que atravessam as duas membranas celulares e aqueles que estão só na membrana externa. Os sistemas de secreção que compõem o primeiro grupo são T1SS, T3SS, T4SS, T6SS, enquanto o segundo grupo conta com o T2SS, T5SS e T7SS (Buttner & Bonas, 2010; Costa et al., 2015; Rego, Chandran, & Waksman, 2010).

Os sistemas de secreção podem transportar os seus substratos em um só passo (independente de Sec) ou em dois passos (dependente de Sec). No mecanismo de dois passos o substrato é translocado ao espaço periplasmático pelos transportadores da membrana interna: o translocon SecYEG ou pelo sistema Tat, para que depois o substrato possa ser secretado ao espaço extracelular pelos T2SS, T5SS ou T7SS (Costa et al., 2015; Rego et al., 2010; Tseng et al., 2009).

A maquinaria do sistema Sec reconhece e rearranja a sequência hidrofóbica do N-terminal da proteína que vai ser secretada, para depois ela ser translocada em um estado desenovelado com a ajuda da hidrólise do ATP e um gradiente de prótons. No caso da secreção mediada por Tat, o N-terminal da proteína possui um motivo rico em resíduos básicos (SRRxFLK, onde x pode ser qualquer aminoácido), que sofre um rearranjo para interagir com um cofator e ser translocada em um estado enovelado só com a ajuda de um

gradiente de prótons (Tseng et al., 2009). Os sistemas T1SS, T3SS, T4SS e T6SS empregam só um passo de translocação (independentes de Sec), já que eles possuem uma proteína acoplada ao sistema que leva o substrato até o canal de secreção, o qual atravessa as duas membranas bacterianas, e por isso o substrato pode ser transportado desde o citoplasma até o espaço extracelular ou a célula alvo (Costa et al., 2015; Rego et al., 2010).

1.3 Sistema de Secreção Tipo IV (T4SS)

O sistema de secreção tipo IV (T4SS) é o sistema com maior distribuição na natureza e é relacionado principalmente com os processos de conjugação bacteriana e de secreção de efetores dentro de bactérias ou células eucarióticas alvo, encontrando-se descrito em bactérias Gram negativas, Gram positivas e arqueas. O protótipo mais conhecido de T4SSs é o de *Agrobacterium tumefaciens* codificado pelo plasmídeo Ti. O sistema está composto por 11 proteínas denominadas VirB1 até VirB11 provenientes do operon *virB* e a subunidade VirD4 do operon *virD*. No entanto, não todos os T4SS apresentam a mesma estrutura, composição e quantidade das proteínas homólogas ao sistema VirB/VirD, mas ainda assim são sistema completamente funcionais (Christie, Whitaker, & Gonzalez-Rivera, 2014; Rego et al., 2010; Trokter et al., 2014).

As proteínas do sistema VirB/VirD4 foram estudadas por diferentes ensaios bioquímicos e biofísicos que permitiram estabelecer três subgrupos estruturais estáveis. O primeiro subgrupo está composto por VirB2 e VirB5 constituindo o pilus. O segundo subgrupo corresponde ao canal de translocação dos substratos formado por VirB3, VirB6, VirB7, VirB8, VirB9 e VirB10, onde VirB6, VirB8 e uma porção de VirB10 são proteínas inseridas na membrana interna bacteriana enquanto VirB7, VirB9 e VirB10 formam o complexo da membrana externa. O último subgrupo é denominado o subconjunto energético porque agrupa as três ATPases citoplasmáticas do sistema: VirD4, VirB4 e VirB11 como ilustra a Figura 1 (Atmakuri, Cascales, & Christie, 2004; Burns, 1999; Rego et al., 2010; Trokter et al., 2014; Zechner, Lang, & Schildbach, 2012).

Estudando mais a fundo cada grupo, o pilus é um biopolímero tubular extracelular composto pela pilina VirB2 que tem como função ser um canal para o transporte de DNA durante o processo de conjugação. Na ponta do pilus está localizada VirB5 que permite o contato com a célula alvo, sugerindo uma função de adesão. Envolvida no processo de formação do pilus está VirB1, que é uma proteína periplasmática com um domínio transglicosilase que lisa o peptidoglicano da parede celular, provavelmente com a finalidade

de ajudar ao sistema a organizar-se no espaço periplasmático e dar saída ao pilus (Costa et al., 2015; Low et al., 2014; Rego et al., 2010; Trokter et al., 2014).

O complexo formado pelas proteínas VirB3 até VirB10 do plasmídeo conjugativo R388 de *E. coli* foi estudado por microscopia electrónica de contraste negativa para conhecer a estrutura do complexo, mostrando que pode ser dividido em um complexo de membrana externa e um complexo da membrana interna como representa a Figura 1 (Costa et al., 2015; Low et al., 2014; Trokter et al., 2014). O complexo da membrana externa é conhecido como o complexo central ou “core complex” e está composto pelas proteínas VirB7, VirB9 e VirB10 em uma proporção 1:1:1, aportando cada proteína 14 subunidades que formam uma camada externa e uma camada interna. Na estrutura da camada externa do T4SS do plasmídeo pKM101 de *E. coli* foi demonstrado por cristalografia de raios-X que o domínio C-terminal da VirB10 compõe a parede interna do complexo central e o poro na membrana externa bacteriana, enquanto a lipoproteína VirB7 e o domínio C-terminal de VirB9 envolvem a VirB10 formando a parede externa do complexo central (Figura 1). A camada interna do complexo está composta majoritariamente pelo N-terminal de VirB9 e uma porção do N-terminal de VirB10 (Christie et al., 2014; Costa et al., 2015; Low et al., 2014; Rego et al., 2010; Trokter et al., 2014).

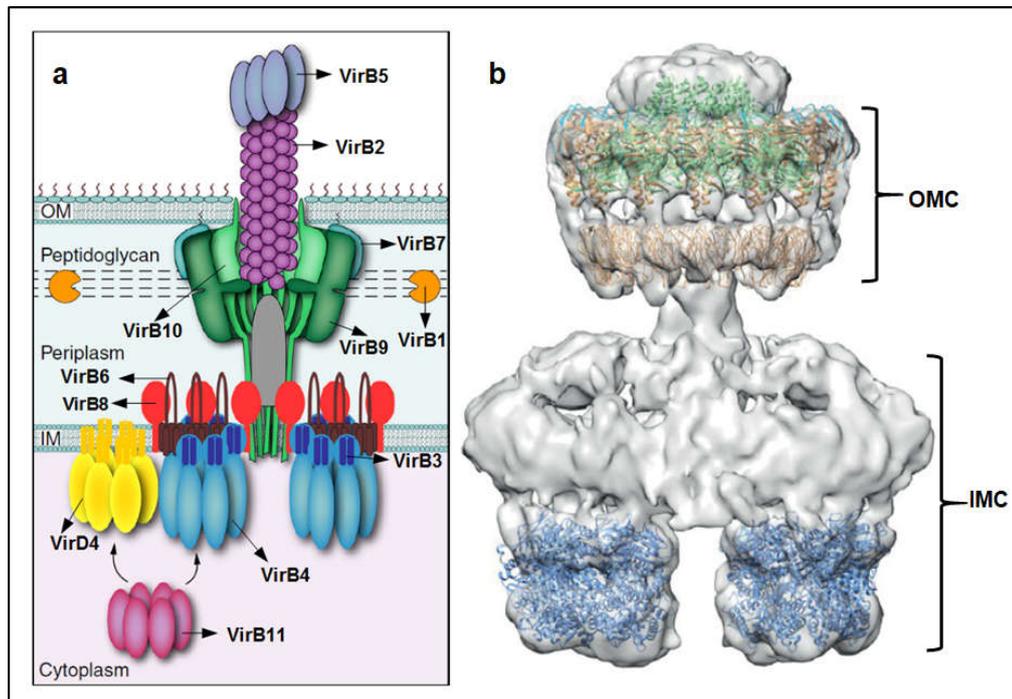


Figura 1. Representação da organização do sistema de secreção tipo IV (T4SS). a) Esquema de cada uma das subunidades que compõem o T4SS. b) Mapa de densidade eletrônica obtido por Cryo-EM do plasmídeo pKM101 mostrando o complexo de membrana externa (OMC) e o complexo de membrana interna (IMC). As imagens foram modificadas de (Trokter, Felisberto-Rodrigues, Christie, & Waksman, 2014).

VirB10 é o arcabouço do sistema de secreção graças a sua inserção tanto na membrana externa por um par de hélices no C-terminal (chamadas antenas), como na membrana interna bacteriana por uma hélice transmembrana no N-terminal. Esse arranjo entre as membranas pode facilitar a interação com as ATPases citoplasmáticas do complexo para favorecer a mobilização do substrato. As mudanças conformacionais de VirB10 ocasionadas pela translocação podem afetar diretamente a interação com o heterodímero VirB7-VirB9, já que VirB7 tem seu N-terminal ancorado covalentemente na membrana externa e o seu C-terminal está no espaço periplásmico, enquanto o domínio C-terminal de VirB9 (proteína principalmente periplasmática) estabiliza a interação com VirB10 e VirB2 que formam a parte distal do canal na membrana externa. O espaço entre as duas camadas do complexo central está ocupado pelo domínio C-terminal de VirB8, a pilina VirB2 e uma parte do domínio N-terminal de VirB9 (Christie et al., 2014; Rego et al., 2010; Trokter et al., 2014).

O complexo da membrana interna bacteriana está composto por VirB3, VirB4, VirB6, VirB8 e o N-terminal de VirB10. A ATPase VirB4 se organiza em dois barris (6 monômeros em cada um), localizados a cada lado do canal central, e que estão associados ao citoplasma por meio do seu domínio C-terminal que também é o domínio ATPase, enquanto o seu N-terminal está inserido parcial ou totalmente na membrana interna onde interage com VirB3 com uma estequiometria 1:1. Adicionalmente, o complexo da membrana interna é composto por 14 fragmentos do N-terminal de VirB10 contendo uma hélice transmembrana, 24 moléculas da proteína integral VirB6 (onde seu domínio N-terminal está na mesma região do domínio C-terminal da VirB4) e 12 moléculas de VirB8 constituídas por um pequeno domínio N-terminal citoplasmático, um domínio transmembrana e um domínio C-terminal periplasmático. É importante ressaltar que VirB8 serve como centro de nucleação para o ensemble do T4SS devido às suas interações com VirB4, VirB9, VirB10 e VirB11, além de promover a interação do complexo VirB2-VirB5 e ter um contato direto com o substrato durante sua translocação (Costa et al., 2015; Low et al., 2014; Rego et al., 2010; Trokter et al., 2014).

Um subconjunto do complexo associado à membrana interna é o subconjunto energético e está composto pelas três ATPases hexaméricas VirB4, VirB11 e VirD4, as quais têm a função de fornecer a energia indispensável para a translocação do substrato e a biogênese do pilus. A VirD4 foi inicialmente caracterizada por ser uma ATPase dependente do DNA por possuir os motivos canônicos de ligação ao nucleosídeos trifosfato Walker A e B, e usar a hidrólise do ATP para empurrar o DNA através do canal central (Atmakuri et al.,

2004; Burns, 1999; Ripoll-Rozada, Zunzunegui, de la Cruz, Arechaga, & Cabezon, 2013). A análise estrutural da proteína VirD4 indica que possui um domínio transmembrana (TM) no seu N-terminal associado à membrana interna. O domínio N-terminal também favorece a sua estabilidade e a oligomerização garante a seletividade pelo substrato, enquanto seu C-terminal citoplasmático seleciona as proteínas ou os complexos DNA-proteína que subsequentemente passarão através do canal por ficar na entrada e ter os domínios NBD (“nucleotide binding domain”) e o AAD (“all α -helical domain”) (Rego et al., 2010; Trokter et al., 2014; Zechner et al., 2012).

A ATPase VirB4 é uma proteína integral com uma alta variabilidade na quantidade dos domínios transmembrana entre seus homólogos. Ela tem os domínios Walker A e B associados com sua atividade catalítica e por estudos SAXS foi sugerido que podem ter diferentes estados oligoméricos. A possível função de VirB4 no processo de translocação está enfocada na coordenação das atividades de ligação e hidrólise de ATP das subunidades VirD4 e VirB11 (Christie et al., 2014; Trokter et al., 2014) .

No caso de VirB11, ela é uma ATPase de transporte pertencente à superfamília de proteínas de secreção AAA⁺, que inclui proteínas do sistema de secreção tipo II e proteínas envolvidas na montagem flagelar de arqueas. Todas elas são proteínas solúveis e periféricas da membrana que sugere uma possível associação dinâmica com o complexo da membrana interna. A conformação da proteína é um anel hexamérico onde o N-terminal interage com a membrana interna por estar localizado do lado citoplasmático e o C-terminal contém o domínio RecA que está envolvido na hidrólise de ATP. O linker que liga o C-terminal e o N-terminal é muito flexível e de comprimento variável (Christie et al., 2014; Ripoll-Rozada et al., 2013; Trokter et al., 2014).

A localização de VirB11 no complexo da membrana interna ainda não é conhecida, mas por ensaios de duplo híbrido e de co-imunoprecipitação foi identificado que a VirB11 codificada pelo plasmídeo R388 de *E. coli* interage com VirD4 e VirB4. Conjuntamente diferentes estudos identificaram que para a interação VirB11-VirB4 não é necessária a hidrólise do ATP, assim como também foi demonstrado que o comprimento do linker que possui os homólogos de VirB11 afeta a interação com VirB4, com a particularidade que ainda existindo a interação isso não é suficiente para promover a transferência do plasmídeo R388, enfatizando a importância da especificidade da interação para ter atividade biológica. Além disso, VirB11 assiste a VirB4 durante o processo de biogênese do pilus por promover a sua polimerização ao movimentar as subunidades de

pilina da membrana interna ao espaço periplasmático (Ripoll-Rozada et al., 2013; Trokter et al., 2014).

Devido às duas interações de VirB11 com as outras duas ATPases (VirB4 e VirD4) nos processos de biogênese do pilus e na secreção do substrato, há a hipótese de que VirB11 pode atuar como um switch molecular entre os dois eventos que está envolvido o T4SS. Dita hipótese é fundamentada pelo fato que o domínio C-terminal do homólogo de VirB4 em *Thermoanaerobacter pseudethanolicus* estudado por cristalografia de raios-X mostra uma semelhança estrutural muito alta com o domínio C-terminal de TrwB, que é o homólogo VirD4 do plasmídeo R388, apesar que entre as duas proteínas as sequências têm uma baixa identidade o que dá maior validade que VirB11 talvez seja um modulador da função do T4SS (Low et al., 2014; Ripoll-Rozada et al., 2013).

1.3.1 Funções dos Sistemas de Secreção Tipo IV (T4SSs)

O sistema de secreção tipo IV (T4SS) foi descrito em diversos estudos por participar em diferentes processos que envolvem transferência de substratos como conjugação bacteriana, competência (liberação e captação de DNA exógeno), transporte de proteínas ou complexos de nucleoproteínas e a liberação de toxinas proteicas, já seja dentro de outras bactérias, células eucarióticas ou no espaço extracelular (Bi et al., 2013; Cambronne & Roy, 2006; Ding, Atmakuri, & Christie, 2003; Souza et al., 2015).

Os substratos translocados pelo T4SS podem possuir duas características comuns para o reconhecimento. A primeira característica é ter uma sequência sinal contendo regiões com cargas positivas ou grupos de resíduos hidrofóbicos que estão localizados no seu C-terminal que em geral se encontra desestruturado. A segunda característica está relacionada com ter um ou mais sinais internos de translocação além do C-terminal para o reconhecimento e interação com possíveis fatores acessórios ou chaperonas que facilitam a regulação do processo de transferência (Christie et al., 2014)

Os T4SS podem ser classificados em quatro grupos dependendo da finalidade com que é transportado o substrato. O primeiro dos grupos promove a transferência de plasmídeos e sequências de fagos (DNA de cadeia simples) de uma bactéria à outra por conjugação, favorecendo assim o intercâmbio de características adaptativas para ajustar-se às mudanças do ambiente, sendo o exemplo mais conhecido a transferência de genes que contém a resistência aos antibióticos entre diferentes grupos de bactérias. No caso da

transferência do DNA de bactérias a células eucarióticas, o mecanismo do qual se tem o maior conhecimento é do sistema VirB/VirD4 de *Agrobacterium tumefaciens* por transportar DNA oncogênico e várias proteínas efetoras para células das plantas com a finalidade de gerar doença (Backert & Meyer, 2006; Burns, 1999; Christie & Cascales, 2005; Costa et al., 2015).

Por ensaios de crosslinking com formaldeído e de imunoprecipitação foi possível identificar as subunidades do T4SS que participam por contatos diretos na movimentação do DNA e a ordem em que acontece o processo de translocação. As subunidades reconhecidas foram: VirD4, VirB11, VirB6, VirB8, VirB2 e VirB9, enquanto os outros componentes do sistema: VirB3, VirB4, VirB5, VirB7 e VirB10 favorecem a transferência do substrato pela regulação de cada passo consecutivo onde intervêm as proteínas que têm contato direto (Christie et al., 2014). A etapa inicial de reconhecimento do DNA é feita por VirD4 sem precisar a hidrólise do ATP, para depois passar o substrato a VirB11 onde o aporte energético (hidrólise de ATP) favorece as mudanças conformacionais para dissociar fatores acessórios vinculados ao substrato e a sua transferência à seguinte subunidade, ao mesmo tempo que VirB7 promove a formação do complexo central (Christie et al., 2014; Trokter et al., 2014). O substrato é transferido dos componentes da membrana interna VirB6/VirB8 através do C-terminal de VirB8 aos componentes da membrana externa como são o domínio N-terminal de VirB9 e a pilina VirB2, todo promovido pela hidrólise de ATP feita por VirB4. VirB10 não entra em contato com o substrato mas atua como um interruptor conformacional por abranger as duas membranas já que é sensível à ligação e hidrólise do ATP feita pelas ATPases citoplasmáticas VirD4 e VirB11 para regular a transferência do substrato (Christie et al., 2014; Rego et al., 2010; Trokter et al., 2014; Zechner et al., 2012).

O segundo grupo de T4SS transfere vários efetores ao mesmo tempo com diferentes alvos no hospedeiro com a finalidade de melhorar a colonização bacteriana promovendo a sobrevivência dentro das células receptoras já que modula a interação bactéria-hospedeiro (células eucarióticas). Exemplos deste grupo são encontrados nas bactérias Gram negativas *Helicobacter pylori* com o sistema *cag*, *Legionella pneumophila* com o sistema Dot/Icm, *Bartonella* spp e *Brucella* spp (Brunings & Gabriel, 2003; Buttner & Bonas, 2010; Ding et al., 2003; Trokter et al., 2014; Zechner et al., 2012).

O terceiro grupo é diferenciado principalmente por sua capacidade de secretar ou adquirir biomoléculas do ambiente independentemente do contato com outras células, e está representado por três sistemas conhecidos: o sistema Ptl de *Bordetella pertussis* que

secreta a toxina Pertussis no meio extracelular; o sistema de *Neisseria gonorrhoeae* que secreta DNA no meio extracelular, e finalmente o T4SS de *Helicobacter pylori* que transfere o DNA do meio ambiente para o interior da bactéria (Burns, 1999; Trokter et al., 2014; Zechner et al., 2012).

1.3.2 Nova função do T4SS em *Xanthomonas spp*

XAC0466 (488)	HPDHA -----LHNAI RSKLP-----SMISNETAAHVTL-QAKQN-----
XAC3266 (735)	HPDHS -----TYQQIHSWVR-----GTGNWNVESKNVTASLYKQQTEDP-----
XAC2609 (315)	HPDNA -----MYNGRVS KLEALGERGGFANRKELEQRAAGQIVF-ESKVS-----
XAC0096 (506)	HPDHR -----MLEQIRSGV R KIDESV GKPYDDMSRRVSRSLLA-VCKDNRRYPAAGDRSLADN
XAC1918 (477)	LSQDP -----LHSQAEDAVRRLEQGLGREYDDNSARLAASSAY-LAKEN-----
XAC0574 (317)	HVGNG -----LFDQAQRGVHQAQDARAGRTFDQHSQSLSGSLAS-EMHAA-----
XAC3634 (189)	NPDHP -----LFNQALNKLEQLGPN-APANRQQLVNAAGHMTF-GAKVS-----
XAC0151 (120)	HPDHA -----MHQQIRS KVEQLDAANGRTFDATSERMTASLLT-LAKDN-----
XAC1165 (1)	-----MGRASDAHSERMSASLAK-LAKEH-----
XAC0323 (191)	GPDHPEHPDHYLFAQIREAVGVLD AELGKPVDEASERMAARLLP-LAKOH-----
XAC2885 (271)	ARGNALQPGSOLFNDAVVKLDGORDRLGLRDDTAFLNTAASVAA-RAGND-----
XAC4264 (165)	PPRAEHPNNELEKIRSGVRGLDQQAGKSWDESSDRLSASLLL-MATEK-----
Cons.	HPDH L Q V G D S ASL K
	6876 7 6 7 * 8 9 887 8
XAC0466	GIDSADKLQNV T-----VQDGKAFVMGTT--PG--PRAAVDLNQPAPT-LEQTEAQL-LAGQS
XAC3266	LLQRVDKVI T-----GSLGKDGAEVFAVYAPFGDKGPPFHAHVDGREASQEP AQQNLOQAEBVIKQD
XAC2609	GLQRIDHVV PNK-----SDDGF FAVQGE L T D P A -MORVVFVDRNQAONQFLENSRQAAREESQR
XAC0096	ALSRVDHVV M3K-----TGNMFAVEGR L D D P A -HRRVHVE IDQAIRTPVEQSDOKLLAANQA
XAC1918	GLSRIDHVV LSE-----NTKSVRQGENV F V V E G A L N D P A -HKMAHMKTSDAIACPFVEQSLAQLOALGET
XAC0574	GRRRIDAV VMMS P-----DAARTFAVQGRVDDPA-QLRVSVDTMTAMNTPLEQSSQRVAENAR
XAC3634	GNQRIDV VQSK-----DGNGLFAVQGGPTDPA-HQRITYTEKATAAERPLEQSSNAVRQDAQT
XAC0151	GLTRVDH VLLSE-----KTRDSPAAQT L F V V Q G D P K D P A -MLRAHMTADAAQRVQESSTQLESVNR
XAC1165	GLERIDH VMLSN-----QTPRAAAATV F V V Q G E P S N P A -HLRASMPTDVAVITPVEQSLAKLQELDAR
XAC0323	GPDQVDY VVLSRHLGE-----VGENVFLVRGELSDPA-HLRAHITQEAAMETSVDASLAQLDEINRR
XAC2885	GLQRIDH LVPNRD-----GDSLIAVQGRMDDPA-HLRSHVOTASAANEP AQTNVSQLQOHNQ
XAC4264	GPTARDDLK PAFNTPTEKLAGGBILHMWRGCHSEDFAAH-RAHMTQEAALAVPADQRLAQMEVMQOT
Cons.	GL RIDHV S FAVQG DPA H RAHV T A P EQS QL Q
	*7 96*69 6 *+6*59 *** 7 *776 7 * + 788 87 8
XAC0466	-QQQQAQQRQ QKVANGGR (24)
XAC3266	-QTRQQALRE TQQCTARQDQARPSRSL (28)
XAC2609	-QAIQVQT QESASRSMSM (29)
XAC0096	-IAQERALT QQQEVARGMNEPNQGSLSR (38)
XAC1918	-QRQQQSQ QREQLIAPQHRMV (39)
XAC0574	-QSAVLE QQQSQTQQQQGARALG (34)
XAC3634	-QTQVQD QHEQORSQTSVVG (32)
XAC0151	-LAQERTQ DLAVECORSQCOHRGPVPSR (40)
XAC1165	TLAQAO SLAQERSMAQGEAVKPRSIG (33)
XAC0323	-LMLRL PRR (31)
XAC2885	-HTQQP QQQQEQRRVIQQ (31)
XAC4264	-KAQEIM QAQQQETINQTSQARSM (28)
Cons.	Q Q Q Q Q (45)
	6 8 7 7 6

Figura 2. Alinhamento do domínio conservado XVIPCD das proteínas identificadas por ensaios de duplo híbrido que interagem com VirD4. Os resíduos em negrito foram encontrados em seis dos doze XVIPCDs, e por isso são indicados com Cons na parte final do alinhamento. Os números na parte inferior do alinhamento indicam o número total de XVIPCDs que apresentam o resíduo conservado nessa posição. (*) indica os resíduos altamente conservados em 10 ou mais XVIPCDs. Tomado de (Alegria et al., 2005).

Uma nova função de T4SS foi descrita por nosso grupo no fitopatógeno *Xanthomonas citri*, a qual se caracteriza por injetar toxinas (efetores) dentro de outras bactérias. A descrição desta nova função teve seu início com o estudo desenvolvido por (Alegria et al., 2005), onde identificaram por ensaios de duplo híbrido doze proteínas de função desconhecida e de diferentes tamanhos que interagem com VirD4, sendo que, naquele tempo, as únicas bactérias Gram negativas conhecidas que codificam estas proteínas eram *X. axonopodis* pv. *citri* (14 genes) e *X. campestris* pv. *campestris* (16 genes), e portanto receberam o nome XVIPs (Xanthomonas VirD4 interacting proteins). Todas elas têm um domínio conservado C-terminal de aproximadamente 120 aminoácidos

denominado XVIPCDs (XVIP conserved domains), dos quais há um conjunto de 49 resíduos que são altamente conservados, e geram blocos de sequências da forma GLxRIDHV FAVQ GxxDPAHxRAHV, onde x pode ser qualquer resíduo de aminoácido. Adicionalmente possuem uma cauda rica em glutamina e a presença de uma arginina próxima à extremidade C-terminal, como ilustra a Figura 2 (Alegria et al., 2005).

Novos estudos que foram continuados por (Souza et al., 2015), permitiram caracterizar a atividade biológica das proteínas Xac2609 e Xac0466 pertencentes ao grupo de proteínas identificadas nos ensaios de duplo híbrido. A primeira proteína possui em sua sequência um domínio de ligação ao peptidoglicano e uma similaridade com a região catalítica da família 19 das glicohidrolase que se caracteriza por ter uma atividade β -glicosidase similar à lisozima. A segunda proteína, Xac0466, tem uma arquitetura similar a Xac2609 com um domínio adicional amidase, cujo alvo poderia ser as ligações peptídicas no peptidoglicano. Nas duas proteínas foi comprovado que podem degradar o peptidoglicano da parede celular da bactéria Gram positiva *Micrococcus luteus* assim como reduzir a densidade ótica nas culturas de *Bacillus subtilis* (Souza et al., 2015). Adicionalmente a proteína periplasmática Xac2610 tem a capacidade de inibir a atividade catalítica de Xac2609 (porém não de Xac0466 ou da lisozima de ovo) indicando que as duas proteínas Xac2609-Xac2610 são um par efetor-inibidor. Além disso, foi demonstrado que a secreção de Xac2609 precisa das seguintes condições: i) o T4SS funcional, ii) conter a sequência XVIPCD e iii) o contato entre células de *Xanthomonas citri* e *E. coli* (Souza et al., 2015).

Partindo da evidência da existência do par efetor/inibidor Xac2609/Xac2610 foi feito uma análise de bioinformática empregando o domínio XVIPCD como critério de seleção, que permitiu identificar (na data do estudo) aproximadamente 500 possíveis efetores (agora denominados X-Tfes: Xanthomonadaceae Type IV secretion system effectors) pertencentes à família Xanthomonadaceae. Nos possíveis efetores foram identificados domínios conservados do tipo: transglicosilase líticas, toxina zeta (inibidor da biossíntese do peptidoglicano), peptidases, domínio de ligação ou modificação do peptidoglicano, amidases associadas ao peptidoglicano, família de glicohidrolases, lipases e domínio AHH (com possível atividade nuclease) que têm como alvo os componentes celulares bacterianos (Souza et al., 2015). De igual forma a análise bioinformática permitiu identificar os potenciais genes dos inibidores (X-Tfis) por estar localizados no genoma *upstream* e contínuos aos genes dos efetores, indicando que o sistema efetor/inibidor quase sempre está organizado em operons. Adicionalmente a análise da sequência peptídica dos inibidores não detectou nenhum domínio conservado conhecido, porém ao analisar a sequência no programa

DOLOP (Babu et al., 2006), eles interessantemente apresentam um motivo conhecido como “lipobox” que faz parte do peptídeo sinal presente em lipoproteínas ancoradas na membrana como estão representados na Figura 3. Estas observações indicam que os inibidores estão possivelmente inseridos na membrana e assim podem garantir a sua função de proteção frente aos efetores (Souza et al., 2015; Yerushalmi, Zusman, & Segal, 2005).

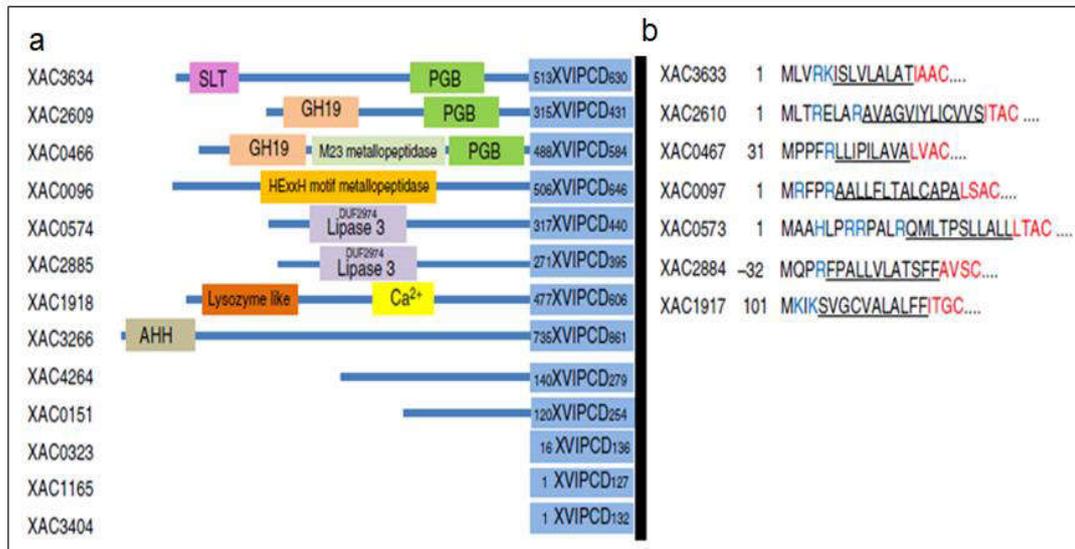


Figura 3. Representação dos domínios identificados como efetores (X-Tfe) e do peptídeo sinal em seus inibidores (X-Tfi) de *Xanthomonas citri*. a) Os domínios identificados por análise de bioinformática dos efetores foram: PGB (domínio de ligação ao peptidoglicano), GH19 (família 19 glicohidrolase), SLT (transglicosilase lítica solúvel), Ca²⁺ (domínio de ligação ao cálcio), AHH (domínio nuclease). Em azul o domínio XVIPCD. b) Sequência dos inibidores ressaltando em vermelho o lipobox do peptídeo sinal (Souza et al., 2015).

Em síntese, nosso grupo demonstrou que algumas das proteínas com os domínios XVIPCDs são secretadas pelo T4SS de *Xanthomonas citri* e são efetores (X-Tfes) com a capacidade de matar outras bactérias, conferindo provavelmente uma vantagem em comunidades bacterianas mistas no solo ou na superfície da planta. Na maioria dos casos, os efetores possuem atividade enzimática potencialmente tóxica para a bactéria que os produzem, portanto, ela precisa de proteínas de imunidade (denominadas X-Tfis) para sua própria proteção dos efeitos tóxicos (Souza et al., 2015).

1.3.3 Os efetores (X-Tfes) putativos Xac1918 e Xac0574 e seus inibidores (X-Tfis) Xac1917 e Xac0573

Entre as proteínas efetoras propostas pelo estudo de (Souza et al., 2015) se encontram os dois efetores Xac1918 e Xac0574, assim como os possíveis inibidores de cada efetor, Xac1917 e Xac0573 respectivamente. A análise de domínios conservados da

sequência dos inibidores não apresentou nenhum domínio conservado, só foi possível identificar a sequência sinal contendo o lipobox característico das lipoproteínas como mostra a Figura 4, o qual além de permitir a sua identificação como lipoproteína indica a sua localização na membrana.

<u>Xac1917</u>	
1 MDYEE SGDEE VPFHRGVDCVRAQASRAWDDSRSDASWVSRRERSMCGARTTAAGP	56
57 RAQAPVVAGRGKPKQAKAAGGRPE SGQGAPE VVNDVIHTQGVF MKIKSVGCVLALFF	115
116 <u>ITGCT</u> VVVSAGADMRA PS GASLCEE SRGWE GAGSTQAIQVNPQVSE DDSGRSYRFDLGG	173
174 RGGLKRLGASCGWGSYAECSFEAVRSDGASYRFSE MSTFGLWETKE GLYL VYRIVAPKE	232
233 KAAEAKRRVVRVGNPPAEICNQIGDYSNLM	262
<u>Xac0573</u>	
1 MAAHLPRR PALRQMLTPSLLALLLTACH SPETSMTQTHSSATEATAAADVQAGGRG	56
57 LARLNPSPRKAYEVTLTLDKAPGAFGLVEAAAQYDVSNEQECGRIQPE TGTAGRITSQ	114
115 ETVALKKISETEYRG TLYLDLMQDEDDYGRGVCHWEFSGASVLLKATGAE EETRFLS	171
172 FIEAKTVTAQQALTKYYWKDGYPRSESKSFPDTGELSPE TFKPEIRDNLFTITLAAKE	229
230 VAS	232

Figura 4. Sequência das proteínas Xac1917 e Xac0573 anotadas no genoma de *X. citri*, ressaltando o peptídeo sinal característico das lipoproteínas. Para Xac1917 em azul claro está a sequência sinal desde o resíduo 101 até 119 e em sublinhado o lipobox (resíduo 116 até 119). Para Xac0573 em azul escuro está a sequência sinal desde o resíduo 1 até 27 e em sublinhado o lipobox (resíduo 24 até 27).

Todas as lipoproteínas são traduzidas no citoplasma como prolipoproteínas (precursor) e geralmente atravessam a membrana citoplasmática como proteínas desenoveladas pela via Secretora geral (Sec) com ajuda de YidC ou podem ser translocadas na sua forma enovelada pela via de translocação Tat, devido que possuem no N-terminal às sinais de reconhecimento pelas vias de translocação, onde a região é intrinsecamente desordenada e com uma alta flexibilidade para o posicionamento da lipoproteína no envelope bacteriano enquanto a porção final da proteína se enovela especificamente para a função que vai desenvolver (Narita & Tokuda, 2017; Zuckert, 2014)

A sequência sinal das lipoproteínas pode ser identificada dentro dos primeiros 40 resíduos do N-terminal da prolipoproteína e pode ser subdividida em três regiões segundo a característica química dos resíduos envolvidos. A primeira região é chamada de **n** e está composta de cinco a sete resíduos, nos quais pelo menos dois resíduos estão carregados

positivamente (lisina ou arginina) e são importantes para a interação com o fosfolípido da membrana. A região seguinte é **h**, e contém de 7 a 22 resíduos, sendo a média 12 resíduos predominantemente hidrofóbicos que ancoram na membrana. Por último, a região **c** que é chamada de lipobox, e está composta por quatro aminoácidos pequenos sem carga ao redor do sítio de corte que é altamente conservado para a biossíntese da lipoproteína (Babu et al., 2006; Bagos, Tslrigos, Liakopoulos, & Hamodrakas, 2008; Juncker et al., 2003)

As análises de sequências de diversas prolipoproteínas permitiram gerar a sequência consenso [LVI] na posição -3 do sítio de corte, [ASTVI] na posição -2, [GAS] na posição -1 e C com uma frequência de 100% ocupando a posição +1. Todos os parêntesis representam uma posição no lipobox e os resíduos que podem ser encontrados em dita posição organizados de esquerda à direita de maior a menor frequência. A cisteína é o resíduo do lipobox que é covalentemente modificada pela adição de lipídios nas prolipoproteínas para serem inseridas na membrana, tanto em bactérias Gram negativas como em Gram positivas, e no caso que a sequência careça da cisteína a proteína não é processada para se ancorar na membrana. Portanto, a sequência no lipobox está distribuída de tal forma que os três primeiros resíduos fazem parte do C-terminal do peptídeo sinal e a cisteína está localizada no N-terminal da lipoproteína madura que é modificada com o diacilglicerol e uma cadeia de ácido graxo para ficar na membrana (Babu et al., 2006; Bagos et al., 2008; Juncker et al., 2003; Narita & Tokuda, 2017)

O processo de adição lipídica na lipoproteína precisa de três proteínas integrais de membrana para gerar a lipoproteína madura (Figura 5). A primeira enzima do processo é a prolipoproteína diacilgliceril transferase (Lgt) e é quem compromete o substrato na via. A proteína possui cinco hélices transmembrana e seu C-terminal está localizado no citoplasma. Ela catalisa a transferência covalente do grupo *sn*-1,2-diacilgliceril proveniente do fosfatidilglicerol no grupo tiol da cisteína conservada (+1) por uma ligação tioéter (Babu et al., 2006; Bagos et al., 2008; Juncker et al., 2003; Noland et al., 2017; Storf et al., 2010; Zuckert, 2014).

A prolipoproteína modificada no *s*-diacilgliceril é reconhecida pela lipoproteína peptidase sinal (LspA), quem corta o peptídeo sinal hidrofóbico (região **h**) liberando o grupo α -amino da *s*-diacilgliceril cisteína para originar a apolipoproteína (diacilgliceril prolipoproteína). O sítio de corte é identificado porque o diacilgliceril permite posicionar o sítio ativo de LspA no local de clivagem e ao mesmo tempo LspA identifica os primeiros três resíduos do lipobox. Finalmente a apolipoproteína N-aciltransferase (Lnt) adiciona uma

cadeia *sn*-1-acil (geralmente proveniente da fosfatiletanolamina) no grupo α -amino da cisteína livre para assim obter a lipoproteína triacilada ou madura (Bagos et al., 2008; Juncker et al., 2003; Narita & Tokuda, 2017; Noland et al., 2017).

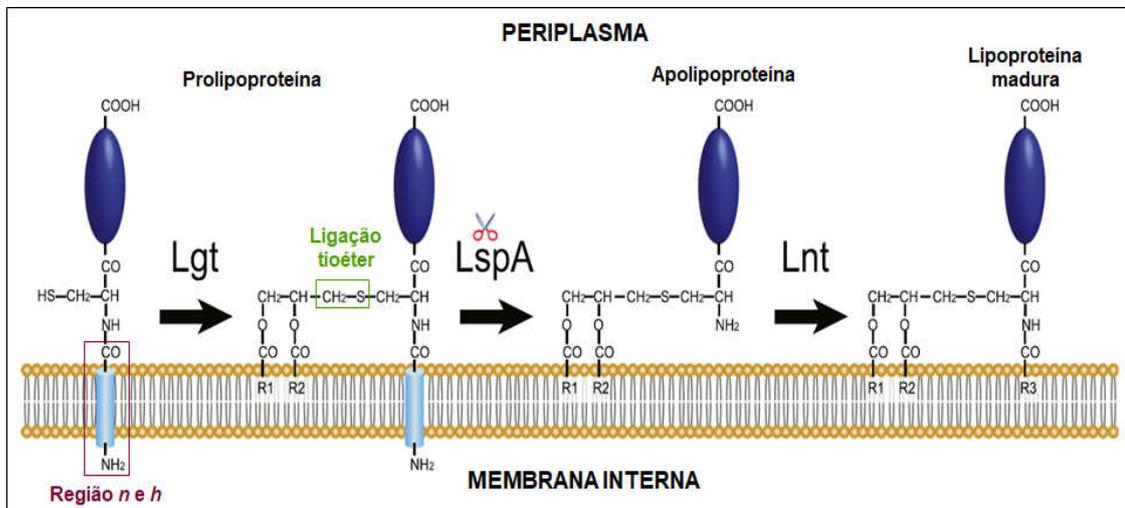


Figura 5. Representação do processo geral de biossíntese das lipoproteínas. Lgt: prolipoproteína diacilgliceril transferase. LspA: Peptidase sinal específica de lipoproteína Lnt: Apolipoproteína N-aciltransferase. Em roxo, a região n e h ancorada na membrana interna. Em verde ligação tioéster na cisteína do lipobox. Modificado de (Narita & Tokuda, 2017).

O direcionamento da lipoproteína entre a membrana interna ou externa da bactéria está determinado pelo resíduo que ocupa a posição +2 logo depois da cisteína. Se a posição é ocupada por um aspartato a localização da lipoproteína é na membrana interna, enquanto outros aminoácidos em essa posição são associados com a membrana externa. Um estudo sistemático também mostrou que Phe, Trp, Tyr, Gly e Pro na posição +2 poderiam servir como sinais de retenção na membrana interna se o resíduo na posição +3 é um Asn, atuando dita sinal na ausência do aspartato na posição +2 (Bagos et al., 2008; Juncker et al., 2003; Narita & Tokuda, 2017; Noland et al., 2017; Zuckert, 2014). O sinal de retenção na membrana interna é por conta da complementação estérica e eletrostática entre o Asp na posição +2 e os fosfolipídios, já que a interação não permite a transferência da lipoproteína por formar um complexo robusto. A interação entre o Asp da posição +2 e a fosfatidiletanolamina é fortalecida pelas ligações de hidrogênio formadas entre a cys da posição +1 e os resíduos da posição +3 que forma pontes salinas ou ligações de hidrogênio, cada um com a fosfatidiletanolamina, portanto, a posição +2 do aspartato não é suficiente para reter uma proteína na membrana interna, por isso a sinal ganha força com ajuda do resíduo na posição +3, sendo os resíduos mais identificados Asp, Glu, Gln ou Asn. Embora, se a posição +3 contém os resíduos His, Lys, Cys, Ile, Ala ou Thr decresce

consideravelmente a força do sinal no Asp +2 para manter a proteína na membrana interna (Tokuda & Matsuyama, 2004).

Uma vez identificada a localização da lipoproteína madura (altamente hidrofóbica), o transporte desde a membrana interna para a membrana externa através do periplasma hidrofílico é feito pelo sistema Lol, que está composto por um complexo de membrana interna, uma proteína transportadora periplasmática (LolA) e uma proteína receptora na membrana externa (LolB). O complexo da membrana interna é denominado LolCDE e está composto pelas subunidades LolC, LolD e LolE em uma proporção 1:2:1, sendo que os genes que codificam as proteínas formam um operon. LolC e LolE são proteínas integrais de membrana com quatro hélices transmembrana e um grande loop periplasmático, enquanto LolD é a subunidade que liga os nucleotídeos por ter os motivos de ligação Walker A e B. A interação entre a lipoproteína e o complexo depende principalmente da triacilação das lipoproteínas por Lnt (Narita & Tokuda, 2017; Tokuda & Matsuyama, 2004; Zuckert, 2014).

O mecanismo do transporte através do periplasma inicia com a ligação da subunidade LolE à lipoproteína de membrana externa que vai ser transportada, gerando uma mudança estrutural alostérica que aumenta a afinidade pelo ATP na subunidade LolD ao mesmo tempo que LolC interage com uma molécula de LolA vazia. No segundo passo do processo, a ligação ao ATP por LolD diminui a interação hidrofóbica de LolE com a lipoproteína, e no passo final a hidrólise do ATP dirige a transferência da lipoproteína para LolA com ajuda de LolC, dando a liberação do complexo LolA-lipoproteína, fosfato inorgânico e ADP no periplasma, onde o complexo pode interagir com LolB que está ancorada na parte interna da membrana externa. A transferência da lipoproteína entre LolA e LolB acontece por uma diferença de afinidades entre as cavidade hidrofóbicas das duas proteínas e a lipoproteína, voltando assim o complexo LolCDE e LolA às condições iniciais para um novo ciclo catalítico (Narita & Tokuda, 2017; Zuckert, 2014).

No caso dos efetores, Xac1918 está composta por 606 aminoácidos, onde a partir do aminoácido 477 até 606 corresponde ao o domínio XVIPCD. Ao analisar a sequência da proteína por Pfam (Finn et al., 2016) foram identificados dois domínios conservados, um deles é um domínio da superfamília da lisozima entre os resíduos 91 até 181. Esta superfamília tem como característica comum a hidrólise de ligações glicosídica β 1-4 em polissacáridos, sendo os membros mais conhecidos de possuem esse domínio: transglicosilase lítica solúvel (SLT), GEWL (“Goose Egg White Lysozyme”), HEWL (“Hen Egg White Lysozyme”), chitinases, lisozima do bacteriófago Lambda, endolisinas, autolisinas

e chitosanases (Marchler-Bauer et al., 2015; Souza et al., 2015) (Figura 6).

Xac1918		
1	MPINYRELTQEQYNALTGDLVKLTESLHARSQDVG DGRATIGYGYTFNRSNNAAIW	56
57	AESGIELSDAQRRLSRIDAAAPGDRTRLGLQF DRTL [*] NAAEGDQLLAASMPEYERPI [*]	113
114	NALNMPMSQERAALVSLVYNRGAGSYNANMQSFRDAVVAGDRSEAWFEMRYNA	166
167	WGSNAAAEAGLRKRRV LESELFGLYSDPNNVTSDEALSTYQMYQQHREIRINRDEA	221
222	RWGVDIDGNPGQRNLIAEANRDYATLLEGRGNVQTLAQSLDPARLRLLSDLREQHP	277
278	EIADRLSNEAFNAGSIHVDAGRDSARVAVDADHAATIDATRRRNGAEVSS NDLLLG	333
334	GGGNDTLIGGQGN DVLIGGPGHDVLRGGAGNDI YVNDGDVVQDADRNGQIFWDG	388
389	RQLTGGTRQGDPEPEGVFRSADGQTTYRIQGADLLIGNERGQSVTVQDFQSGSLGIEL	445
446	GQAHVQREHGASQTEQGAVKISESGRYQLAS LSQDPLHSQAEDAVRRLEQGLGRE	500
501	YDDNSARLAASSAYLAKENGLSRIDHVLS ENTKSVRQGENVFFVEGALNDPAHK	555
556	MAHMKTSDAIAQPVEQSLAQLQALGETQRQQSQQQEQQREQLIAPQHRMV	606

Figura 6. Sequência da proteína Xac1918 anotada no genoma de *X. citri*, ressaltando os domínios identificados. Em laranja está o domínio "lysozyme like" (desde o resíduo 91 até 181). * Os resíduos Asp99 (D) e Glu110 (E) como possíveis resíduos catalíticos. Em vermelho o domínio RTX de ligação ao Ca^{2+} (desde o resíduo 328 até 366), que está composto por quatro repetições sobrepostas. Em verde o XVIPCD (desde o resíduo 477 até 606).

A lisozima de ovo tem a capacidade de hidrolisar a ligação glicosídica $\beta(1-4)$ entre o ácido N-acetilmurâmico (NAM) e o N-acetilglucosamina (NAG) no peptidoglicano da parede celular bacteriana. As lisozimas agem por um mecanismo de catálise ácida em que dois resíduos participam de uma única reação de deslocamento ou de duplo deslocamento no átomo de carbono anomérico do glicosídeo hidrolisado (Davies & Henrissat, 1995). Os resíduos da lisozima envolvidos na catálise são o glutamato 35 (Glu35) e o aspartato 52 (Asp52, numeração da lisozima de ovo de galinha) estão dispostos em cada lado da ligação glicosídica que vai ser clivada. No mecanismo proposto por Phillips (Blake et al., 1967) a enzima se liga ao polissacarídeo pela fenda na sua estrutura, na qual são inseridos seis monossacarídeos do peptidoglicano. A unidade D de NAM tem uma conformação distorcida que gera uma torção na ligação glicosídica com o seguinte monossacarídeo de NAG, o que favorece que o Glu35 catalítico caracterizado por um ambiente apolar transfira um próton para o oxigênio 1 da ligação glicosídica em um processo de catálise ácida. O intermediário que é o íon oxônio (carbocátion) no carbono 1 é estabilizado por ressonância por compartilhar a sua carga com o oxigênio do anel e também pela presença próxima do carboxilato do Asp52 (catálise eletrostática) que está em forma iônica por conta do ambiente

polar (Blake et al., 1967; Lin & Koshland, 1969). No mecanismo alternativo proposto por Koshland (Davies & Henrissat, 1995), o carboxilato do Asp52 ataca nucleofilicamente o carbono 1 (deficiente em elétrons) para formar um intermediário covalente glicosil-enzima (catálise covalente). Na segunda etapa em ambos mecanismos, uma molécula de água previamente ativada pelo Glu35 (catálise general básica) ataca o carbono 1, quebrando a sua ligação com o Asp52, restabelecendo o aspartato carregado e completando assim o ciclo catalítico (Figura 7) (Davies & Henrissat, 1995; Vocadlo et al., 2001).

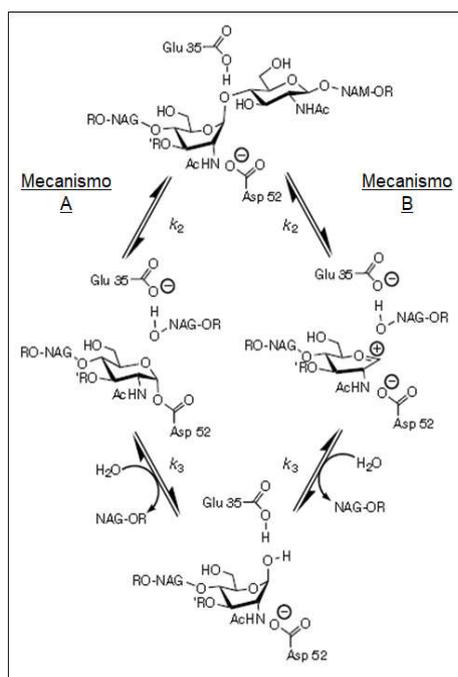


Figura 7. Representação dos dois possíveis mecanismos catalíticos da lisozima. O Mecanismo A corresponde ao mecanismo proposto por Koshland e o Mecanismo B é o mecanismo proposto por Phillips. Modificado de (Vocadlo, Davies, Laine, & Withers, 2001).

O segundo domínio de Xac1918 identificado entre os aminoácidos 328 até 366 é um conjunto de motivos de ligação ao cálcio encontrado em hemolisinas e leucotoxinas. As proteínas que contêm esse motivo pertencem à família RTX (“Repeats in toxin”), que são exoproteínas que incluem toxinas citolíticas, metaloproteases e lipases, compartilhando uma organização genética comum apesar de que foram descritas em várias espécies de bactérias Gram negativas (Lally, Hill, Kieba, & Korostoff, 1999).

O operon da toxina RTX genérico consiste em quatro genes que são designados *rtxC*, A, B e D em ordem de transcrição. A toxina RTXA (produto do gene *rtxA*) requer uma ativação pós-tradução por acilação com ácidos graxos para ser biologicamente ativa que é feita pelo produto do gene *rtxC* que é a proteína C ativador específico, e uma proteína

transportadora de grupos acil. O transporte da toxina RTX A é através do sistema de secreção tipo I e requer das proteínas RTX B e RTX D (codificadas pelos genes *rtxB* e *D*), sendo a primeira pertencente da superfamília das proteínas de transporte com ligação ao ATP e a segunda é classificada na família de proteínas envolvidas na fusão de membrana (Lally et al., 1999; Linhartova et al., 2010; Michiels, Xi, Verhaert, & Vanderleyden, 2002).

As proteínas RTX A contém na metade do domínio C-terminal entre sete e oito repetições de nonapeptídeos ricos em resíduos de glicina e aspartato do tipo GGXG(N/D)DX(L/I/F)X, onde X pode ser qualquer resíduo, sendo que na posição 3 a tendência é serem um resíduo hidrofílico pequeno e que por sua vez podem ser agrupadas em um único bloco ou vários blocos sucessivos. As fitas β sucessivas giram no sentido da mão direita, e os íons de cálcio se ligam entre dos giros de duas fitas β nas repetições da sequência GGXGXD pelos ácidos aspárticos conservados formando motivos de β -roll (Figura 8). A toxina RTX A após da secreção no meio extracelular, liga o cálcio nas repetições e isso promove o enovelamento para ter uma conformação funcional da proteína, já que a concentração intracelular de cálcio em bactérias é baixa (Benz, 2016; Lally et al., 1999; Linhartova et al., 2010).

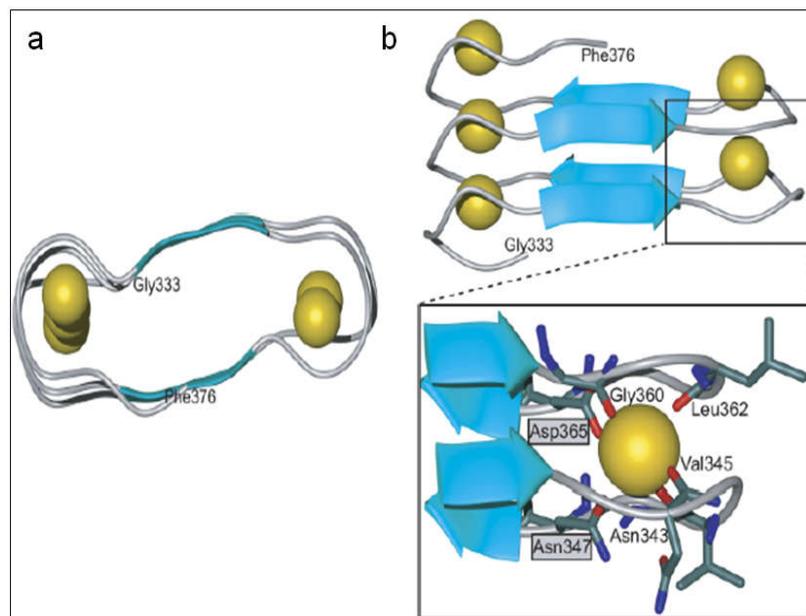


Figura 8. Modelo da protease alcalina de *Pseudomonas aeruginosa* que possui as repetições RTX em forma de β -roll. a) Visão da parte superior do motivo. b) Projeção dos resíduos envolvidos na ligação do cálcio. Adaptado de (Linhartova et al., 2010).

O segundo efetor, Xac0574, é uma proteína de 440 resíduos com seu domínio XVIPCD entre os aminoácidos 317 até 440. A análise da sua sequência pelo servidor Pfam

(Finn et al., 2016) mostrou que ela possui um domínio conservado da superfamília da lipase tipo 3 que por sua vez faz parte da superfamília das α/β hidrolase como representa a Figura 9.

Xac0574	
1	MSIPSPQYAGLSEDAYKDRAVGRRAPGH E EIVTIEG ERYAVLDHVNNQSNQYQG 54
55	TVYRRESSGEIVVAHRGTEGAVNDVLT D ATMVTSRTNPQAADALALTKNAMDIA 108
109	KDVGKRT GHQLEVTVT [*] GHSLGGALAQVSAHHYDLKGETFNAYGASSLSYRIPE 161
162	GGNSVINHV MASDPVSAASPHFGQVRMYAKPYEIATLSGAGYSNSKANFLIPDY 215
216	PLVAAGGSLGAHKLG N FLGEHSALRDPNARPLAEQNKRMIEEYRS DIDGLRTGT 269
270	TILTRSARGLGQDAIDAIRGPLAPGEPAKR D PREHGNHGTSLRIDQPGHVG NGL 323
324	FQDAQRGVHAQDARAGRTPDQHS AQLSGSLASEMHAAGRRIDAVMMSPDA 374
375	ARTFAVQGRVDDPAQLRVSVDTM TAMNTPLEQSSQRVAENAARQSAVLEQQQ 426
427	SQTQQQQGARALG 440

Figura 9. Sequência da proteína Xac0574 anotada no genoma de *X. citri*, ressaltando o domínio identificados. Em marrom o domínio lipase tipo III, no qual está a sequência consenso em negrito e sublinhado (resíduos 125 até 129) do motivo que contém a (*) serina catalítica. Em verde o XVIPCD desde o resíduo 317 até 440

As lipases são chamadas de glicerol éster hidrolases, porque têm a capacidade de hidrolisar as ligações éster presentes em acilgliceróis para liberar ácidos orgânicos e glicerol como representa a Figura 10.

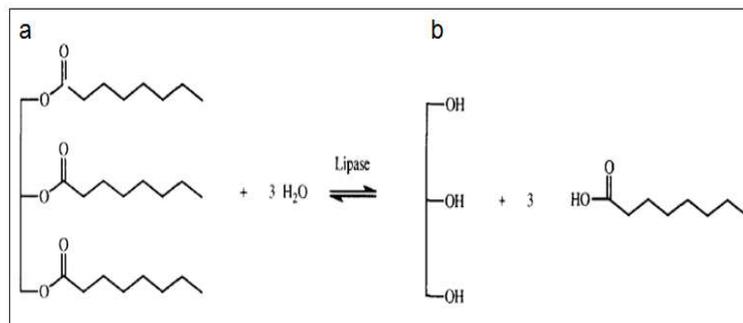


Figura 10. Representação da reação de hidrólise de um triglicerídeo por catálise de uma lipase. a) Substrato intacto. b) Produtos de reação: glicerol e ácidos orgânicos (Jaeger et al., 1994).

A especificidade de hidrolisar um tipo de substrato é o que permite identificar se de fato a enzima é uma lipase ou uma esterase, já que as lipases por definição hidrolisam ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, enquanto as esterases podem catalisar a hidrólise de substratos contendo ácidos graxos de cadeia longa e curta, mas têm preferência

pelos de cadeia curta (Jaeger et al., 1994). Os triglicerídeos de cadeia curta de ácidos graxos (até seis carbonos) são hidrossolúveis, enquanto os triglicerídeos que possuem cadeias de ácidos graxos maiores a seis carbonos não são hidrossolúveis, como consequência para que aconteça a hidrólise é necessário que a interface do triglicerídeo seja emulsificada. Isso ocasiona que a cinética enzimática de uma lipase não possa ser estudada pelos parâmetros de Michaelis-Menten, porque dito modelo é apropriado para descrever somente os processos enzimáticos que acontecem em fases homogêneas entre enzima-substrato (Jaeger et al., 1994).

A topologia das lipases geralmente se caracteriza por serem uma folha β composta 8 fitas β , sendo sete delas paralelas ($\beta 1$ e desde $\beta 4$ até $\beta 8$) enquanto $\beta 2$ é antiparalela. As fitas $\beta 3$ até $\beta 8$ estão conectadas por hélices α que se empacotam a cada lado da folha β como está representado na Figura 11 e por aquela arquitetura são classificadas na superfamília das α/β hidrolase (Jaeger et al., 1999; Ollis et al., 1992). O centro catalítico está rodeado por uma rede de pontes de hidrogênio e composto pela tríade de resíduos Serina-Histidina-Aspartato (por isso também são classificadas como serina hidrolases), onde o aspartato pode ser substituído por glutamato. A serina está localizada em um motivo de cinco resíduos em uma fita β com uma sequência consenso do tipo Glicina-X-Serina-X-Glicina (sendo x qualquer resíduo), sendo que a primeira glicina pode ser substituída por uma alanina. O motivo onde está a serina do sítio ativo e a única sequência conservada conhecida comum entre todas as lipases que foram descritas até agora e por isso é a característica principal empregada para a identificação de este tipo de proteínas (Arpigny & Jaeger, 1999; Jaeger et al., 1994; Javed et al., 2018; Lopes, Fraga, Fleuri, & Macedo, 2011; Marchler-Bauer et al., 2015).

O resíduo de serina (resíduo nucleofílico) se localiza no final da fita $\beta 5$ seguido por uma hélice α que é a característica estrutural mais conservada do enovelamento α/β hidrolase. A posição do resíduo nucleofílico está exposto na superfície do sítio ativo, o que propicia o fácil acesso por um lado do resíduo de histidina da tríade e pelo outro lado do substrato. A torção da estrutura otimiza a posição do nucleófilo no N-terminal da seguinte hélice ajudando a estabilizar o intermediário tetraédrico e a forma ionizada do nucleófilo. O resíduo de aspartato ou glutamato (resíduo catalítico ácido) está estabelecido no giro contínuo da fita $\beta 7$ e forma uma ligação de hidrogênio com a histidina do sítio ativo, já que o resíduo de histidina fica na alça entre a fita $\beta 8$ e a hélice αF como mostra a Figura 11 (Jaeger et al., 1999; Lopes et al., 2011).

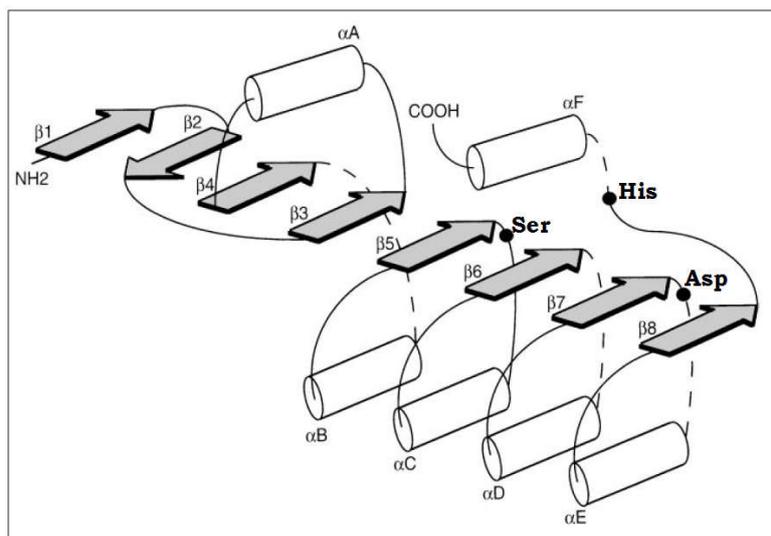


Figura 11. Representação da estrutura do enovelamento da superfamília de α/β hidrolase. As hélices α estão representadas por cilindros e as fitas β por setas. Os pontos pretos são a representação dos resíduos da tríade catalítica, composto pelo nucleófilo (serina, depois da fita $\beta 5$), o resíduo de aspartato ou glutamato (depois da $\beta 7$) e finalmente o resíduo de histidina (na alça antes da hélice αF). Modificado de (Jaeger et al., 1999).

O mecanismo completo de reação está representado na Figura 12 e inicia com um ataque nucleofílico do oxigênio do grupo hidroxila da cadeia lateral da serina, no carbono do grupo carbonila da ligação éster do substrato para formar o intermediário tetraédrico. O intermediário com a carga negativa ao redor do oxigênio do carbonilo (oxiânion), que é chamado de buraco de oxiânion é estabilizado pelo dipolo formado na hélice C e as ligações de hidrogênio de dois grupos NH da cadeia principal. Um dos grupos NH envolvidos na estabilidade provém do resíduo anterior da serina e o outro é o resíduo final da fita $\beta 3$ (Jaeger et al., 1994). A histidina aumenta a nucleofilicidade do grupo hidroxila da serina porque o imidazol recebe o próton da hidroxila que faz o ataque, já que o aspartato (resíduo ácido catalítico) reorienta o anel de imidazol para neutralizar a carga por uma ligação de hidrogênio. O próton que foi recebido pelo imidazol da serina é transferido ao oxigênio do álcool do grupo de saída, que está formando o éster. Depois acontece a liberação do grupo acil pelo ataque de uma molécula de água previamente ativada pela histidina por retirar um próton. Finalmente, a histidina transfere um próton ao oxigênio do resíduo de serina liberando do grupo acil, e assim a enzima está pronta para um novo ciclo catalítico (Jaeger et al., 1994).

A atividade enzimática das lipases está fundamentada nas mudanças conformacionais dos elementos de estrutura secundária tipo hélice α conhecidos como as

tampas (“cap”), porque eles controlam a acessibilidade dos substratos no sítio catalítico. Em ausência de substrato indicado, as tampas bloqueiam o acesso das moléculas monoméricas ao sítio ativo, mas no momento que as moléculas do substrato podem formar emulsões induzem as mudanças conformacionais necessárias para que a tampa hidrofóbica seja movida, e assim a lipase pode interagir com a fase lipídica, ficando exposto o sítio ativo ao substrato para que aconteça a reação de hidrólise (Jaeger et al., 1999; Jaeger et al., 1994; Lopes et al., 2011).

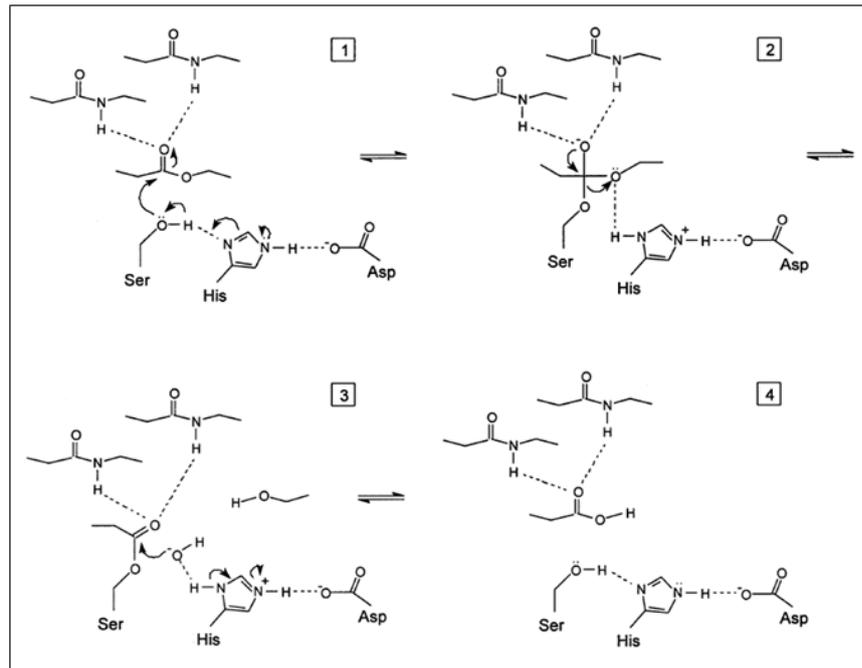


Figura 12. Esquema do mecanismo de reação da triada catalítica Serina-Histidina-Aspartato na lipase. 1) Ligação ao lipídio e ativação do resíduo nucleófilo da serina. 2) Intermediário tetraédrico. 3) Intermediário covalente no qual o componente ácido do substrato é esterificado pelo resíduo de serina da enzima. 4) Ativação do resíduo de serina por receber um próton do resíduo de histidina (Jaeger, Dijkstra, & Reetz, 1999).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar se as proteínas Xac0574 e Xac0573, assim como Xac1918 e Xac1917 formam pares efetor-inibidor associados ao T4SS de *Xanthomonas citri*

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar por técnicas biofísicas e bioquímicas as interações dos efetores Xac0574 e Xac1918 com as suas proteínas de imunidade correspondentes Xac0573 e Xac1917.

- Investigar as atividades enzimáticas dos efetores Xac0574 e Xac1918, e a função inibitória de Xac0573 e Xac1917 *in vitro*.

- Desenvolver estudos estruturais dos efetores e inibidores empregando ensaios de cristalização.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Clonagem gênica e técnicas de biologia molecular

3.1.1 Amplificação de DNA pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os oligonucleotídeos foram desenhados para expressar X-Tfes sem seus domínios XVIPCD e no caso das X-Tfis sem suas sequências sinais de lipoproteínas. Os oligonucleotídeos desenhados amplificaram os fragmentos do DNA que codificam as proteínas em estudo: Xac1918¹⁻⁴²⁶, Xac1918¹⁻⁴⁵¹, Xac1918¹⁻⁴⁷³, Xac1917¹²⁰⁻²⁶², Xac1917¹³⁵⁻²⁶², Xac0574¹⁻³⁰⁹ e Xac0573⁴⁹⁻²³². Na extremidade 5' de cada oligonucleotídeo foi adicionado o sítio de clivagem das enzimas de restrição específicas para cada sequência e o cálculo da temperatura de anelamento (T_m) dos oligonucleotídeos na reação foi feito com o programa T_m calculator (ThermoFisher). As sequências de cada um dos oligonucleotídeos utilizados são mostradas na tabela 1 sendo destacado em negrito os sítios de corte das enzimas de restrição.

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos usados nos diferentes processos de clonagem. Em negrito e sublinhado as sequências do sítio de corte das enzimas de restrição.

Oligonucleotídeo Orientação/Sítio de restrição/Gene	Sequência 5' --> 3'	Região amplificada (Início do nucleotídeo)
F/NdeI/Xac1918	CTCAG CATATG CCTATCAACTATCGCGAG	1
R/BamHI/Xac 1918	TCT GGATCC TTACTGATATCTCCCGCTTTCC	473
F/NdeI/Xac1918	CTCAG CATATG CCTATCAACTATCGCGAG	1
R/BamHI/Xac 1918	AGTC GGATCC CTACTGAACATGCGCCTG	451
F/NdeI/Xac1918	CTCAG CATATG CCTATCAACTATCGCGAG	1
R/BamHI/Xac 1918	ACTG GGATCC CTATTCGTTACCAATCAATAGATC	426
F/NheI/Xac1917	ACTG GCTAGC ACGGTGGTATCCGCG	120
R/BamHI/Xac1917	ATCG GGATCC CTACATTAAGTTAGAGTAATCC	262
F/NheI/Xac1917	TAT GCTAGC TCGCTTTGTGAGGAGTCC	135
R/BamHI/Xac1917	CAGC GGATCC TCTCCTTATCTAAAACATACATTAAG	262
F/NheI/Xac0574	CATCTG GCTAGC ATGAGTATCCCGTCACC	1
R/BamHI/Xac0574	AAT GGATCC TTATGGGGTGTGGCCGTTGC	309
F/BamHI/Xac0574	CATCTG GGATCC TATGAGTATCCCGTCACCGC	1
R/HindIII/Xac0574	ATT AAGCTT TTAGGTGTGGCCGTTGCC	309
F/NdeI/Xac0573	TCAG CATATG GACGTTTCAGGCCGGC	49
R/SalI/Xac0573	AAAG GTCGAC GCGGTGACGGGATACTC	232
F/Bgl II/Xac0573	CATT AGATCT GACGTTTCAGGCCGGC	49
R/XhoI/Xac0573	CATT CTCGAG TCATGACGCAACTTCCTTG	232

As reações de PCR para amplificar os fragmentos codificados de Xac1918¹⁻⁴⁷³ e Xac1917¹³⁵⁻²⁶² foram feitas empregando um volume final de 50 µL distribuído em: 0,5 µL *Pfu*

polimerase Thermo (100 U), 1 µL dNTPS 10 mM, 1 µL de cada primer de uma concentração de estoque de 10 µM, 5 µL de tampão 10X do kit para *Pfu polimerase* que tem incluso cloreto de magnésio, 6 ng do DNA genômico de *Xanthomonas citri* como DNA molde e água para completar o volume da reação. Foram utilizados 30 ciclos para a amplificação dos fragmentos, iniciando com uma temperatura de desnaturação de 94 °C por 3 minutos seguido por 5 ciclos compostos por uma temperatura de desnaturação a 94 °C de 30 segundos, um anelamento de 47 °C por 30 segundos e uma extensão de 72 °C por 3:30 minutos. Posteriormente, foram realizados 25 ciclos constituídos por: uma temperatura de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, um anelamento a 57 °C por 30 segundos e uma extensão de 198 segundos a 72 °C. Consecutivo aos ciclos houve uma etapa de extensão final adicional a 72 °C por 180 segundos para garantir um maior número de cópias do DNA.

Para a amplificação dos fragmentos Xac1918¹⁻⁴²⁶, Xac1918¹⁻⁴⁵¹, Xac1917¹²⁰⁻²⁶², Xac0574¹⁻³⁰⁹ e Xac0573⁴⁹⁻²³² também foi utilizado um volume final de 50 µL, sendo composto por: 0,5 µL de *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase de Thermo* (100U), 1 µL dNTPS 10 mM, 1 µL de cada primer de uma concentração de 10 µM, 10 µL do tampão HF 5X do kit para *Phusion*, 3 % (v/v) DMSO ao 100 % e água para completar o volume da reação. Os ciclos utilizados para a amplificação de cada um dos fragmentos estão descrito nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Ciclos de amplificação utilizados nas PCRs para Xac0574¹⁻³⁰⁹ e Xac0573⁴⁹⁻²³². O tempo de extensão, Y, de 45 segundos para Xac0574 e 30 segundos para Xac0573.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (s)	Ciclos
Desnaturação	98	120	x 5
Desnaturação	98	15	
Anelamento	47	30	
Extensão	72	Y	
Desnaturação	98	15	x 25
Anelamento	59	30	
Extensão	72	Y	
Extensão	72	600	

Tabela 3. Ciclos de amplificação utilizados nas PCRs para as construções Xac1918¹⁻⁴²⁶, Xac1918¹⁻⁴⁵¹ e Xac1917¹²⁰⁻²⁶².

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (s)	Ciclos
Desnaturação	98	120	x 5
Desnaturação	98	15	
Anelamento	53	30	
Extensão	72	15	
Desnaturação	98	15	x 25
Anelamento	63	30	
Extensão	72	45	
Extensão	72	600	

3.1.2 Clonagem nos vetores de propagação de DNA pGEM-T Easy e pJET 1.2 blunt

Os produtos de PCR de Xac1918¹⁻⁴⁷³ e Xac1917¹³⁵⁻²⁶² foram clonados no vetor pGEM-T Easy (Promega) para facilitar a posterior subclonagem no vetor de expressão pET28a. Inicialmente cada produto teve uma reação de adenilação por 30 minutos a 70 °C, tendo um volume final de 10 µL composto pelos seguintes reagentes: 6 µL do produto da PCR, 1 µL da *Taq polimerase Thermo* (50 U), 1 µL do tampão 10X para a enzima *taq polimerase Thermo* (750 mM Tris HCl pH 8,8, 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1 % (v/v) Tween 20), 1 µL de dATP 10 mM e 1 µL de MgCl₂ 2,5 mM. Cada produto da PCR adenilado foi quantificado a 260 nm contra um branco de água no equipamento Nanodrop™ one/one^c da Thermo Fisher, para depois junto com o vetor pGEM-T Easy (Figura 13) ser submetidos a uma reação de ligação com uma proporção 3:1 de inserto e vetor respectivamente. As quantidades e concentrações empregadas foram: 4 µL de vetor, 13 µL de produto de PCR purificado, 2 µL de tampão 2X do kit e 1 µL de *T4 DNA ligase* (3 U). A reação foi agitada suavemente, centrifugada a 9000 xg por uns segundos e deixada 16 horas a 4 °C.

Cada produto da PCR de Xac1918¹⁻⁴²⁶, Xac1918¹⁻⁴⁵¹ e Xac1917¹¹⁹⁻²⁶² foram ligados diretamente no vetor pJET 1.2/blunt (Figura 13), posto que aquele vetor não precisa que os fragmentos sejam previamente fosforilados. A reação teve um volume final de 10 µL constituída por: 2 µL do tampão 2X do kit, 1 µL da enzima *T4 DNA ligase* (5 U/µL), 1 µL de vetor pJET (5 ng/µL) e 6 µL do produto da PCR purificado mantendo a relação 3:1 do inserto e vetor tendo em conta a quantificação de cada inserto. A mistura foi agitada sutilmente e centrifugada a 10000 xg por 5 segundos para logo ser deixada a 4 °C por 16 horas.

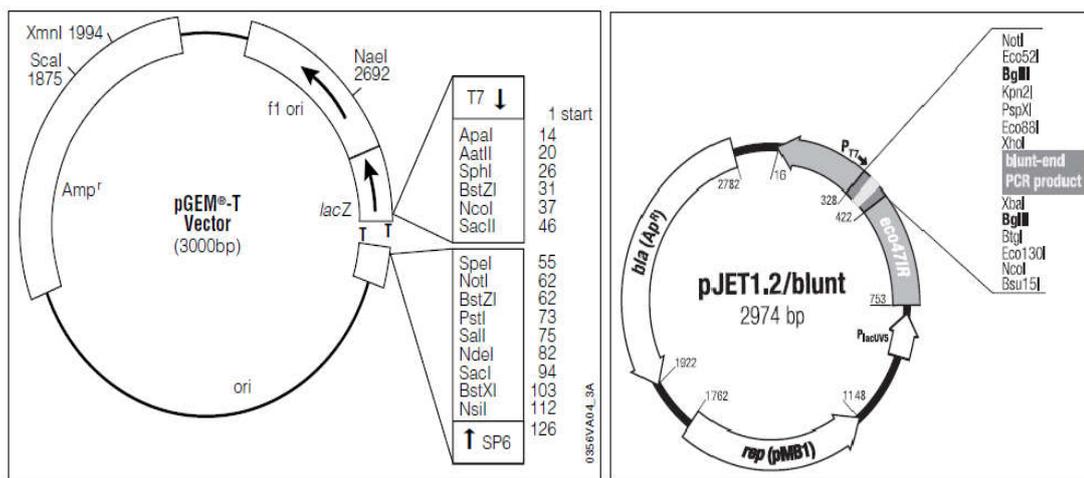


Figura 13. Mapa de restrição dos vetores de propagação pGEM-T e pJET1.2/Blunt

5 µL da reação de ligação das diferentes construções foram utilizadas para transformar bactérias competentes de *E. coli DH5α*, as quais foram incubadas no gelo por 30 minutos para em seguida serem transferidas e incubadas a 42 °C por 75 segundos, para logo de novo deixar no gelo por mais 2 minutos. Em seguida foram adicionados 500 µL de meio 2XTY e incubadas por 1 hora a 37 °C. Após 100 µL das bactérias foram plaqueadas em meio 2XTY com 1.5 % (p/v) ágar contendo uma concentração final de 100 µg/mL de ampicilina, já que é a marca de seleção dos vetores pGEM-T Easy e pJET, para finalmente serem incubadas por 16 horas a 37 °C.

As colônias crescidas foram escolhidas para fazer miniprepi usando o kit *Gene Jet Plasmid Miniprep* (Thermo) para obter o plasmídeo, o qual foi empregado logo em um teste de digestão com as enzimas de restrição correspondentes de cada construção para confirmar a presença do inserto no plasmídeo purificado. A reação de digestão com um volume final de 10 µL esteve composta por: 5 µL do vetor, 1 µL do tampão 10X compatível com as duas enzimas de interesse, 0,3 µL de cada enzima e 3,4 µL de água. O tempo de reação foi uma hora a 37 °C, para logo os produtos das reações serem visualizados por electroforese de gel 1% (p/v) de agarose, sendo positivas aquelas que mostravam a liberação de um inserto do tamanho esperado para cada uma das construções.

3.1.3 Clonagens nos vetores de expressão pET3a, pET11a, pET28a

Cada produto da PCR de Xac0574¹⁻³⁰⁹ e Xac0573⁴⁹⁻²³², assim como os vetores pGEM-T fechados contendo as construções de Xac1918¹⁻⁴⁷³ e Xac1917¹³⁵⁻²⁶², os vetores pJET contendo as construções Xac1918¹⁻⁴²⁶, Xac1918¹⁻⁴⁵¹ e Xac1917¹²⁰⁻²⁶² e os vetores vazios pET3a, pET11a e pET28a (Figura 14) foram digeridos com as enzimas de restrição correspondentes ao desenho de cada construção, tendo um volume de reação de 30 µL distribuídos assim: 25 µL do vetor ou produto de PCR, 1 µL de cada uma das enzimas de restrição e 3 µL do tampão 10X compatível com as duas enzimas de restrição. Cada reação foi incubada a 37 °C por 4 horas, para em seguida cada fragmento ser separado por electroforese em gel 1% (p/v) de agarose e subseqüentemente cortar e purificar a banda de interesse para purificar o fragmento com o kit *Gene Jet Gel extraction* (Thermo).

Após da purificação, cada fragmento e os vetores abertos pET3a, pET11a e pET28a foram quantificados no comprimento de onda de 260 nm contra um branco de água, para em seguida serem misturados mantendo a proporção 3:1 do inserto em relação ao vetor nas reações de ligação. O volume final de reação foi 10 µL, composto por: 1 µL do tampão de

ligação 10X da enzima T4 ligase (400 mM Tris HCl pH 7,8, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP), 1 µL da enzima *T4 ligase* de Thermo (5 U/µl), e o restante do volume foi completado com a proporção inserto: vetor. As reações foram conduzidas a 4 °C por 16 horas, para logo ser utilizadas na transformação de *E. coli DH5α* competentes. O meio de cultivo sólido para o crescimento das bactérias transformadas foi 2XTY com 1.5% (p/v) de ágar, suplementado com os antibióticos canamicina em uma concentração final de 100 µg/mL para os insertos no pET28a e ampicilina em uma concentração final de 100 µg/mL para os insertos no pET3a e pET11a.

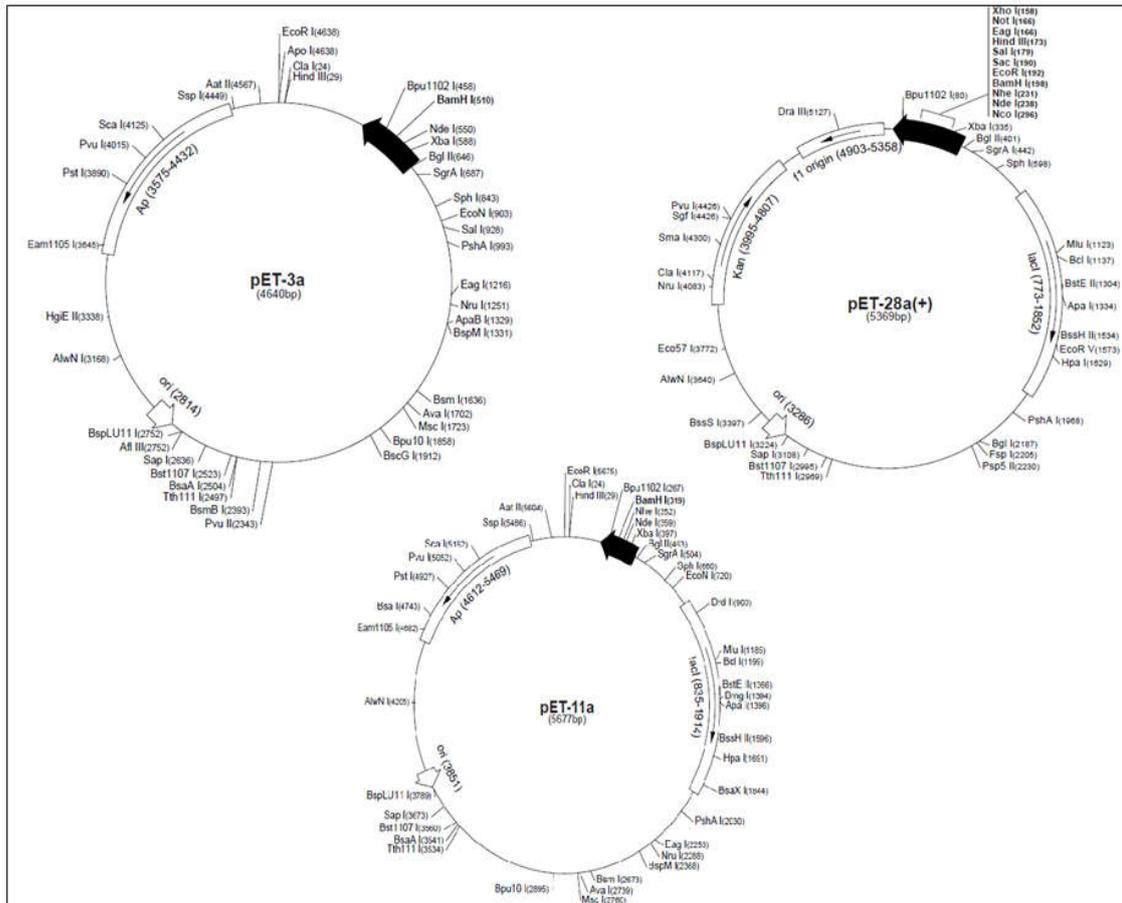


Figura 14. Mapa de restrição dos vetores de expressão pET3a, pET11a e pET28a

Para verificar a presença do inserto no vetor, o DNA das colônias individuais da transformação foram usados como molde para uma nova PCR. Uma pequena porção de cada colônia foi ressuspensa em 50 µL de água estéril para subsequentemente ser fervida a 94 °C por 5 minutos. A reação de PCR teve um volume final de 25 µL constituído por: 2,5 µL do tampão 10X da enzima *Taq DNA polimerase* de Thermo, 2,5 µL de cloreto de magnésio 10X (25 mM), 1 µL do estoque 10 µM de cada oligonucleotídeos específico para

cada construção, 1 µL de dNTPS 10 mM, 2 µL da ressuspensão da colônia, 0,3 µL da enzima *Taq DNA polimerase* de Thermo (5 U/µL) e 14,7 µL de água. Os ciclos de amplificação dos DNAs das colônias que foram utilizados estão descritos na tabela 4.

Tabela 4. Ciclos de amplificação utilizados nas PCRs das colônias. A temperatura de anelamento, Y, é a mesma empregada para a amplificação no template do DNA genômico correspondente de cada construção descritas nas tabelas 2 e 3.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (s)	Ciclos
Desnaturação	95	180	x 5
Desnaturação	95	30	
Anelamento	Y	30	
Extensão	72	180	x 25
Desnaturação	95	30	
Anelamento	Y	30	
Extensão	72	180	
Extensão	72	180	

Em seguida cada produto de PCR e os produtos do teste de digestão com as enzimas de restrição descrito anteriormente, foram analisados por electroforese em gel 1% (p/v) de agarose com a finalidade de identificar o tamanho do fragmento amplificado. Para finalizar, o plasmídeo purificado contendo o gene de interesse foi sequenciado pelo método de Sanger empregando o kit *BigDye Terminator V3.1 cycle sequencing* da Applied Biosystems. A amplificação foi feita utilizando os oligonucleotídeos *T7 promoter* (5'-TAATACGACTACCTATAGGG-3') e *T7 terminator* (5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3') que flanqueiam as regiões de múltiplo clonagem dos vetores pET3a, pET11a e pET28a. A reação teve um volume final de 20 µL distribuído em: 6 µL de água MiliQ, 6 µL de tampão de reação para BigDye (0,2 M Tris HCl pH 9 e 0,2 mM MgCl₂), 1 µL (4 pmol) de cada oligonucleotídeo, 5 µL do DNA plasmidial e 2 µL de BigDye. Os ciclos de amplificação usados estão descritos na tabela 5.

Tabela 5. Ciclos de amplificação da reação de seqüenciamento usando BigDye das diferentes construções.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (s)	Ciclos
Desnaturação	96	120	x 40
Desnaturação	96	45	
Anelamento	50	30	
Extensão	60	240	

Após da reação, foi precipitado cada amostra pela adição de 80 µL de isopropanol 75 % (v/v), para depois centrifugar por 60 minutos a 4 °C a 1000 xg. O sobrenadante foi descartado e o volume restante de álcool foi evaporado na estufa a 37 °C por 60 minutos, garantindo a proteção da amostra da luz. A amostra seca foi sequenciada no sequenciador automático ABI 377 Perkin-Elmer da Applied Biosystems da Central Analítica do IQ-USP.

3.2 Expressão e purificação das proteínas heterólogas

3.2.1 Expressão de proteínas heterólogas em meio 2XTY

As construções Xac1918^{His 1-473}, Xac1917^{His 135-262}, Xac0574^{His 1-309}, Xac0574¹⁻³⁰⁹ e Xac0573^{His 49-232} foram usadas para transformar diferentes cepas de bactérias competentes de *E. coli* com a finalidade de otimizar o rendimento da proteína solúvel. Inicialmente a cepa *E. coli* BL21(DE3) foi transformada empregando o mesmo procedimento de transformação de *E. coli* DH5 α com 0,5 μ L dos plasmídeos contendo as construções mencionadas, para fazer testes de indução com as concentrações 0,2 mM, 0,4 mM e 0,6 mM de IPTG nas temperaturas de indução 18 °C, 25 °C, 30 °C e 37 °C (Ver tabela 9, na secção 4.2 dos resultados e discussão).

Nos testes de indução as colônias isoladas de cada transformação foram inoculadas em 10 mL de meio líquido 2XTY para serem crescidas com agitação a 200 rpm à 37 °C overnight, contendo uma concentração final de 100 μ g/mL de canamicina ou ampicilina para as construções em pET28a e pET11a respectivamente. Em seguida, as células foram diluídas 1/100 em 200 mL em meio líquido 2XTY com a mesma concentração final do antibiótico correspondente, temperatura e agitação até atingir uma densidade ótica entre 0,6 e 0,8 a 600 nm. Depois a cultura crescida foi dividida em 10 mL para cada uma das concentrações de IPTG que iam ser testadas nas quatro temperaturas mencionadas, deixando incubar as culturas por 10 minutos antes da adição do IPTG. As culturas crescidas a 37 °C tiveram um tempo de indução de 3 horas, enquanto às culturas crescidas a 30 °C e 25 °C ficaram em indução por 6 horas e as culturas em 18 °C ficaram por 16 horas. Ao término dos tempos de indução, cada uma das culturas foi centrifugada a 1000 xg por 15 minutos a 4 °C para coletar as células.

As células foram ressuspensas em 1 mL do tampão de lise composto por 50 mM de Tris HCl pH 8, 200 mM NaCl, 5 mM de imidazol e 25 % (p/v) de sacarose, para logo serem mantidas em gelo e lisadas com o Sonicador *Sonics Vibra Cell* com uma ponteira de 3 mm por 30 minutos, trabalhando a uma amplitude de pulso de 40 % durante um intervalo de 15 segundos e um período de descanso de 45 segundos. As amostras lisadas foram centrifugadas à 4°C por 30 minutos a 10000 xg para garantir a separação em duas fases do material não solúvel e o sobrenadante. O sobrenadante foi separado e o material insolúvel foi ressuspensado em 1 mL do tampão de lise.

Para verificar se a proteína ficou solúvel nas diferentes condições avaliadas, as amostras das frações solúveis e insolúveis foram analisadas por electroforese em um gel de poliacrilamida 15% SDS-PAGE. Foi verificado o efeito das variações das concentrações de IPTG e das temperaturas em relação à amostra do cultivo sem induzir e a solubilidade da proteína. No caso que a proteína não teve uma quantidade significativa no sobrenadante ou toda a proteína ficou insolúvel, se empregou o mesmo protocolo descrito nas outras cepas: *E. coli* BL21(DE3)pLysS, *E. coli* BL21(DE3)RIL, *E. coli* BL21(DE3)RP, *E. coli* BL21(DE3)C43, *E. coli* BL21(DE3)C41, *E. coli* BL21(DE3)Arctic e *E. coli* BL21(DE3)Star. É importante ressaltar que as cepas pLysS, RIL, RP precisam do antibiótico cloranfenicol em uma concentração final de 50 µg/mL no meio de cultura, enquanto a cepa Arctic precisa de gentamicina em uma concentração final 20 µg/mL e uma temperatura de indução de 12 °C.

Depois de identificar a melhor condição de crescimento que permitisse ter uma quantidade de proteína significativamente solúvel, as condições foram ajustadas para volumes maiores de cultura bacteriana, assim ao finalizar o tempo de indução, as bactérias contendo as construções de Xac1918^{His 1-473} e Xac0573^{His 49-232} foram centrifugadas a 4 °C por 30 minutos a 8700 xg, enquanto a construção Xac0574^{His 1-309} nos vetores pET28a e pET11a foi centrifugada a 11320 xg por 45 minutos a 4°C. Posteriormente foi descartado o sobrenadante e as células foram ressuspensas no tampão de lise, sendo no caso de Xac1918^{His 1-473} 20 mM Tris HCl pH 8, 200 mM NaCl, 5 mM de Imidazol, 25 % (p/v) sacarose e 60 µL do cocktail de inibidor de protease de Sigma (104 mM de AEBSF, 80 µM de aprotinina, 4 mM de bestatina, 1,4 mM de E-64, 2 mM de leupeptina e 1,5 mM de pepstatin A). Para Xac0573^{His 49-232} o tampão esteve composto por 50 mM Tris HCl pH 8, 200 mM NaCl, 5 mM de Imidazol, 25 % (p/v) sacarose, 60 µL do cocktail de inibidor de protease de Sigma e 3 mM de PMSF. No caso de Xac0574^{His 1-309} o tampão tinha 50 mM Tris HCl pH 8, 200 mM NaCl, 5 mM de Imidazol, 25 % (p/v) sacarose, 60 µL de cocktail de inibidor de protease de sigma, 3 mM de PMSF, 0,03 % (v/v) de Triton X-100, 0,03 % (v/v) de Tween 20 e 5 % (v/v) de glicerol.

3.2.2 Expressão de proteínas heterólogas marcadas com selênio-metionina em meio mínimo M9

O meio mínimo M9 usado para marcar com selênio-metionina as proteínas Xac1918^{His 1-473}, Xac0574^{His 1-309} e Xac0573^{His 49-232} para ensaios de cristalografia, esteve composto por uma mistura de seis soluções descritas a seguir (Paliy & Gunasekera, 2007; Studier, 2005):

- 1) Solução A: 238,7 mM Na₂HPO₄, 110,2 mM KH₂PO₄ e 42,8 mM NaCl foram dissolvidos em água MilliQ para logo ajustar toda a solução a pH 7,4.
- 2) Solução B: 1 M MgSO₄ em água MilliQ.
- 3) Solução C: 1,11 M de glicose foi passada por um filtro de 0,22 µM e armazenada à 4°C até seu uso.
- 4) Solução D: 1 M CaCl₂ foi dissolvido em água MilliQ.
- 5) Solução E: 10 mg/mL de timina foi passada por em um filtro de 0,22 µM para logo ser aliquotada e armazenada a -20 °C até seu uso, evitando a exposição à luz porque pode sofrer fotodegradação.
- 6) Solução F: 467,4 mM NH₄Cl foi ressuspendido em água MilliQ.

As soluções A, B, D, e F foram autoclavadas antes do seu uso e misturadas com as outras soluções empregando-se os seguintes volumes para obter um litro de meio M9: 200 mL da solução A, 2 mL da solução B, 20 mL da solução C, 100 µL da solução D, 1 mL da solução E, 40 mL da solução F e 736,9 mL de água MilliQ autoclavada. Adicionalmente foi preparada uma mistura dos aminoácidos que suplementa o meio e que devem ser adicionada à cultura bacteriana crescida antes de fazer a indução da proteína recombinante. Em 10 mL de água MilliQ foi ressuspendido 60 mg de selênio-metionina, 50 mg de valina, 50 mg de isoleucina, 100 mg de lisina, 100 mg de treonina e 100 mg de fenilalanina, para depois ser esterilizado empregando por um filtro de 0,22 µM antes de ser adicionada ao meio mínimo (Li et al., 2008; Vanduyne, Standaert, Karplus, Schreiber, & Clardy, 1993).

As construções Xac1918^{His1-473} ou Xac0573^{His49-232} em pET28a foram usadas para transformar individualmente a cepa *E. coli* BL21(DE3)RIL enquanto Xac0574^{His1-309} pET28a foi produzida em *E. coli* BL21(DE3)RP. Após da transformação, algumas das colônias isoladas foram transferidas para crescer em 2 mL do meio líquido 2XTY em agitação a 200 rpm, contendo 100 µg/mL de canamicina e 50 µg/mL de cloranfenicol durante 12 horas a 37 °C. Em seguida a cultura bacteriana foi centrifugada a 4000 xg por 2 minutos para retirar o meio e ressuspender as células em 50 mL do meio mínimo M9 incluindo as mesmas concentrações finais dos antibióticos para continuar com o crescimento celular por 16 horas em agitação à 200 rpm e 37 °C (Li et al., 2008; Vanduyne et al., 1993; Walden, 2010).

Ao concluir o tempo de crescimento, todo o preinóculo foi transferido nos 950 mL restantes do meio mínimo M9 mantendo as mesmas concentrações de canamicina e cloranfenicol, assim como a temperatura e agitação. No momento que a densidade ótica da cultura em crescimento atingiu o valor entre 0,6 - 0,8 a 600 nm foi diminuída a temperatura

de crescimento para 18 °C. Em seguida foi adicionada a solução de aminoácidos à cultura e deixado por mais 15 minutos em crescimento antes de adicionar o indutor IPTG, o qual teve uma concentração final de 0,3 mM na cultura (Li et al., 2008; Walden, 2010). Após 16 horas de indução a 18 °C, a cultura foi centrifugada a 8700 xg por 30 minutos a 4 °C. O procedimento foi concluído com a ressuspensão das células no tampão de lise correspondente de cada proteína e o armazenamento a -20 °C até seu uso.

3.2.3 Co-expressão de proteínas heterólogas

O processo de co-expressão consiste em transformar uma cepa bacteriana competente com dois ou mais plasmídeos diferentes ao mesmo tempo, usando o mesmo protocolo de transformação já descrito. Para tentar obter Xac1917¹³⁵⁻²⁶² em uma forma solúvel foi coexpressada com Thioredoxina reductase. O teste de co-expressão na cepa *E. coli* BL21(DE3) foi desenvolvido adicionando 0,3 µL dos plasmídeos Xac1917¹³⁵⁻²⁶² pET28a e Thioredoxina reductase pET11a. A seleção de colônias foi feita usando como concentração final 100 µg/mL dos antibióticos canamicina e ampicilina nas placas de 2XTY.

Para co-expressar o complexo Xac0574-Xac0573 foram utilizadas as construções Xac0574¹⁻³⁰⁹ pET11a e Xac0573⁴⁹⁻²³² pET28a nas cepas *E. coli* BL21(DE3) e *E. coli* BL21(DE3)pLysS, sendo adicionado 0,7 µL de cada plasmídeo e tendo como concentrações finais dos antibióticos canamicina e ampicilina 100 µg/mL e 50 µg/mL para o cloranfenicol nas placas de 2XTY.

Com as colônias obtidas do processo de transformação foi desenvolvido o protocolo já descrito para avaliar a melhor condição de produção da proteína variando a temperatura e a concentração de IPTG.

3.2.4 Purificação de proteínas heterólogas

As bactérias em solução de *E. coli* BL21(DE3) expressando Xac1918¹⁻⁴⁷³ foram lisadas na French Press ao passar através de uma válvula estreita sob uma pressão de 2000 psi, sendo o procedimento repetido 7 vezes. Posteriormente a amostra foi centrifugada a 35000 xg por 45 minutos, para em seguida o sobrenadante ser separado dos restos celulares. No caso das bactérias expressando Xac0573⁴⁹⁻²³², foi adicionada lisozima em pó (0,5 mg/mL) à ressuspensão celular e a mistura foi incubada no gelo por 20 minutos para permitir a atividade enzimática da lisozima iniciando a lise bacteriana. Ao concluir o tempo a

ressuspensão bacteriana foi lisada usando a French press a 2000 psi, sendo repetido o processo 10 vezes. A amostra foi subsequentemente centrifugada a 35000 xg por 45 minutos, separando imediatamente o sobrenadante dos restos celulares e deixando todo no gelo para continuar com o processo de purificação.

As células expressando Xac0574¹⁻³⁰⁹ também foram pré-tratadas com lisozima (0,5 mg/mL) e incubadas em agitação por 45 minutos. A lise bacteriana foi feita com o Sonicador *Sonics Vibra Cell*, tendo como condições de lise uma amplitude de 45 %, um pulso de 15 segundos e um intervalo de espera entre cada pulso de 45 segundos por 45 minutos, para depois a amostra ser centrifugada a 39000 xg por 50 minutos. Os restos celulares e o sobrenadante foram separados e mantidos no gelo para as etapas subsequentes de purificação.

Tanto o processo de lise como de centrifugação para separar os restos celulares foram conduzidos à 4 °C.

As proteínas clonadas no vetor pET28a por possuir uma cauda de poli-histidina no N-terminal tiveram como passo inicial de purificação uma cromatografia de afinidade na coluna HiTrap TM Chelating (GE Healthcare) carregada com Ni⁺². No equipamento ÄKTA purifier 900 – FPLC system (GE Healthcare), a coluna foi equilibrada com o tampão A de afinidade de cada proteína contendo uma baixa concentração de imidazol (tabela 6), para logo conduzir a cromatografia empregando um gradiente de imidazol até 300 mM, sendo o processo de eluição acompanhado pela medição da absorbância a 220 nm e 280 nm. No caso da purificação para a construção Xac0574¹⁻³⁰⁹ pET11a o passo inicial foi fazer uma cromatografia de troca aniônica utilizando o equipamento ÄKTA purifier 900 – FPLC system (GE Healthcare) usando uma coluna Hiprep Q FF (GE Healthcare) equilibrada previamente com o tampão 50 mM Tris HCl pH 8,0, 1 mM EDTA e 5 % (v/v) de glicerol. Para a eluição da proteína foi utilizado um gradiente de NaCl de 0 até 1 M, com um monitoramento do processo nos comprimentos de onda de 220 nm e 280 nm.

As frações eluídas durante a cromatografia de afinidade ou troca iônica foram mantidas no gelo enquanto foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida 15 % SDS-PAGE para identificar as frações que continham a proteína de interesse. Baseado no desenho de cada construção é possível prever o tamanho das proteínas produzidas, portanto, Xac1918^{His 1-473} possui uma massa de 54 kDa, Xac0574^{His 1-309} uma de 35 kDa e Xac0573^{His 49-232} de 23 kDa. As frações visualizadas no gel SDS-PAGE que continham a

proteína perto do peso molecular teórico esperado, foram juntadas e concentradas por centrifugação a 1370 xg a 4°C até atingir um volume igual a 10 mL, empregando um Amicon Ultra de 10 kDa da Millipore para as proteínas Xac1918^{His 1-473} e Xac0573^{His 49-232} enquanto para Xac0574^{His 1-309} foi usado um Amicon Ultra de 30 kDa.

O passo seguinte de purificação das proteínas foi uma cromatografia de exclusão molecular usando as colunas preparativas Superdex S200 para Xac1918¹⁻⁴⁷³ e Superdex S75 para Xac0574¹⁻³⁰⁹ e Xac0573⁴⁹⁻²³². Antes de fazer a injeção da amostra, cada uma das colunas foi equilibrada previamente com o tampão apropriado para cada proteína com o equipamento ÄKTA purifier 900 – FPLC system (GE Healthcare) como mostra a tabela 6 no mesmo equipamento foi executada e monitorada a eluição das proteínas nos comprimentos de onda 220 e 280 nm. Cada uma das frações eluídas dos picos cromatográficos foram coletadas e mantidas em gelo, enquanto as suas alíquotas foram analisadas por gel de poliacrilamida 15 % SDS-PAGE para determinar o pico correspondente à proteína de interesse e a pureza da mesma.

Tabela 6. Tampões usados na cromatografia de afinidade e de exclusão molecular para as proteínas Xac1918^{His 1-473}, Xac0574^{His 1-309} e Xac0573^{His 49-232}. Todos os processos de purificação das proteínas foram conduzidos em um intervalo de temperatura 6 a 8 °C.

Construção da proteína	Tampão A na cromatografia de afinidade	Tampão B na cromatografia de afinidade	Tampão da cromatografia de exclusão molecular
Xac1918 ¹⁻⁴⁷³	20 mM Tris HCl pH 8,0, 200 mM NaCl e 20 mM de imidazol.	20 mM Tris HCl pH 8,0, 200 mM NaCl e 300 mM de imidazol.	10 mM Tris HCl pH 8,0, 20 mM NaCl e 1 mM CaCl ₂ .
Xac0574 ¹⁻³⁰⁹	50 mM Tris HCl pH 8,0, 200 mM NaCl, 20 mM de imidazol e 5 % (v/v) de glicerol.	50 mM Tris HCl pH 8,0, 200 mM NaCl, 300 mM de imidazol e 5 % (v/v) de glicerol.	20 mM Tris HCl pH 8,0, 100 mM NaCl e 5 % glicerol.
Xac0573 ⁴⁹⁻²³²	50 mM Tris HCl pH 8,0, 200 mM NaCl e 20 mM de imidazol.	50 mM Tris HCl pH 8,0, 200 mM NaCl e 300 mM de imidazol.	10 mM Tris HCl pH 8,0 e 20 mM NaCl.

Finalmente foram desenvolvidos os experimentos para a obtenção do complexo Xac0574¹⁻³⁰⁹-Xac0573⁴⁹⁻²³² aplicando dois protocolos. No primeiro, a proteína Xac0573⁴⁹⁻²³² foi purificada por cromatografia de afinidade e por cromatografia de exclusão molecular como já foi descrito, e depois retirada a cauda de histidina (ver item 3.2.5). Após foi adicionada a uma ressuspensão celular contendo Xac0574^{His1-309} para iniciar todo o protocolo de purificação por afinidade e exclusão molecular para Xac0574¹⁻³⁰⁹. Os tampões usados nas cromatografias foram os mesmos utilizados que na purificação de Xac0574 (ver

tabela 6).

O segundo protocolo desenvolvido foi uma co-purificação do complexo fazendo uso de culturas bacterianas expressando as construções Xac0574 pET11a e Xac0573 pET28a. A lise foi feita na French Press a 2000 psi, com uma temperatura de 4 °C e repetindo o procedimento 7 vezes. Em seguida a amostra foi centrifugada a 39000 xg por 50 minutos a 4°C, para separar os restos celulares do sobrenadante e ser mantidos no gelo para a etapa consecutiva de purificação. A purificação do complexo foi feita com uma cromatografia de afinidade e de exclusão molecular usando o mesmo procedimento e os mesmos tampões descritos para a construção de Xac0574.

3.2.5 Remoção da cauda de poli-histidina e quantificação de proteínas

As construções clonadas no vetor pET28a codificam adicionalmente uma cauda de poli-histidina no N-terminal do polipeptídeo recombinante. Para remover a cauda das diferentes construções proteicas foi empregado o kit *Thrombin Clean Cleave* (Sigma Aldrich), do qual foi utilizado uma proporção de 100 µL da resina de trombina ativada por 1 mg de proteína recombinante, conduzindo a reação a 4 °C sob agitação por 16 horas. Ao concluir o tempo de reação foi centrifugada a amostra a 700 xg por 10 minutos à 4 °C com a finalidade de separar a resina da proteína digerida. Posteriormente o sobrenadante foi adicionado a uma coluna de resina Ni-NTA (Qiagen) carregada com níquel que faz a eluição por gravidade, equilibrada previamente com o tampão usado na eluição da cromatografia de exclusão molecular correspondente de cada construção. O flow through proveniente da eluição da coluna Ni-NTA que contém a proteína de interesse (fração não ligada à coluna) foi coletado e armazenado à 4 °C.

As diferentes proteínas purificadas precisavam ser quantificadas para todos os estudos posteriores, por isso os métodos empregados de quantificação foram coeficiente de extinção molar, BCA e Bradford, sendo o último utilizado para a quantificação dos ensaios que envolvia as construções de Xac0547¹⁻³⁰⁹. O procedimento de quantificação por coeficiente de extinção molar consistiu em fazer a leitura da absorbância da proteína à 280 nm no equipamento NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific), e com o coeficiente de extinção molar calculado pelo programa ProtParam (Gasteiger E., 2005) (<http://web.expasy.org/protparam/>) para cada uma das sequências de aminoácidos codificadas das construções foi possível determinar a concentração da proteína (S. C. Gill & von Hippel, 1989).

A metodologia de BCA utiliza uma curva de calibração que foi construída com 5 diluições do stock de 10 mg/mL de Albumina de soro bovina (BSA) em um intervalo de concentração de 0 até 8,0 mg/mL, sendo que cada uma das diluições foi feita no tampão no qual estava dissolvida a proteína de interesse a quantificar. Adicionalmente emprega os reagentes ácido bicinconínico (reagente A) e 4 % (p/v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (reagente B) em uma proporção 50:1, para gerar a redução do Cu^{2+} a Cu^{1+} pela proteína em meio alcalino e assim ter a formação da cor que logo vai ser quantificada. Em diferentes poços de uma microplaca foi adicionado 25 μL de cada uma das diluições de BSA e da proteína de interesse, para logo adicionar em cada um dos poços 200 μL da mistura dos reagentes A e B descrita anteriormente, deixando incubar a reação por 30 minutos à 37 °C. Ao finalizar o tempo de incubação a placa foi lida no comprimento de onda de 562 nm no leitor de placas SpectraMax Paradigm Molecular Devices. Com os dados obtidos das absorbâncias foi gerada uma curva padrão da concentração contra a absorbância, onde a equação da reta permitiu determinar a concentração da proteína de interesse.

A quantificação pelo método de Bradford também foi feita em microplaca usando para a curva de calibração diferentes diluições BSA (1 mg/mL) em um intervalo de concentrações de 0,05 mg/mL até 0,5 mg/mL para garantir a linearidade do método. Cada diluição empregou o mesmo tampão da proteína de interesse que ia ser quantificada para completar o volume, enquanto reagente concentrado de Bradford (solução ácida de azul brilhante de Coomassie, ácido fosfórico e metanol) do kit BioRad protein assay foi diluído 1/5 em água MilliQ para poder ser adicionado nas soluções de proteína. A mistura de reação consistiu em adicionar em diferentes poços da placa 10 μL de cada diluição e da proteína de concentração desconhecida, para logo depois adicionar 200 μL do reagente de Bradford diluído e deixar incubando as misturas de reação a temperatura ambiente por 5 minutos. Ao concluir o tempo de reação foi feita a medição da absorbância no comprimento de onda de 595 nm no leitor de placas SpectraMax Paradigm Molecular Devices. A equação da reta obtida a partir da curva padrão foi utilizada para determinar a concentração da proteína de interesse.

3.2.6 Western Blot

Modificando os protocolos descritos por (Sambrook J, 2001; Wu, Li, & Chen, 2007), foram empregados os seguintes reagentes:

a) Tampão de transferência: Para 1 L de solução foi necessário 5,38 g Tris base, 0,375 g

SDS, 2,94 g glicina, 20 % (v/v) de etanol e completando o volume com água MilliQ.

b) Tampão PBS (10X): Os reagentes para 1 L de solução foram 80 g NaCl, 2 g KCl, 115 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 2 g KH_2PO_4 , completando o volume com água MilliQ.

c) Tampão fosfatase: Um litro de solução pH 9,5 esteve composto por 12,11 g de Tris base, 5,85 g NaCl, 5 mL MgCl_2 1 M e completando o volume com MilliQ.

d) NBT (Cloreto de nitroblue tetrazólio): A concentração final da solução foi 75 mg/mL dissolvido em dimetilformamida 70 % (v/v).

e) BCIP (5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil-fosfato): A concentração final da solução foi 50 mg/mL dissolvido em dimetilformamida.

f) Solução de revelado: Para 15 mL de tampão fosfatase foi adicionado 22,5 μL da solução de BCIP e 30 μL da solução de NBT. O reagente de revelado deve ser preparado na hora que vai ser usado e protegido da luz para evitar a sua decomposição.

O procedimento teve início com a transferência do gel de poliacrilamida à membrana de nitrocelulose ativada previamente com tampão de transferência por imersão. Utilizando o equipamento Te 70 Pwr Semi Dry Transfer Ecl Blotter (Amersham) foi feita a transferência por 90 minutos à 45 mA por gel (Towbin, Staehelin, & Gordon, 1979). Para conferir a qualidade da transferência, a membrana de nitrocelulose foi corada com o corante vermelho de Ponceau (0,2 % (p/v) Ponceau e 1 % (v/v) de ácido acético) por 5 minutos em agitação, para em seguida lavar a membrana com água destilada até remover todo o corante. Logo depois, a membrana foi bloqueada com uma solução de PBS contendo 5 % (p/v) de leite em pó sem gordura e mantida em agitação a 4 °C no mínimo por uma hora para em seguida ser lavada três vezes com só PBS (Kurien & Scofield, 2006; MacPhee, 2010).

O próximo passo foi adicionar PBS contendo o anticorpo monoclonal anti-His conjugado com fosfatase alcalina (Sigma) em uma diluição 1/4000, para incubar sob agitação por uma hora a temperatura ambiente. Para retirar o excesso de anticorpo da membrana foram feitas três novas lavagens com o tampão PBS e imediatamente uma lavagem adicional com tampão fosfatase por 10 minutos. Finalmente foi adicionada a solução de revelado e a membrana foi incubada à 37 °C sob abrigo da luz até as bandas se

tornassem visíveis, e aí parar a reação por retirar a solução reveladora e fazer uma lavagem final com água (Kurien & Scofield, 2006; MacPhee, 2010).

3.3 Estudos de interação proteína-proteína

3.3.1 Estudos de dicroísmo circular

Os estudos desenvolvidos por dicroísmo circular tinham como finalidade ser o ponto de partida para a caracterização das proteínas em suas proporções de hélices α , folhas β e alças. Os espectros foram adquiridos no Espectrômetro Jasco J-815, usando 20 μM do tampão de fosfato de potássio pH 7,0, uma cubeta de quartzo com um caminho óptico de 0,5 mm e um volume de amostra de 200 μL . A concentração proteica dos ensaios foi 15 μM para Xac0574^{His1-309} e Xac0573^{His49-232} nos ensaios individuais assim como na mistura delas. Os dados coletados estavam em unidades MRE (Elipticidade média de resíduos) e constituem uma média de 8 varreduras desde 190 nm até 250 nm a 30 °C com uma leitura cada 1 nm, D.I.T (Tempo de integração de dados) de 1 segundo e uma velocidade de varredura de 10 nm/minuto. O sinal do ruído gerado pelo tampão foi subtraído de todas as medições pelas medições de só o tampão. O cálculo das porcentagens das estruturas secundárias dos dados experimentais como teóricos foram feitos pelos programas K2D3 (Louis-Jeune, Andrade-Navarro, & Perez-Iratxeta, 2012) e Bestset (Micsonai et al., 2015).

3.3.2 Determinação do estado oligomérico do complexo Xac0574^{His1-309}- Xac0573^{His49-232} por cromatografia de exclusão molecular analítica

Para os ensaios de cromatografia de exclusão molecular analítica, a coluna Superdex 200 Increase 10/300 GL de 24 mL (GE Healthcare) foi equilibrada com o tampão 50 mM Tris HCl pH 8,0, 100 mM NaCl e 5 % (v/v) de glicerol, empregando o equipamento ÄKTA purifier 900 – FPLC system (GE Healthcare). Os marcadores de peso molecular usados para obter a curva padrão de eluição foram do kit de marcadores de peso molecular de 12 até 200 KDa da Sigma Aldrich. Todas as corridas cromatográficas tiveram um fluxo de 0,5 mL/min e um volume de injeção de 100 μL da amostra de interesse, sendo as concentrações avaliadas 50 μM , 75 μM e 100 μM para Xac0574^{His1-309} e 75 μM , 150 μM e 300 μM para Xac0573^{His49-232}. No caso do complexo Xac0574^{His1-309}- Xac0573^{His49-232}, as proporções avaliadas foram: 1:1, 1:1.6 e 1:3 respectivamente.

3.3.3 Determinação do estado oligomérico do complexo Xac0574^{His1-309}- Xac0573^{His49-232} por SEC-MALS

SEC-MALS é uma técnica que usa uma cromatografia de exclusão molecular (SEC) acoplada a um detector de espalhamento de luz estática multi-ângulo. O espalhamento de luz foi medido pelo detector de espalhamento de luz miniDAWN® TREOS® II, a concentração da proteína foi determinada pelo refractômetro Optilab® T-rEX™, e os dados coletados de cada experimentos foram processados pelo software Astra® para calcular a massa molecular da amostra, sendo tanto o software e os equipamentos da empresa Wyatt Technology. A coluna usada na cromatografia foi a coluna de exclusão molecular MALS de 5 µm, com dimensões 7.8x300 mm e uma capacidade de separação de 15 KDa até 5 MDa, equilibrada com o tampão 50 mM Tris HCl pH 8, 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂ e 0,02 % (p/v) de ázida de sódio antes da injeção da amostra.

As três corridas cromatográficas foram feitas a temperatura ambiente com monitoramento no comprimento de onda de 280 nm e empregando um fluxo de corrida de 0,5 mL/min. A primeira corrida foi da proteína Xac0574^{His1-309}, a segunda de Xac0573^{His49-232} e a última da mistura proteica Xac0574^{His1-309}- Xac0573^{His49-232}, sendo usada uma concentração 150 µM para cada proteína, com um volume de injeção de 100 µL em cada ensaio.

3.3.4 Caracterização termodinâmica da interação Xac0574^{His1-309} e Xac0573^{His49-232}

Os parâmetros termodinâmicos da formação do complexo entre as proteínas Xac0574¹⁻³⁰⁹ e Xac0573⁴⁹⁻²³² foram determinados por calorimetria de titulação isotérmica (ITC) e por calorimetria diferencial de varredura (DSC). As duas técnicas estão fundamentadas na quantificação do calor absorvido ou gerado pela interação das moléculas.

O equipamento de ITC possui duas células idênticas compostas por um material com uma alta eficiência de condução térmica que estão revestidas por uma jaqueta adiabática (Pierce, Raman, & Nall, 1999). Uma das células é de referência enquanto a outra célula é de amostra para adicionar uma das biomoléculas que vai ser estudada. Na seringa de injeção do equipamento é colocada uma solução concentrada do ligante que vai ser titulado e que deve estar diluído no mesmo solvente que se encontra a molécula adicionada na célula de amostra.

A interação que ocorre entre o titulante e as moléculas que ficam na célula de amostra com cada adição do ligante gera uma diferença de temperatura entre a célula de referência e de amostra, a qual é detectada pelo equipamento que fornece uma potência à célula de amostra para manter a sua condição isotérmica. Ao ter a titulação completa, os picos individuais são integrados para obter um gráfico da entalpia de ligação (ΔH) em função da razão molar do ligante. Conhecendo a diferença de energia fornecida à célula de amostra para voltar a seu estado inicial após de cada injeção, assim como as concentrações da amostra e do titulante, é possível obter os parâmetros de entalpia de ligação (ΔH), constante de dissociação (K_d) e a estequiometria da ligação (N), para depois ditos parâmetros serem utilizado nos cálculos da energia livre de Gibbs (ΔG) e a entropia do sistema em estudo (ΔS) (Kabiri & Unsworth, 2014).

O equipamento usado para avaliar a interação de Xac0574^{His1-309} e Xac0573^{His49-232} foi um microcalorímetro de titulação isotérmica VP-ITC da Microcal (Northampton, USA). Todos os experimentos foram realizados a 30 °C usando como concentrações de trabalho 200 μ M de Xac0573^{His49-232} (na pipeta) e 10 μ M Xac0574^{His1-309} (na célula de reação), tendo como tampão de diluição 20 mM Tris HCl pH 8, 100 mM NaCl e 5 % (v/v) de glicerol. Foram realizadas 25 injeções de 3 μ L, com intervalos de 5 minutos sob constante agitação. O calor de diluição foi determinado ao titular Xac0573^{His49-232} na célula de amostra contendo o mesmo tampão empregado na titulação exceto a proteína Xac0574, para depois o calor detectado ser subtraído de cada pico antes de fazer a normalização, e assim obter o gráfico que descreve o modelo da interação utilizando o software Origin 7,0 do equipamento.

Em contraste ao ITC, os experimentos desenvolvidos por DSC permitem estudar as transições induzidas termicamente principalmente aquelas que estão relacionadas com mudanças conformacionais das moléculas (Bruylants, Wouters, & Michaux, 2005). O equipamento do DSC tem o mesmo princípio de funcionamento que o ITC, ou seja, dependendo do evento que ocorre na célula de amostra o equipamento compensa a energia necessária para que a célula de amostra fique com a mesma temperatura que a célula de referência, porém no DSC isso é feito para cada grau Celsius na faixa de variação da temperatura do experimento. A energia fornecida é proporcional à capacidade calorífica relativa (C_p , em cal/°C) da solução da macromolécula, e o termograma gerado é caracterizado por um processo de absorção (endotérmico) ou liberação de calor (exotérmico), onde a temperatura registrada no valor máximo da capacidade calorífica corresponde à temperatura de transição (T_m) e fornece uma medida da estabilidade térmica do sistema em estudo (Johnson, 2013; Kato, Yamada, Nakamura, Kidokoro, & Kuroda,

2007).

Os ensaios de DSC para monitorar a estabilidade térmica das proteínas Xac0574^{His1-309}, Xac0573^{His49-232} e o complexo equimolar Xac0574^{His1-309} - Xac0573^{His49-232} foram feitos no equipamento VP-DSC (Microcal, USA), tendo como condições experimentais uma velocidade de varredura de 60 °C/hora, usando as concentrações de 40 µM de cada proteína e de 80 µM na concentração final do complexo no tampão de diluição 20 mM Tris HCl pH 8, 100 mM NaCl e 5 % (v/v) de glicerol. Adicionalmente foi efetuada a avaliação da reversibilidade da desnaturação térmica das proteínas individualmente e em complexo, portanto, cada amostra desnaturada foi resfriada até à temperatura inicial do ensaio, esperou-se 15 minutos para logo depois serem realizada uma segunda varredura.

3.4 Estudos de atividade enzimática e biológica das proteínas Xac0574^{His1-309} e Xac0573^{His49-232}

3.4.1 Ensaio de crescimento celular de *E. coli*

A cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS foi transformada com os plasmídeos: pET28a vazio, pET28a contendo Xac0574, pET28a contendo Xac0573 e pET28a contendo Lip4 que é uma esterase extracelular como controle do experimento. De cada transformação uma colônia foi transferida para 2 mL de meio líquido 2XTY contendo 100 µg/mL de canamicina e 50 µg/mL de cloranfenicol para deixar crescendo durante 16 horas a 37 °C em agitação a 200 rpm. Os diferentes preinóculos foram diluídos 1/50 e depois incubados a 37 °C até uma D.O_{600nm} aproximada de 1, para depois ser diluídos de novo até uma D.O_{600nm} 0,05 para iniciar o acompanhamento do crescimento cada hora pelas leituras de D.O_{600nm} até a adição de IPTG. Após da indução, as medições foram feitas cada 30 minutos até completar 7 horas de crescimento.

Outro ensaio de crescimento e viabilidade celular foi realizado em meio sólido. Uma colônia de cada transformação foi transferida a 3 mL de meio líquido 2XTY contendo 100 µg/mL de canamicina e 50 µg/mL de cloranfenicol até ter um crescimento celular com uma D.O_{600nm} de 1. Em seguida foram feitas diluições seriadas de cada cultura até 10⁻⁶, para depois colocar 5 µL de cada cultura diluída em placas de meio 2XTY com 1.5 % (p/v) de ágar contendo as mesmas concentrações de antibiótico que o meio líquido, para deixar incubando a 37 °C por 17 horas. As placas estavam suplementadas com 0, 25, 50, 75 e 100 µM do indutor IPTG.

3.4.2 Ensaios da atividade enzimática de Xac0574 com fosfolipídios

a) Preparação do filme de lecitina

Alíquotas de 50 μL de lecitina de ovo 122,7 mM (Sigma) ressuspensa em diclorometano foram colocadas em tubos de ensaio, para logo evaporar o solvente orgânico com um fluxo constante de nitrogênio e assim formar o filme. Posteriormente foram selados os tubos com parafilm tendo pequenos buracos para deixar no dessecador em vácuo por 45 minutos para garantir a eliminação completa do diclorometano. Todos os tubos foram armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até seu uso.

b) Reação *in vitro* de Xac0574^{His1-309} com fosfolipídios

A reação *in vitro* da hidrólise da lecitina feita por Xac0574 foi empregada para identificar as melhores condições de reação para monitorar a sua atividade, por isso foram efetuados quatro ensaios diferentes. O primeiro ensaio foi feito para categorizar a Xac0574 como lipase ou fosfolipase, empregando dois substratos, um filme de lecitina e 10 μL de azeite de oliva. Cada substrato foi ressuspensa em 1 mL de deoxicolato de sódio 81 mM, 1 mL de CaCl_2 18 mM e 1 mL de água, para logo sonicar a solução por 10 segundos. A 1 mL do substrato preparado foi adicionado 1,85 μM de Xac0574^{His1-309}.

O segundo experimento foi desenhado para observar o efeito da ausência do deoxicolato de sódio e do CaCl_2 na atividade enzimática de Xac0574. Para isso os filmes elaborados de lecitina foram ressuspensa em dois tampões diferentes, tendo como concentração final de lecitina 6,13 mM. Um dos tampões esteve composto por 1 mL de 20 mM Tris HCl pH 8 e 1 mL 81 mM de deoxicolato de sódio, enquanto o segundo tampão de ressuspensão foi 2 mL de 20 mM Tris HCl pH 8. O volume utilizado do substrato ressuspensa com cada tampão para a reação foi 1,8 mL, ao qual foi adicionado uma concentração de 1,4 μM de Xac0574^{His1-309}.

O terceiro experimento avaliou o efeito da variação do pH na atividade de Xac0574^{His1-309}. A reação esteve composta por 6,13 mM da ressuspensão de lecitina em H_2O MilliQ autoclavada, 1 μM de Xac0574^{His1-309} e 23 mM dos tampões do pH de interesse, sendo eles: acetato de sódio pH 4, citrato de sódio pH 5, Bis Tris HCl pH 6, Bis Tris propano pH 7 e Tris HCl pH 8.

O último experimento permitiu analisar o efeito da variação da concentração de Xac0574^{His1-309} na formação do produto em função do tempo. Foram usadas as concentrações 0,5 μM e 1 μM de Xac0574^{His1-309} para 9,20 mM de lecitina ressuspendida em 50 mM de Tris HCl pH 8. De cada reação foram retiradas alíquotas aos 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 60 minutos, 120 minutos, 180 minutos e 240 minutos.

Todas as reações descritas anteriormente foram deixadas em agitação de 100 rpm a 30 °C por 2 horas. Ao concluir o tempo indicado de reação foram retiradas alíquotas de 20 μL de cada reação e do branco correspondente, para serem armazenadas a -20 °C até ser feita a sua análise por cromatografia de capa fina (TLC).

Fazendo uso das condições ótimas determinadas usando a lecitina como substrato, foram realizados os ensaios para determinar o possível fosfolípido alvo de Xac0574 presente na membrana celular bacteriana. Os seguintes substratos foram testados: POPC (1-palmitoil-2-oleil-*sn*-glicero-3-fosfocolina), DOPE (1,2-dioleilfosfatiletanolamina), POPG (1-palmitoil-2-oleil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol) e cardiolipina bovina. De cada substrato foi feito um filme com 5,5 mg de fosfolípido, usando o mesmo procedimento descrito para um filme de lecitina. Cada filme foi ressuspendido em 1 mL do tampão 20 mM Tris HCl pH 8, porém no caso do DOPE foi preciso adicionar 50 μL de deoxicolato de sódio 81 mM para conseguir a sua ressusensão completa. Todas as reações foram conduzidas a 30 °C com agitação de 100 rpm, um volume final de 800 μL contendo 1 μM da enzima, enquanto o volume restante do substrato foi empregado como branco da reação.

Para as reações do POPG, DOPE e cardiolipina foram retiradas alíquotas de 100 μL aos 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 60 minutos e 90 minutos. No caso do POPC, os intervalos foram 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 9 horas, 18 horas e 22 horas. Todas as alíquotas foram imediatamente armazenadas a -20 °C até a análise dos produtos de reação por TLC, para posteriormente fazer a extração de lipídios totais (ver item 3.4.4).

Por último, para avaliar a possível atividade lisofosfolipase de Xac0574 foi utilizado o substrato L- α -lisofosfocolina (Sigma) em três reações, uma contendo Xac0574^{His1-309}, outra contendo Xac0573^{His49-232} e a última uma mistura equimolar das duas proteínas. O volume final de reação foi de 200 μL , composto por: 30 mM de Tris HCl pH 8, 1 μM (concentração final) de cada proteína e 5,0 mM do lisofosfolípido ressuspendido previamente em H₂O

MilliQ. O tempo total de reação foi 240 minutos a 30 °C em agitação a 100 rpm.

3.4.3 Identificação de fosfolipídios por cromatografia de capa fina (TLC)

Na cromatografia de capa fina (TLC) se utilizou como fase estacionária uma placa de sílica gel 60 GF₂₅₄ da Merck Millipore, a qual foi incubada a 120 °C no mínimo 30 minutos para garantir a sua ativação e ato contínuo foi adicionado 10 µL de cada amostra. Na câmara cromatográfica saturada previamente com a fase móvel composta pela solução clorofórmio, metanol, água nas proporções 65:35:3, foi deixada a placa de sílica contendo as amostras para deixar difundir por capilaridade a fase móvel até estar próximo do extremo superior da placa. Posteriormente a placa foi secada a temperatura ambiente para deixar evaporar o solvente em excesso da fase móvel e assim poder revelar com a solução de molibdênio e ácido sulfúrico, a qual é específica para a identificação do grupo fosfato nos fosfolipídios. Para finalizar, a placa logo de ser revelada foi deixada uns poucos segundos a 120 °C para aumentar a intensidade das manchas que foram separadas.

Seguindo o protocolo descrito por (Dittmer & Lester, 1964), a solução de identificação dos fosfolipídios esteve composta pelas soluções A e B descritas a seguir:

- Solução A: 40,11 g de MoO₃ (trióxido de molibdênio) foi adicionado a um litro 25 N de H₂SO₄. A solução foi aquecida lentamente até ferver para assim conseguir dissolver todo o trióxido.
- Solução B: 1,78 g de molibdênio em pó foi adicionado a 500mL da solução A preparada previamente. A solução resultante foi fervida gentilmente por 15 minutos para depois deixar esfriar e decantar.

Os 500mL restantes da solução A foram misturados com os 500mL da solução B preparada para ter o estoque da solução que se caracteriza por ter uma cor verde-amarela. Uma alíquota da solução estoque foi diluída em água até ter uma cor amarelada para usar no spray.

3.4.4 Extração de lipídios totais das reações *in vitro* com fosfolipídios

Depois que os produtos das reações com POPC, DOPE, POPG e cardiolipina foram confirmados por TLC, foi feito um protocolo de extração todo no gelo para evitar a oxidação dos lipídios totais extraídos. Às alíquotas de 100 µL de cada reação (descritas na seção

3.4.2) foram adicionados 200 µL de metanol gelado e a mistura foi agitada no vortex por 30 segundos para posteriormente adicionar 1 mL de MTBE (metil *tert*-butil éter) e misturar de novo por 1 minuto no vortex. Em seguida, 300 µL de água MilliQ foi adicionada à solução e misturada no vortex por 30 segundos para deixar por 10 minutos em repouso no gelo favorecendo a separação de fases, para depois centrifugar a 1500 xg por 5 minutos a 4 °C e assim delimitar melhor a fase orgânica superior para permitir a sua transferência a uma pequena garra de vidro limpa. Cada vial contendo a fase orgânica foi secado completamente em fluxo de nitrogênio e ressuspendido em 1mL de isopropanol, do qual foi feita uma diluição 1/50 para ser analisada por HPLC acoplado a espectrometria de massas. Todos os solventes empregados foram grau HPLC (Matyash, Liebisch, Kurzchalia, Shevchenko, & Schwudke, 2008; Wang et al., 2016).

3.4.5 Análise por espectrometria de massas da extração de lipídios totais das reações *in vitro*

Os compostos lipídicos foram analisados no equipamento ESI-TOFMS (Triplo TOF 6600 da empresa AB Sciex, com fonte de ionização por electrospray e analisador Q-TOF) acoplado a cromatografia líquida de alto desempenho (UPLC Nexera, Shimadzu, Kyoto, Japão), instalado no laboratório da professora Sayuri Miyamoto do Instituto de Química da USP. O volume de injeção da amostra foi 1 µL, usando um fluxo de corrida de 0,2 mL/min em uma coluna CORTECS[®] de dimensões 2,1x100 mm e um tamanho de partícula de 1,6 µm, enquanto a temperatura do forno foi mantida a 35 °C. A fase móvel da cromatografia utilizou duas soluções diferentes contendo 10 mM de acetato de amônio, sendo inicialmente o acetato de amônio dissolvido em água para logo adicionar os solventes orgânicos. A solução A esteve composta por acetonitrila e água na proporção 40:60 e a solução B por isopropanol, acetonitrila e água na proporção 88:10:2

A corrida cromatográfica se iniciou com um 40 % da solução B para depois iniciar o gradiente até chegar 100 % de B ao longo dos primeiros 10 minutos para fazer a eluição dos compostos, e o varrimento (“scan”) da corrida foi feito para valores de massa de 200-2000 Da (Wang et al., 2016). A aquisição dos dados de MS/MS usou o software Analyst[®] 1.7.1 e a análise de eles foi feito no software PeakView[®], sendo os dois programas da AB Sciex.

3.5 Cristalografia de proteínas

3.5.1 Ensaio de cristalização

As proteínas purificadas Xac1918¹⁻⁴⁷³, Xac0574¹⁻³⁰⁹, Xac0573⁴⁹⁻²³² assim como os correspondentes produtos da proteólise de Xac1918¹⁻⁴⁷³ e Xac0573⁴⁹⁻²³² (Ver secção 3.5.2), foram concentradas por centrifugação a 1370 xg à 4 °C em um Amicom Ultra para logo ser quantificadas como já foi descrito no item 3.2.5. O parâmetro principal para a realização dos testes foi que a concentração da proteína estivesse no intervalo de 3 mg/mL e 10 mg/mL.

Para os testes iniciais de cristalização foram usados os kits da matriz esparsa Hampton Research: Crystal Screen, Crystal Screen 2, Index, PEGRx1, PEGRx 2, PEG/Ion Screen, PEG/Ion 2 Screen, SALT RX1 e SALT RX2. No reservatório de cada poço das placas de gota sentada foi adicionado 300 µL das diferentes soluções de cristalização e na plataforma superior (onde pode acontecer a formação dos cristais) foram adicionados 1 µL da proteína purificada e concentrada e 1 µL da solução de cristalização que fica no reservatório, para finalmente, as placas serem fechadas com plástico aderente e mantidas à 18 °C. Posteriormente as condições de cristalização nas quais houve formação dos cristais foram modificadas em pequenas proporções (concentração da proteína, variação do pH, concentração de sal ou do agente precipitante) para tentar obter melhores cristais (McPherson & Cudney, 2014). Em alguns casos, as proteínas utilizadas no processo foram produzidas usando o protocolo de incorporação de selênio-metionina durante a expressão das proteínas no meio mínimo M9 do item 3.2.2.

3.5.2 Proteólise *in situ* para ensaios de cristalização

As proteínas Xac1918¹⁻⁴⁷³ e Xac0573⁴⁹⁻²³² foram pre-tratadas com as proteases tripsina e quimotripsina, empregando dois protocolos de proteólise. Na primeira metodologia, a proteólise aconteceu conjuntamente com a cristalização da proteína no poço das placas de gota sentada. As diluições da protease foram feitas com o mesmo tampão de purificação da proteína, sendo os fatores de diluição: 1/100 para a quimotripsina e 1/1000 para a tripsina. 1 µL da protease diluída, 0,5 µL da proteína de interesse e 0,5 µL da solução dos kits de cristalização foram misturados na plataforma superior das placas de gota sentada (secção 3.5.1) para gerar as condições de cristalização. As placas de cristalização estiveram armazenadas em duas temperaturas diferentes, umas a temperatura ambiente enquanto as outras foram incubadas a temperatura ambiente por um período de 6 horas e logo depois transferidas à 18 °C (Dong, Xu, & Edward, 2007).

O segundo protocolo de proteólise se fundamenta em permitir que a protease corte a proteína antes da sua cristalização para identificar o fragmento mais estável gerado. Por

isso, o primeiro passo foi fazer um teste de proteólise variando as concentrações das proteases assim como a temperatura de reação, utilizando diluições seriadas de 1/10 até 1/100000 das duas proteases no mesmo tampão de purificação da proteína de interesse. O volume final de reação foi de 20 µL e esteve composto por 10 µL da proteína de interesse, 1 µL da diluição da protease, 2 µL de CaCl₂ 100 mM e 7 µL do tampão no qual estava a proteína de interesse. As reações foram feitas a 30 °C e 37 °C, por 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos e 120 minutos, para depois interromper as reações pela adição de 5 µL do tampão de amostra Coomassie-SDS, seguida da incubação durante 5 minutos à 94 °C (Wernimont & Edwards, 2009).

Os produtos das reações foram analisados por gel de tricina 12 % SDS-PAGE (Schagger, 2006) e por western blot anti-His para determinar a condição que gerava um único fragmento e o possível sítio de corte da protease. Ao determinar a melhor condição de reação em função do fragmento mais estável, a reação de proteólise foi adaptada para utilizar um volume maior da proteína para ser digerido em dita condição e assim ter uma concentração proteica entre 3 e 10 mg/mL para os subsequentes testes de cristalização.

3.5.3 Técnica de sementeamento (seeding)

A técnica de sementeamento (seeding) permite separar o processo de nucleação do processo de crescimento do cristal graças a que são inseridos cristais, sementes de cristais ou outro nucleante na zona metaestável da proteína solúvel. Esta abordagem metodológica consegue gerar mais eventos de cristalização na solução da proteína devido a que ao introduzir um agente de nucleação aumenta a concentração local de macromoléculas e assim há aumento do tamanho do cristal (Russo Krauss, Merlino, Vergara, & Sica, 2013).

O método usado foi microseeding homólogo, ou seja, o agente de nucleação são microcristais que pertencem à mesma macromolécula de interesse e o processo consiste basicamente em quebrar um cristal com uma fibra e logo esse fio carregado de cristais fragmentados é passado por novas gotas contendo baixos níveis de supersaturação da proteína na solução de cristalização para assim gerar um aumento do tamanho do núcleo por favorecer o aumento das interações das moléculas de proteína solúvel a uma estrutura já formada. Portanto, as sementes guiam o processo de nucleação, a taxa de crescimento do cristal, os defeitos da estrutura e as características morfológicas. Por isso, se o crescimento do cristal é conduzido pela técnica de vapor de difusão, o crescimento é relativamente devagar e ordenado (Abskharon et al., 2011; D'Arcy, Mac Sweeney, & Haber,

2003; Gavira, 2016; McPherson & Cudney, 2014).

O protocolo usado foi adicionar em todos os reservatórios da placa de cristalografia a mesma solução de cristalização que em ensaios prévios gerou cristais e na plataforma superior 1 μL de Xac1918¹⁻⁴⁷³ 1 μL da solução de cristalização. Em seguida cristais crescidos da proteína Xac1918¹⁻⁴⁷³ na mesma condição de cristalização contida no reservatório dos poços foram quebrados com ajuda de um fio de bigode de gato, onde ficaram aderidos, para logo ser transferidos à plataforma superior dos poços da placa nova. As placas foram fechadas com plástico aderente e incubadas à 18 °C (Thaller et al., 1981).

3.5.4 Coleta e processamento dos dados de difração de raios X.

A resolução da estrutura de uma proteína por difração de raios X pode ter duas abordagens para resolver o problema das fases. Uma delas é a substituição molecular, na qual uma proteína homóloga, de estrutura conhecida, é usada para determinar a orientação e a posição dos eixos de operação de simetria não-cristalográfica, para determinar um conjunto inicial de fases. As fases iniciais são usadas para obter um mapa de densidade eletrônica e podem ser refinadas usando qualquer simetria não cristalográfica disponível, modificando a densidade ou com um achatamento do solvente. Logo o modelo da proteína homóloga é rotacionado e transladado ao longo da unidade assimétrica para obter o melhor ajuste possível entre os fatores de estrutura calculados a partir do modelo (F_c), e os fatores de estrutura coletados experimentalmente (F_o) a partir dos dados da proteína de estrutura desconhecida, para se obter o modelo final (B, 2010; Rossmann, 1990).

O mapa de densidade de uma macromolécula também pode ser construído empregando o sinal anômalo dos metais pesados, como o selênio ($Z = 34$), incorporado previamente na molécula de estrutura desconhecida que formou o cristal. O processo para a construção do modelo inicial envolve uma estimativa da fase cristalográfica, que é calculada empregando o sinal anômalo para determinar a posição dos átomos pesados, e depois construir uma densidade eletrônica experimental inicial, a partir dessas fases determinadas e dos dados de difração dos raios X. Posteriormente características próprias da densidade eletrônica são delimitadas na densidade eletrônica experimental para melhorar sua qualidade, gerando um mapa modificado de densidade, para logo depois combinar com o mapa inicial de densidade eletrônica experimental em combinação de fases. O resultado desta combinação é que a densidade eletrônica gerada é usada para construir e refinar iterativamente o modelo da macromolécula de interesse (Skubak & Pannu, 2013; Taylor, 2010).

Os cristais de Xac0573⁴⁹⁻²³², com selênio incorporado, foram submetidos a um feixe de raios X na linha MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas – SP), com um comprimento de onda de 0,979 (Å). Ao todo, foram coletadas 682 imagens com um espaçamento angular de 0,2 °. Devido à ausência de modelos com mais de 20 % de identidade com Xac0573, o método escolhido para a estimação inicial das fases que permitia sua resolução estrutural foi Se-SAD. A posição do único selênio na unidade assimétrica foi encontrada pelo programa HKL2MAP (Pape & Schneider, 2004), e com a determinação das fases foi usado Parrot (Cowtan, 2010) para melhorá-las através da diminuição da contribuição do solvente. A partir dessas fases, foi utilizado o Buccaneer (Cowtan, 2006) para traçar a cadeia principal do modelo, ao identificar e conectar a posição dos carbonos alfa (Skubak & Pannu, 2013). Esse modelo inicial de Xac0573⁴⁹⁻²³² obtido foi refinado por ciclos iterativos de COOT (Emsley & Cowtan, 2004) e PHENIX (Adams et al., 2002).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Clonagens dos genes *xac1918*, *xac1917*, *xac0574* e *xac0573*

As sequências primárias das quatro proteínas em estudo, as X-Tfes *Xac1918* e *Xac0574* e as X-Tfis *Xac1917* e *Xac0573*, foram analisadas inicialmente com os programas Pfam (Finn et al., 2016), Phery 2 (Kelley, Mezulis, Yates, Wass, & Sternberg, 2015) e PSIPRED (Buchan et al., 2013) para obter uma predição da sua estrutura secundária e a possível identificação de domínios conhecidos ou conservados. Baseado nestas análises dos programas, foram desenhados os oligonucleotídeos para amplificar regiões codificadoras de fragmentos das proteínas com uma provável estrutura estável e solúvel. Estes fragmentos não incluíram as sequências que codificam os domínios XVIPCD dos efetores *Xac0574* e *Xac1918*, e as sequências sinais associadas à membrana (lipobox) dos inibidores *Xac0573* e *Xac1917* como mostra a Figura 15, Figura 16 e tabela 7.

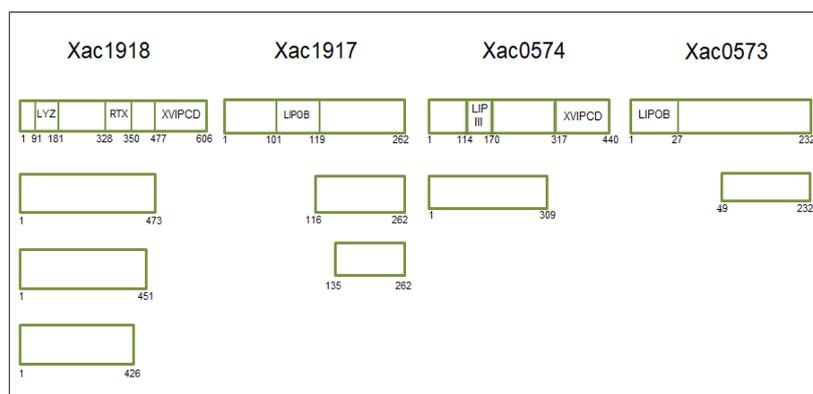


Figura 15. Esquema representativo das construções dos efetores *Xac0574* e *Xac1918* com seus possíveis inibidores *Xac0573* e *Xac1917* respetivamente. A primeira linha da figura é a representação de cada proteína completa. Em baixo, estão as representações das construções feitas, indicando o início e fim de cada uma com o número do resíduo correspondente. XVIPCD: Xanthomonas VirD4 Interacting Proteins Conserved Domain. LIPOB: Sequência consenso do lipobox. LYZ: Possível motivo conservado de lisozima. RTX: Repeats in toxin. Domínio LIPIII: Domínio conservado de lipase tipo três.

Tabela 7. Porcentagens calculadas de Hélice α , Folha β e regiões desenoveladas das proteínas *Xac1917*, *Xac1918*, *Xac0573* e *Xac0574*, utilizado o programa Phyre 2 (Kelley et al., 2015).

Proteína	% Hélice α	% Folha β	% Regiões Desenovelada
<i>Xac1918</i> ¹⁻⁶⁰⁶	14	32	16
<i>Xac1918</i> ^{His 1-473}	8	43	14
<i>Xac1917</i> ¹⁻²⁶²	32	25	42
<i>Xac1917</i> ^{His 136-262}	20	38	36
<i>Xac0574</i> ¹⁻⁴⁴⁰	43	14	25
<i>Xac0574</i> ^{His 1-309}	36	16	21
<i>Xac0573</i> ¹⁻²³²	12	37	36
<i>Xac0573</i> ^{His 49-232}	5	48	39

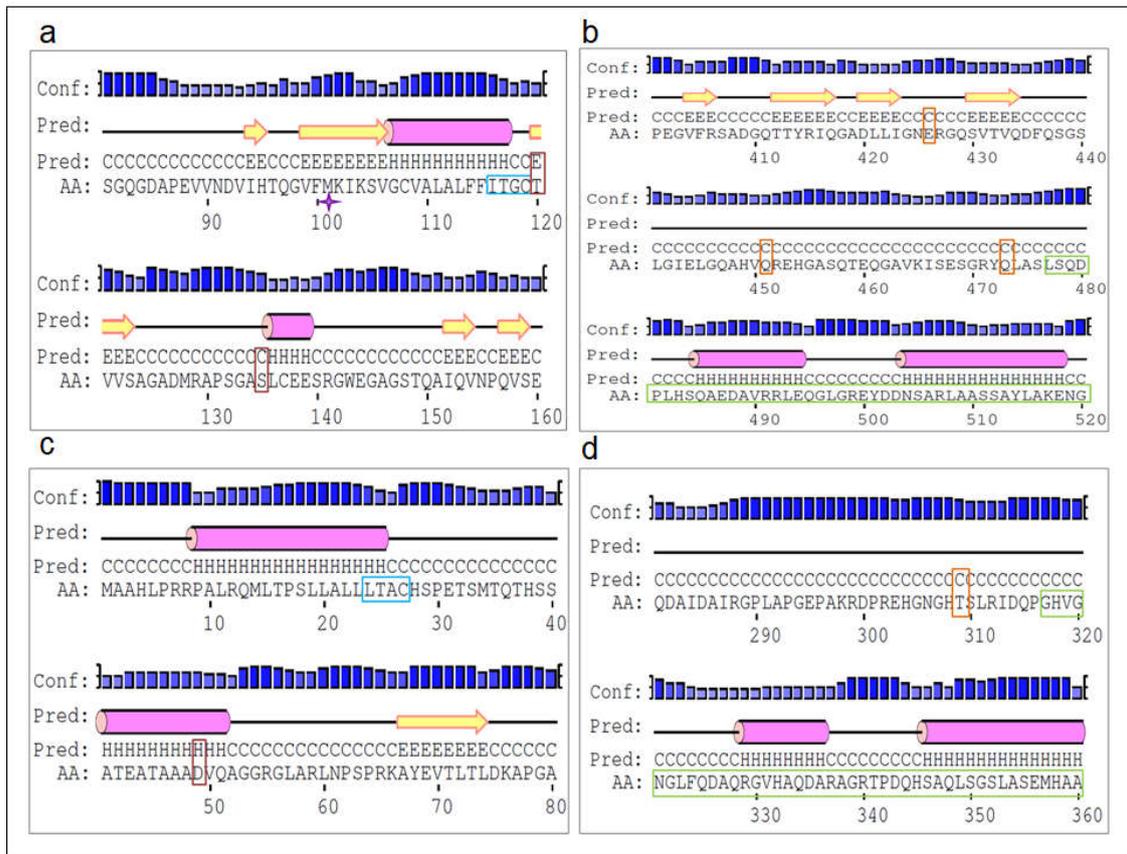


Figura 16. Representação da estrutura secundária dos trechos próximos aos domínios XVIPCD e as sequência de lipobox para o desenho das construções das proteínas Xac1917, Xac1918, Xac0573 e Xac0574. A análise e representação da estrutura secundária foram feitas no programa PSIPRED (Buchan, Minnici, Nugent, Bryson, & Jones, 2013). a) Representação dos resíduos 81 até 160 da proteína Xac1917, a estrela indica a provável metionina de iniciação (Souza et al., 2015). b) Representação dos resíduos 401 até 520 da proteína Xac1918. c) Representação dos resíduos 1 até 80 da proteína Xac0573. d) Representação dos resíduos 281 até 360 da proteína Xac0574. Na caixa azul está ressaltado a sequência correspondente ao lipobox para X-Tfis Xac1917 e Xac0573. Na caixa verde está ressaltado a sequência correspondente ao início do domínio XVIPCD nos X-Tfis Xac1918 e Xac0574. Nas caixas vermelhas estão os aminoácidos de início de cada construção dos X-Tfis. Nas caixas laranja o aminoácido do final de cada construção dos X-Tfis.

Os oligonucleotídeos foram desenhados para amplificar por PCR e clonar as sequências codificadoras dos seguintes fragmentos proteicos: Xac1918¹⁻⁴²⁶, Xac1918¹⁻⁴⁵¹, Xac1918¹⁻⁴⁷³, Xac1917¹²⁰⁻²⁶², Xac1917¹³⁵⁻²⁶², Xac0574¹⁻³⁰⁹ e Xac0573⁴⁹⁻²³². Os fragmentos amplificados foram clonados no vetor de expressão pET28a gerando as seguintes construções com cauda de poli histidina no N-terminal: Xac1918^{His 1-426}, Xac1918^{His 1-451}, Xac1918^{His 1-473}, Xac1917^{His 135-262}, Xac1917^{His 120-262}, Xac0574^{His 1-309} e Xac0573^{His 49-232}. Além disso, Xac1918¹⁻⁴⁷³ foi clonada em pET3a e 0574¹⁻³⁰⁹ em pET11a.

As construções finais das proteínas em estudo com seus respectivos vetores estão listadas na tabela 8.

Tabela 8. Construções finais de cada proteína efetora (X-Tfe) e de imunidade (X-Tfi) nos vetores de expressão.

Proteína	Aminoácidos Envolvidos	His Tag no N-terminal	Vetor de expressão	Marca de resistência
Xac1918	1-473	Sim	pET28a	Canamicina
Xac1918	1-473	Não	pET3a	Ampicilina
Xac1918	1-451	Sim	pET28a	Canamicina
Xac1918	1-426	Sim	pET28a	Canamicina
Xac1917	120- 262	Sim	pET28a	Canamicina
Xac1917	135- 262	Sim	pET28a	Canamicina
Xac1917	135- 262	Não	pET11a	Ampicilina
Xac0574	1-309	Sim	pET28a	Canamicina
Xac0574	1-309	Não	pET11a	Ampicilina
Xac0573	49-232	Sim	pET28a	Canamicina

4.2 Expressão das proteínas heterólogas em *E. coli*

4.2.1 Expressão das proteínas Xac1918¹⁻⁴⁷³, Xac0574¹⁻³⁰⁹ e Xac0573⁴⁹⁻²³²

Inicialmente foram otimizadas as condições de expressão heterólogas das proteínas Xac1918^{His 1-473}, Xac0574^{His 1-309} e Xac0573^{His 49-232}. A melhor condição de produção seguindo o protocolo descrito na metodologia para as proteínas Xac1918^{His 1-473} e Xac0573^{His 49-232} foi na cepa *E. coli* BL21(DE3) no meio 2XTY com as concentrações finais de 100 µg/mL de canamicina e 0,3 mM de IPTG, sendo induzida a produção da proteína a 18 °C durante 16 horas. A construção Xac0574¹⁻³⁰⁹ foi produzida na cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS no meio 2XTY contendo uma concentração final de 100 µg/mL de canamicina e 50 µg/mL de cloranfenicol no caso da construção em pET28a e 100 µg/mL de ampicilina e 50 µg/mL de cloranfenicol para a construção em pET11a. As duas construções de Xac0574 foram induzidas com uma concentração final de 0,3 mM de IPTG a 18 °C por 16 horas.

4.2.2 Expressão da proteína Xac1917¹³⁵⁻²⁶²

O teste de expressão de Xac1917^{His 135-262} em *E. coli* BL21(DE3) mostrou que a proteína foi induzida e possui o tamanho teórico esperado (17 KDa) assim como uma sobre-expressão significativa em todas as temperaturas e nas diferentes variações da concentração do IPTG. Infelizmente, a proteína induzida ficou insolúvel, obtendo o mesmo resultado com as outras cepas de expressão de *E. coli* que foram testadas. Portanto, foi necessário procurar outras metodologias para tentar obter a proteína solúvel. Uma das

estratégias foi modificar o tampão de lise tendo como parâmetros principais a variação do pH, aumento da concentração de NaCl e a adição de diferentes concentrações de glicerol devido a sua propriedade de osmólito. A primeira série de tampões esteve composta por 50 mM de Tris HCl pH 8, 500 mM NaCl, 5 mM imidazol, 25 % (p/v) sacarose e tendo como variação a concentração de glicerol (v/v) de 0 %, 5 %, 7,5 % e 10 %, enquanto que a segunda série de tampões manteve a mesma concentração de NaCl, imidazol, sacarose e os porcentagens de glicerol, mas a solução ficou em um pH 7,0. Em nenhuma das condições testadas a proteína foi solúvel (Figura 17).

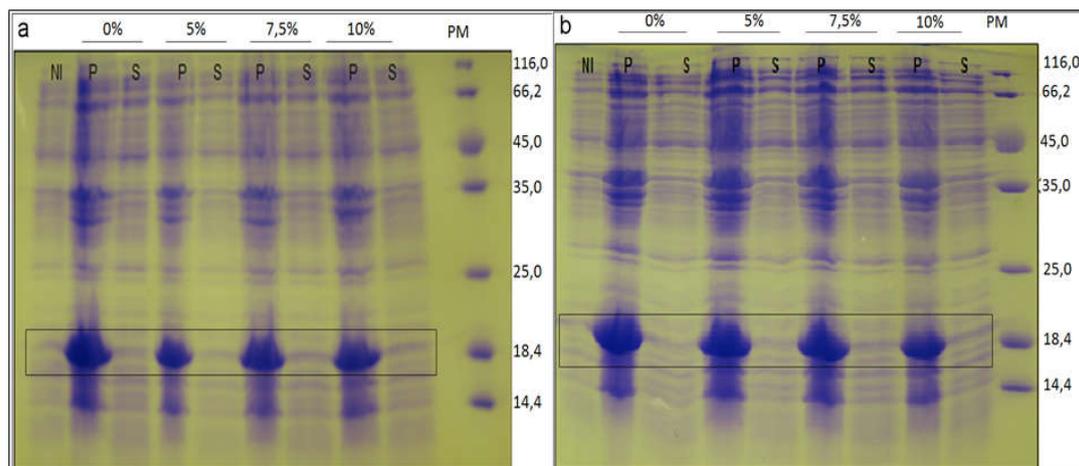


Figura 17. Teste de solubilidade de Xac1917^{His 135-262} após expressão na cepa *E.coli* BL21(DE3). a) Tampão 1: 50 mM Tris pH 7,0, 500 mM NaCl, 5 mM imidazol, sacarose ao 25 % (p/v), variando a concentração de glicerol (v/v) em 0 %, 5 %, 7,5 % e 10 %. b) Tampão 2: 50 mM Tris pH 8,0, 500 mM NaCl, 5 mM imidazol, sacarose ao 25 % (p/v), variando a concentração de glicerol (v/v) em 0 %, 5 %, 7,5 % e 10 %. NI: Não induzido. P: Material insolúvel. S: Sobrenadante. PM: Padrão de peso molecular.

Em seguida, foram exploradas tentativas de auxiliar o enovelamento de Xac1917 através da co-expressão com chaperonas. A primeira abordagem foi transformar a cepa *E. coli* BL21(DE3)Arctic com a construção de interesse, já que dita cepa foi modificada por engenharia genética para expressar as chaperonas, Cpn10 e Cpn60 da bactéria *Oleispira antarctica*. Estas proteínas têm um 74 % e 54 % de identidade respectivamente com as chaperonas GroEL e GroES, com a vantagem que elas podem ajudar no enovelamento das proteínas em temperaturas baixas (Ferrer, Chernikova, Yakimov, Golyshin, & Timmis, 2003). Outra abordagem foi co-expressar a Xac1917¹³⁵⁻²⁶² pET28a com a proteína Thioredoxina Redutase (TR) que estava previamente clonada no vetor pET11a. A sequência de aminoácidos de Xac1917 possui quatro cisteínas que podem formar ligações de dissulfeto, portanto, a enzima TR pode ajudar na formação correta destas ligações durante o enovelamento, dando maior estabilidade a Xac1917 e facilitando a sua solubilidade (Overton, 2014; Singha et al., 2017). Infelizmente estas duas abordagens descritas não

forneceram a Xac1917 solúvel como mostra as Figura 18 e Figura 19.

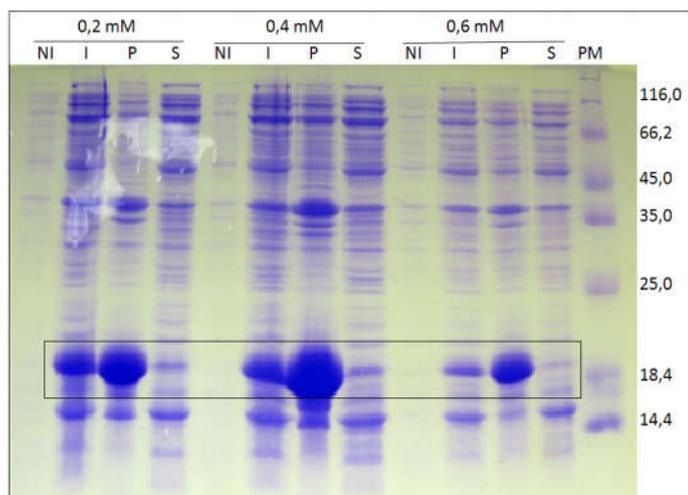


Figura 18. Teste de expressão e solubilidade de Xac1917^{His 135-262} em *E. coli* BL21(DE3) Arctic. NI: Não induzido. I: Induzido. P: Material insolúvel. S: Sobrenadante. 0.2 mM: 0.2 mM IPTG. 0.4 mM: 0.4 mM IPTG. 0.6 mM: 0.6 mM IPTG. PM: Padrão de peso molecular.

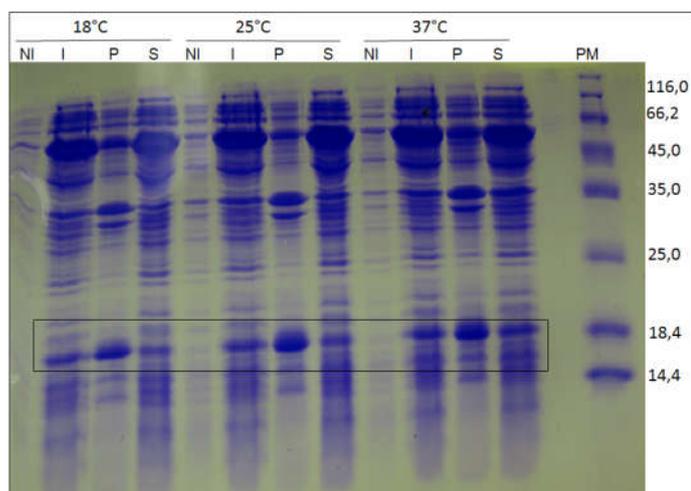


Figura 19. Teste de co-expressão de Xac1917^{His 135-262} e Thioredoxina redutase em *E. coli* BL21(DE3) com 0.4 mM IPTG. NI: Não induzido. I: Induzido. P: Material insolúvel. S: Sobrenadante. PM: Padrão de peso molecular.

A última abordagem para tentar obter Xac1917 em uma forma solúvel foi fazer novas construções de Xac1918 e Xac1917. Na construção de Xac1917¹³⁵⁻²⁶², o aminoácido 135 corresponde ao aminoácido imediatamente anterior do começo de uma pequena hélice α que é seguida por uma região desestruturada de 11 aminoácidos segundo as análises feitas de estrutura secundária pelos programas bioinformáticos, o qual pode não estar favorecendo a estabilidade da proteína. Por isso, no caso da nova construção Xac1917¹²⁰⁻²⁶², o aminoácido 120 está imediatamente depois do “lipobox” que dá início a uma folha β ,

segundo a previsão de estrutura secundária apresentada na Figura 16. No caso de Xac1918, a construção foi transferida ao vetor pET3a para poder ser usada depois em uma co-expressão com o clone Xac1917 pET28a. Dessas novas construções só foram produzidos os diferentes clones. As condições de expressão testadas para cada uma das proteínas e suas co-expressões estão listadas na tabela 9, ressaltando aquelas que ficaram solúveis para logo ser empregadas em outros estudos.

Tabela 9. Condições de expressão das proteínas em estudo na cepa *E. coli*. TR: Thioredoxina Redutase pET11a. NT: Proteína não testada para a determinação das condições de expressão.

Proteína (s)	Cepa de <i>E. coli</i>	Temperatura de indução (°C)	[IPTG] (mM)	Solúvel	Meio
Xac1918 ¹⁻⁴⁷³	<i>BL21(DE3)</i>	18	0,3	Sim	2XTY
Xac0573 ⁴⁹⁻²³²	<i>BL21(DE3)</i>	18	0,3	Sim	2XTY
Xac0574 ¹⁻³⁰⁹	<i>BL21(DE3)pLysS</i>	18	0,3	Sim	2XTY
Xac1918 ¹⁻⁴⁷³	<i>BL21(DE3)RIL</i>	18	0,3	Sim	M9
Xac0573 ⁴⁹⁻²³²	<i>BL21(DE3)RIL</i>	18	0,3	Sim	M9
Xac0574 ¹⁻³⁰⁹	<i>BL21(DE3)RP</i>	18	0,3	Sim	M9
Xac1917 ¹³⁵⁻²⁶²	<i>BL21(DE3)</i>	18, 25, 30, 37	0,2/0,4/0,6	Não	2XTY
Xac1917 ¹³⁵⁻²⁶²	<i>BL21(DE3)pLysS</i>	18, 25, 30, 37	0,2/0,4/0,6	Não	2XTY
Xac1917 ¹³⁵⁻²⁶²	<i>BL21(DE3)RIL</i>	18, 25, 30, 37	0,2/0,4/0,6	Não	2XTY
Xac1917 ¹³⁵⁻²⁶²	<i>BL21(DE3)RP</i>	18, 25, 30, 37	0,2/0,4/0,6	Não	2XTY
Xac1917 ¹³⁵⁻²⁶²	<i>BL21(DE3)C43</i>	18, 25, 30, 37	0,2/0,4/0,6	Não	2XTY
Xac1917 ¹³⁵⁻²⁶²	<i>BL21(DE3)C41</i>	18, 25, 30, 37	0,2/0,4/0,6	Não	2XTY
Xac1917 ¹³⁵⁻²⁶²	<i>(DE3)Arctic</i>	18, 25, 30, 37	0,2/0,4/0,6	Não	2XTY
Xac1917 ¹³⁵⁻²⁶²	<i>BL21(DE3)Star</i>	18, 25, 30, 37	0,2/0,4/0,6	Não	2XTY
Xac1917 ¹³⁵⁻²⁶² /TR	<i>BL21(DE3)</i>	18, 25, 30, 37	0,2/0,4/0,6	Não	2XTY
Xac1917 ¹²⁰⁻²⁶²	-	-	-	NT	-
Xac1917 ¹³⁵⁻²⁶² /Xac1918 ¹⁻⁴⁷³	-	-	-	NT	-
Xac1917 ¹²⁰⁻²⁶² /Xac1918 ¹⁻⁴⁷³	-	-	-	NT	-

4.3 Purificação das proteínas Xac1918^{His 1-473}, Xac0574^{His 1-309} e Xac0573^{His 49-232}

As proteínas Xac1918^{His 1-473}, Xac0574^{His 1-309} e Xac0573^{His 49-232} foram expressadas em forma solúvel em *E. coli* e purificadas como foi descrito nos Materiais e Métodos. Os graus de pureza obtidos nas diferentes etapas de purificação podem ser avaliados nas Figura 20, Figura 21 e Figura 22.

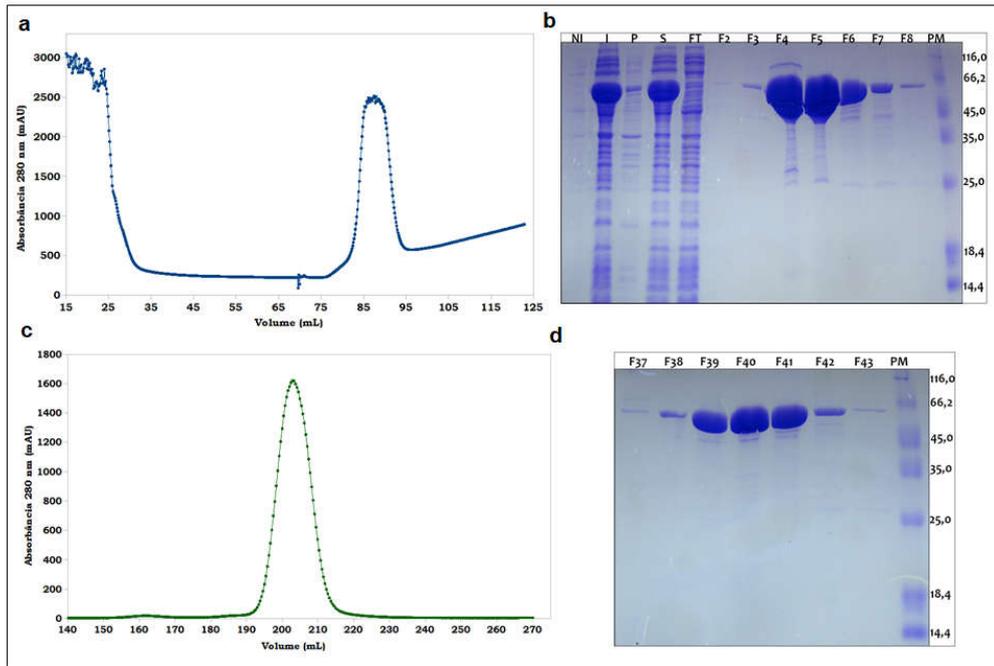


Figura 20. Etapas de purificação de Xac1918^{His 1-473}. a) Cromatograma da cromatografia de afinidade no comprimento de onda de 280nm. b) SDS-PAGE das frações da cromatografia de afinidade. c) Cromatograma da cromatografia de exclusão molecular no comprimento de onda de 280 nm. d) SDS-PAGE das frações da cromatografia de exclusão molecular. NI: Não induzido, I: Induzido, P: Material insolúvel, S: Sobrenadante, FT: Flow through, LAV: Lavado, F: Frações. PM: Padrão de massa molecular.

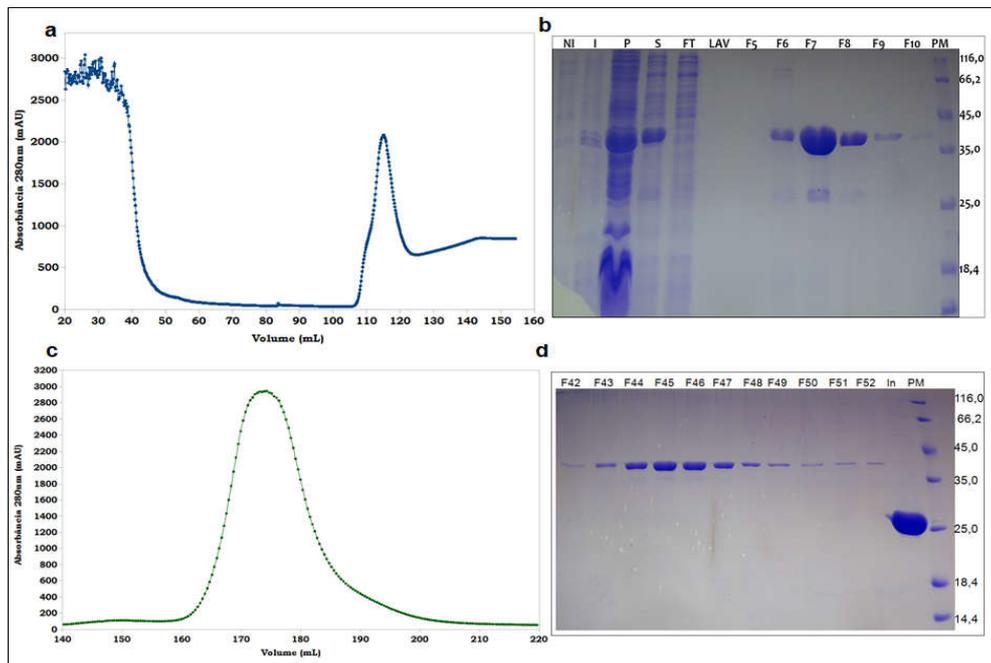


Figura 21. Etapas de purificação de Xac0574^{His 1-309}. a) Cromatograma da cromatografia de afinidade no comprimento de onda de 280 nm. b) SDS-PAGE das frações da cromatografia de afinidade. c) Cromatograma da cromatografia de exclusão molecular no comprimento de onda de 280 nm. d) SDS-PAGE das frações da cromatografia de exclusão molecular. NI: Não induzido, I: Induzido, P: Material insolúvel, S: Sobrenadante, FT: Flow through, LAV: Lavado, F: Frações, In: inibidor Xac0573. PM: Padrão de massa molecular.

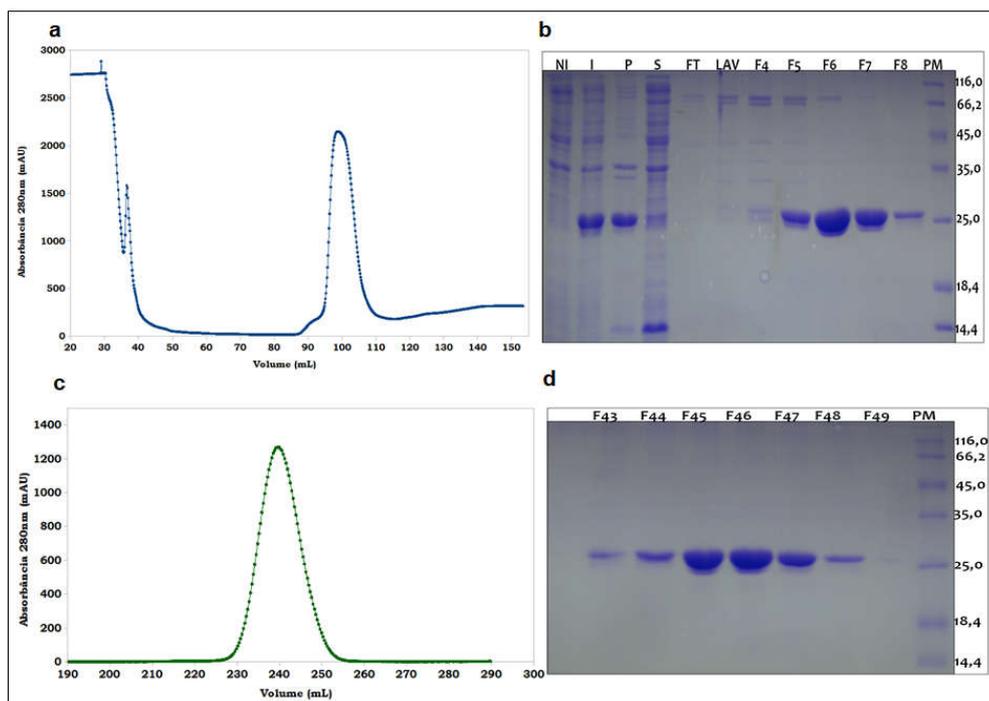


Figura 22. Etapas de purificação de Xac0573^{His 49-232}. a) Cromatograma da cromatografia de afinidade no comprimento de onda de 280 nm. b) SDS-PAGE das frações da cromatografia de afinidade. c) Cromatograma da cromatografia de exclusão molecular no comprimento de onda de 280 nm. d) SDS-PAGE das frações da cromatografia de exclusão molecular. NI: Não induzido, I: Induzido, P: Material insolúvel, S: Sobrenadante, FT: Flow through, LAV: Lavado, F: Frações. PM: Padrão de massa molecular.

4.4 Estudos de interação das proteínas Xac0574^{His 1-309} e Xac0573^{His 49-232}

Antes dos estudos apresentados nesta tese, as funções das proteínas Xac0574 e Xac0573 não eram conhecidas, sendo classificadas até o momento como proteínas hipotéticas. A hipótese inicial proposta por (Souza et al., 2015) sobre a sua função como par efetor-inibidor associado ao T4SS devia ser comprovada. Por isso, foram desenvolvidos diferentes ensaios para avaliar as hipóteses: i) Se Xac0574 e Xac0573 têm a capacidade de interagir entre elas, ii) se Xac0574 tem atividade lipase e iii) se Xac0573 funciona como inibidor da atividade lipase de Xac0574.

4.4.1 Estudos de dicroísmo circular (CD)

A técnica espectroscópica de dicroísmo circular é amplamente utilizada como a primeira ferramenta para ter uma estimativa da presença dos motivos da estrutura secundária do tipo hélice α , folha β e regiões desenoveladas das proteínas em solução (Greenfield, 2006). Portanto, a técnica também poderia indicar se há alguma mudança significativa na estrutura secundária no momento que duas proteínas interagem formando

um complexo. Os elementos de estrutura secundária têm distintos espectros de CD, uma hélice α possui bandas com elipticidade negativas entre 222 e 208 nm e uma banda com elipticidade positiva em 193 nm, enquanto a folha β está descrita por uma banda negativa em 218 nm e uma banda positiva em 195 nm, e por último, os trechos desenovelados mostram uma banda positiva sutil acima de 210 nm e uma banda negativa perto dos 195 nm (Greenfield, 2006). É importante lembrar que os espectros de CD possuem certas restrições na hora de fazer a sua interpretação devido à escassez na quantidade de alguns tipos de estruturas secundárias, já que aquelas estruturas em menor proporção ficam sub-representadas nos conjuntos de elementos estruturais de referência como são as hélices α , as folhas β e os trechos desenovelados, o que ocasiona no final que seja mudado os padrões característicos dos elementos estruturais principais (Clarke, 2012).

Os espectros de Xac0573^{His 49-232} e Xac0574^{His 1-309} mostram que as duas proteínas são enoveladas, com trechos desenovelados e com uma predominância de folha β , especialmente para Xac0573. No espectro de Xac0574 também é possível perceber que têm uma região de hélice α (Figura 23). No caso do complexo, o espectro gerado das medições da mistura equimolar e o espectro teórico obtido a partir das medições individuais das proteínas são muito similares o que indica que não há grandes mudanças conformacionais na estrutura secundária induzida pela interação. O perfil do complexo é bem parecido com o perfil de Xac0574 sozinha, mas há algumas mudanças na magnitude das bandas que talvez sejam por causa da interação das duas proteínas (Figura 23).

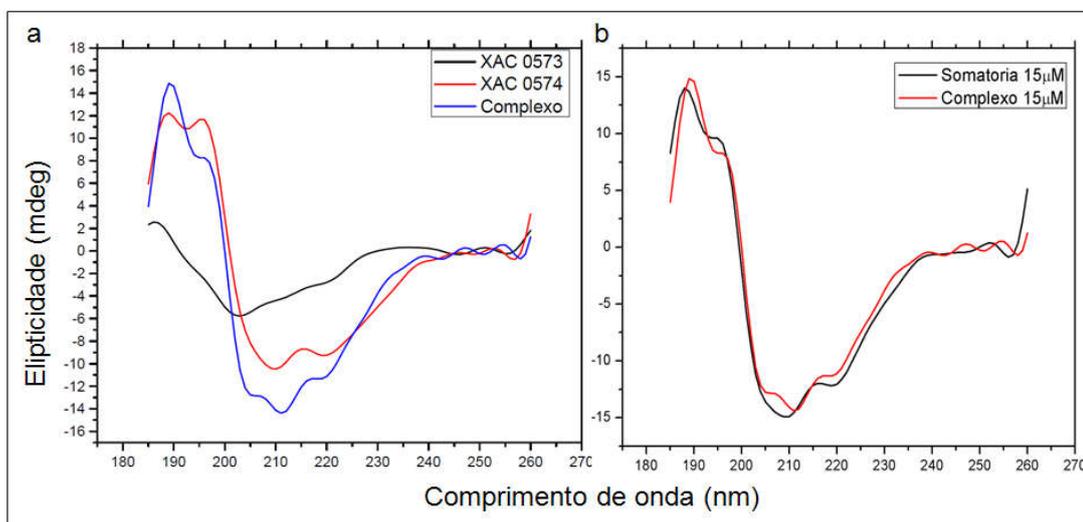


Figura 23. Espectros de dicroísmo circular das proteínas Xac0573^{His 49-232}, Xac0574^{His 1-309} e o complexo formado entre elas. A concentração das proteínas para os ensaios foi 15 μ M, usando como unidades MRE (elipticidade média por resíduo) em função do comprimento de onda. a) Sobreposição dos espectros Xac0573^{His 49-232}, Xac0574^{His 1-309} e o complexo. b) Sobreposição do espectro gerado pelas medições do complexo (vermelho) e do espectro teórico (preto).

Com a finalidade de ter uma melhor noção das proporções de hélice α , folha β e dos trechos desenovelados das proteínas individuais e ao formar o complexo para visualizar melhor alguma mudança significativa na interação das proteínas, os dados foram processados por dois softwares diferentes, K2D3 (Louis-Jeune et al., 2012) e Bestsel (Micsonai et al., 2015). Em K2D3 as porcentagens são geradas unicamente em função de hélice α e folha β , enquanto, Bestsel gera porcentagens de hélice α , folha β , voltas e outras conformações como mostra a tabela 10.

Tabela 10. Porcentagens das proteínas Xac0573^{His 49-232}, Xac0574^{His 1-309} e o complexo formado entre elas processado nos softwares K2D3 e Bestsel. (*) Medição experimental.

Proteína (s) 15 μ M	K2D3	Bestsel
Xac0574 ^{His 1-309}	Hélice α : 1,4% Folha β : 41,37%	Hélice α : 6,8% Folha β antiparalela: 37,9% Volta: 13,0% Outras: 42,2%
Xac0573 ^{His 49-232}	Hélice α : 1,77% Folha β : 40,58%	Hélice α : 0% Folha β antiparalela: 43,2% Volta: 13,2% Outras: 43,6%
(*)Xac0574 ^{His 1-309} e Xac0573 ^{His 49-232}	Hélice α : 2,08% Folha β : 32,92%	Hélice α : 0% Folha β antiparalela: 44,6% Volta: 13,2% Outras: 42,2%

O processamento dos dados experimentais feito pelos dois programas gerou predições muito similares com uma notável porcentagem de folha β para as duas proteínas. Isso é consistente com as predições prévias dos programas bioinformáticos Phyre 2 (Kelley et al., 2015) e PSIPRED (Buchan et al., 2013) baseados na análise de sequências proteicas como foi resumido anteriormente na Tabela 7. Porém, as porcentagens determinadas para Xac0574 diferem bastante da primeira análise, sendo que K2D3 está gerando porcentagens muito similares em todos os elementos estruturais para Xac0574 e Xac0573 apesar do fato que as duas proteínas produzem espectros muito diferentes, situação que não acontece com o software Bestsel. As porcentagens do complexo estabelecidas por K2D3 e Bestsel expõem umas mudanças muito tênues nos elementos estruturais em comparação com as porcentagens das proteínas sozinhas, o que tem correlação com o espectro gerado da medição do complexo, reafirmando que não houve mudanças significativas na estrutura secundária das proteínas devido a sua interação.

4.4.2 Estudos de interação por cromatografia de exclusão molecular

Antes de caracterizar a possível interação de Xac0573⁴⁹⁻²³² e Xac0574¹⁻³⁰⁹, foi estudado o estado oligomérico de cada proteína em solução, já que essa característica é um fator determinante que delimita a interação entre duas proteínas para ter um equilíbrio termodinâmico. Inicialmente o método utilizado foi uma cromatografia de exclusão molecular analítica, a qual permite evidenciar as interações suficientemente fortes entre diferentes moléculas de proteína por persistir e manter-se juntas durante a separação cromatográfica em comparação com as interações que podem ter cada proteína por separado com a resina da coluna. As análises do estado oligomérico de Xac0573⁴⁹⁻²³² e Xac0574¹⁻³⁰⁹ foram realizadas com uma coluna analítica Superdex 200 10/300, e os resultados obtidos para Xac0573 mostram que, independentemente da concentração na faixa de 75 μ M e 300 μ M, a proteína migra com uma massa molecular aparente de 18 KDa que é muito próximo à massa molecular teórica de 20 KDa sem cauda de histidina (Figura 24). A injeção da proteína Xac0574 em uma faixa de concentração de 50 μ M até 100 μ M migra com uma massa molecular aparente de 39 KDa sendo que seu valor teórico é de 33 KDa sem cauda de histidina (Figura 25). Em consequência que as massas moleculares determinadas experimentalmente das duas proteínas são muito próximas aos valores teóricos é possível afirmar que as duas proteínas em solução são monômeros.

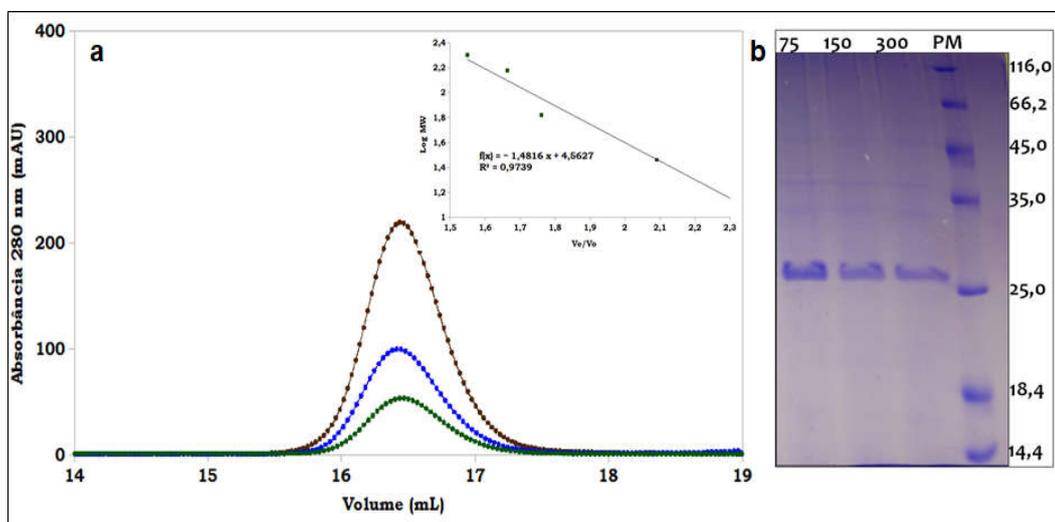


Figura 24. Determinação do estado oligomérico de Xac0573⁴⁹⁻²³² por cromatografia de exclusão molecular. Sobreposição dos cromatogramas obtidos a temperatura ambiente, no comprimento de onda de 280 nm, nas concentrações 75 μ M (verde), 150 μ M (azul) e 300 μ M (marrom) usando a coluna analítica Superdex 200 10/300. a) Calibração da coluna analítica Superdex 200 10/300. b) Gel SDS-PAGE das frações 17 nas diferentes concentrações avaliadas. PM: Padrão de massa molecular.

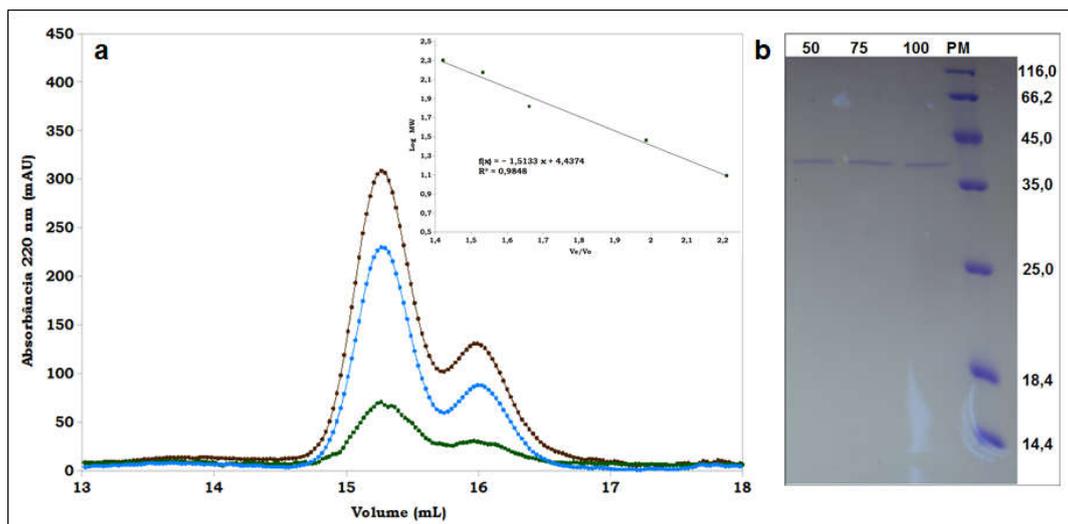


Figura 25. Determinação do estado oligomérico de Xac0574¹⁻³⁰⁹ por cromatografia de exclusão molecular. Sobreposição dos cromatogramas obtidos a 10 °C, no comprimento de onda de 220 nm, nas concentrações 50 μM (verde), 75 μM (azul claro) e 100 μM (marrom) usando a coluna analítica Superdex 200 10/300. a) Calibração da coluna analítica Superdex 200 10/300. b) Gel SDS-PAGE das frações 16 nas diferentes concentrações avaliadas. PM: Padrão de massa molecular.

Para avaliar a possível interação entre Xac0574 e Xac0573, as duas proteínas purificadas individualmente foram misturadas em uma proporção 1:1 e analisadas por cromatografia de exclusão molecular analítica. Os picos cromatográficos das proteínas individuais e da mistura equimolar delas foram sobrepostos para facilitar a identificação das mudanças no perfil de eluição, por isso foi identificado que a mistura equimolar elui em um volume menor em comparação com o volume de eluição das proteínas analisadas individualmente, que é característico para moléculas de uma massa molecular maior (Figura 26). O volume de eluição da mistura foi de 15,26 mL corresponde a uma massa molecular aparente de 49 KDa, consistente com a formação de um complexo com uma estequiometria 1:1 para o qual corresponde uma massa molecular teórica de 53 KDa.

Com a finalidade de confirmar as conclusões descritas anteriormente, duas misturas das proteínas foram feitas nas proporções 1:1,6 e 1:3 tendo um excesso do possível inibidor (Xac0573) nos dois casos. A sobreposição dos cromatogramas dos dois experimentos mostrou o mesmo volume de eluição para o complexo obtido na proporção 1:1, e o excesso do inibidor migra em um segundo pico bem diferenciado em um volume maior, permitindo deduzir que ainda com um excesso do inibidor a estequiometria do complexo continua sendo 1:1 (Figura 27)

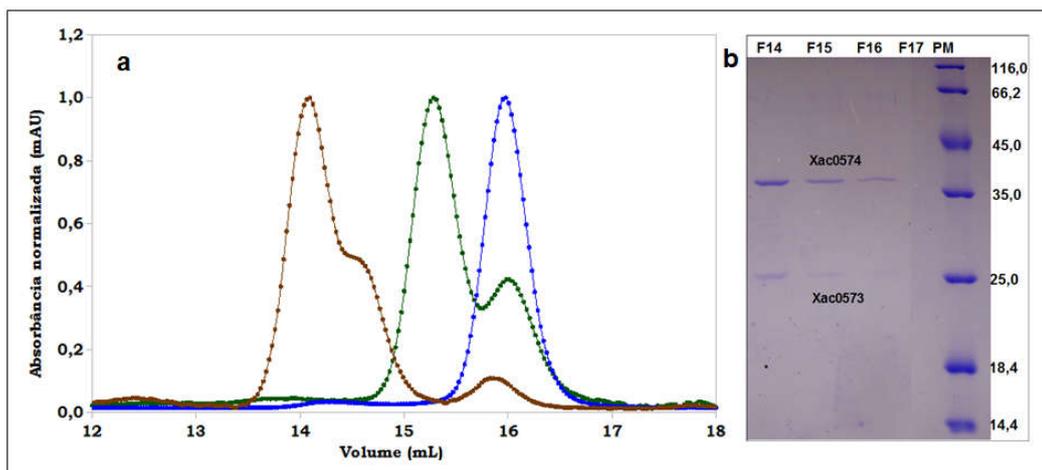


Figura 26. Determinação do estado oligomérico do complexo Xac0574¹⁻³⁰⁹ e Xac0573⁴⁹⁻²³² por cromatografia de exclusão molecular. a) Sobreposição dos cromatogramas com absorbância normalizada usando a coluna analítica Superdex 200 10/300 a 10 °C. Em marrom o complexo na proporção 1:1, em verde Xac0574¹⁻³⁰⁹ e em azul Xac0573⁴⁹⁻²³². b) Gel SDS-PAGE das frações do complexo na proporção 1:1.

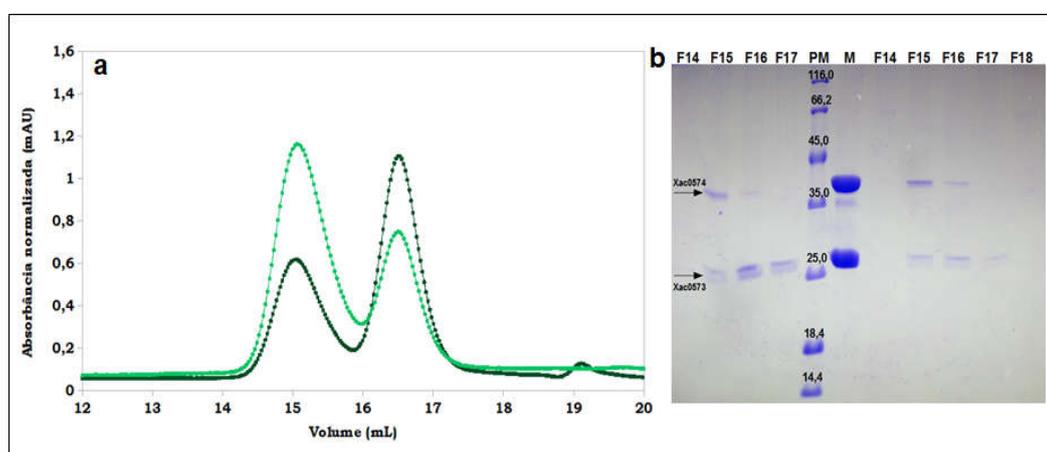


Figura 27. Efeito do aumento da concentração do inibidor na estequiometria do complexo Xac0574¹⁻³⁰⁹ e Xac0573⁴⁹⁻²³². a) Sobreposição dos cromatogramas com absorbância normalizada usando a coluna analítica Superdex 200 10/300 a temperatura ambiente. Em verde claro o complexo na proporção 1:1,6, e em verde escuro a proporção 1:3. b) Gel SDS-PAGE das frações de cada corrida analítica. As frações 14 até 17 da esquerda são da proporção 1:1,6 enquanto as frações 14 até 18 da direita são da relação 1:3. M é a mistura na proporção 1:3 antes de ser injetada no equipamento. PM: Padrão de massa molecular.

Os diferentes ensaios de cromatografia analítica demonstraram a formação do complexo Xac0574-Xac0573, porém nas condições experimentais desenvolvidas até o momento não foi avaliado se aquela interação era a suficientemente forte e específica para se manter na presença de outras proteínas. Para avaliar aquela hipótese, foi desenvolvida uma co-purificação tendo com primeira etapa uma cromatografia de afinidade em uma coluna carregada com níquel onde só Xac0574 tinha cauda de histidina. O resultado do experimento (Figura 28) mostra que a interação é muito forte e específica entre as duas proteínas, já que eluem juntas na cromatografia. Além disso, o complexo se mantém na etapa subsequente de purificação por cromatografia de exclusão molecular em uma coluna

preparativa, onde também foi possível identificar o excesso do inibidor (Xac0573) porque eluiu sozinho como um pico adicional depois do pico do complexo como se destaca na Figura 29 no cromatograma e no gel SDS-PAGE das frações coletadas. Em resumo, os experimentos de cromatografia de exclusão molecular e co-purificação demonstraram que Xac0574 e Xac0573 interagem formando um complexo binário suficientemente estável que permite a sua purificação.

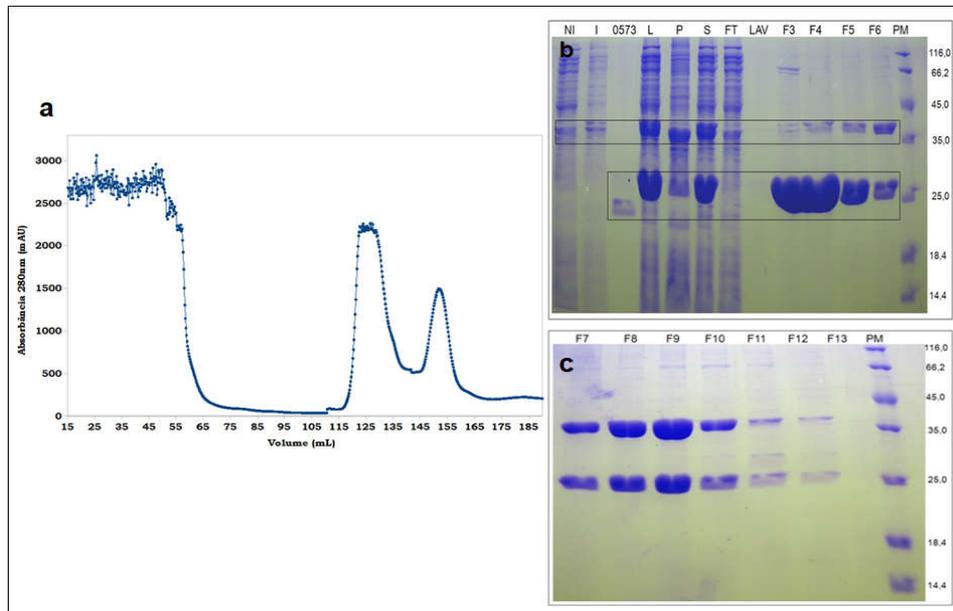


Figura 28. Purificação por cromatografia de afinidade do complexo Xac0574^{His 1-309}-Xac0573⁴⁹⁻²³². a) Cromatograma da cromatografia de afinidade com níquel, no comprimento de onda de 280 nm. b,c) SDS-PAGE das frações que aluam na cromatografia. NI: Não induzido, I: Induzido, 0573: Xac0573 purificada sem cauda, L: lisado de *E. coli* expressando Xac0574 e com a adição de Xac0573, P: Material insolúvel, S: Sobrenadante, FT: Flow through, LAV: Lavado, F: Frações. PM: Padrão de massa molecular.

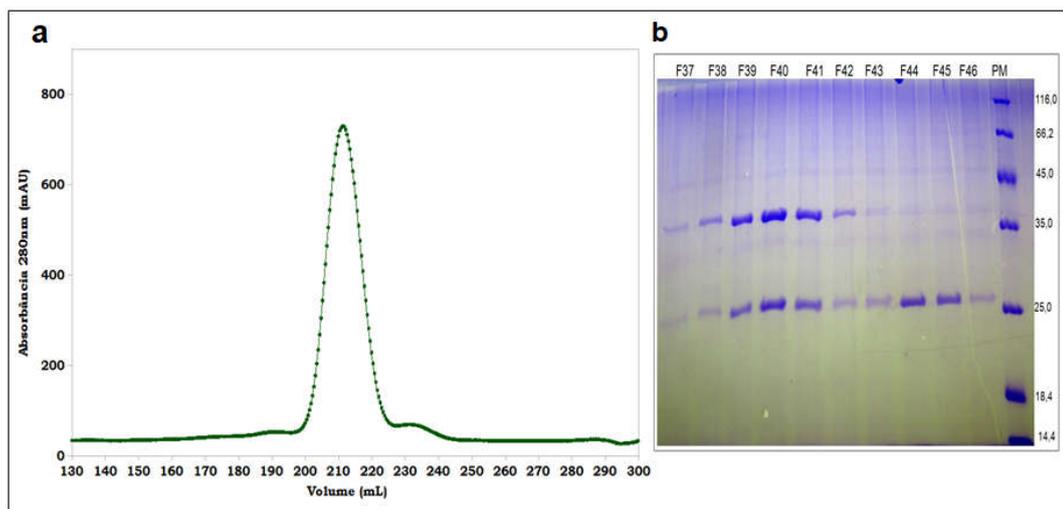


Figura 29. Purificação do complexo Xac0574^{His1-309}-Xac057⁴⁹⁻²³² por cromatografia de exclusão molecular em coluna preparativa. a) Cromatograma no comprimento de onda de 280 nm, obtido usando a coluna Superdex 200. b) Gel SDS-PAGE das frações 37 até 46 da cromatografia. PM: Padrão de massa molecular.

4.4.3 Estudo do estado oligomérico do complexo Xac0574^{His 1-309}- Xac0573^{His 49-232} por SEC-MALS

A metodologia de SEC-MALS faz referência a um experimento no qual uma cromatografia de exclusão molecular (SEC) é acoplada a um detector de dispersão de luz estática multi-ângulo que permite determinar as distribuições de massa molar e tamanho da amostra em estudo. A técnica está baseada no fato que a quantidade de espalhamento de luz de uma proteína em solução é diretamente proporcional ao produto da concentração da proteína e a sua massa molecular. A concentração da amostra é calculada simultaneamente medindo o índice de refração da solução assumindo que $dn/dc = 0,185 \text{ mL/g}$ (Wyatt, 1993; Zimm, 1948). As massas moleculares das proteínas Xac0574^{His1-309}, Xac0573^{His 49-232} e o complexo Xac0574^{His 1-309}- Xac0573^{His 49-232}, determinados por SEC-MALS foram 38,2 KDa, 22,8 KDa e 58,1 KDa respectivamente (Figura 30), confirmando que a estequiometria do complexo é 1:1 e, portanto, os resultados prévios da cromatografia analítica de exclusão molecular (tabela 11)

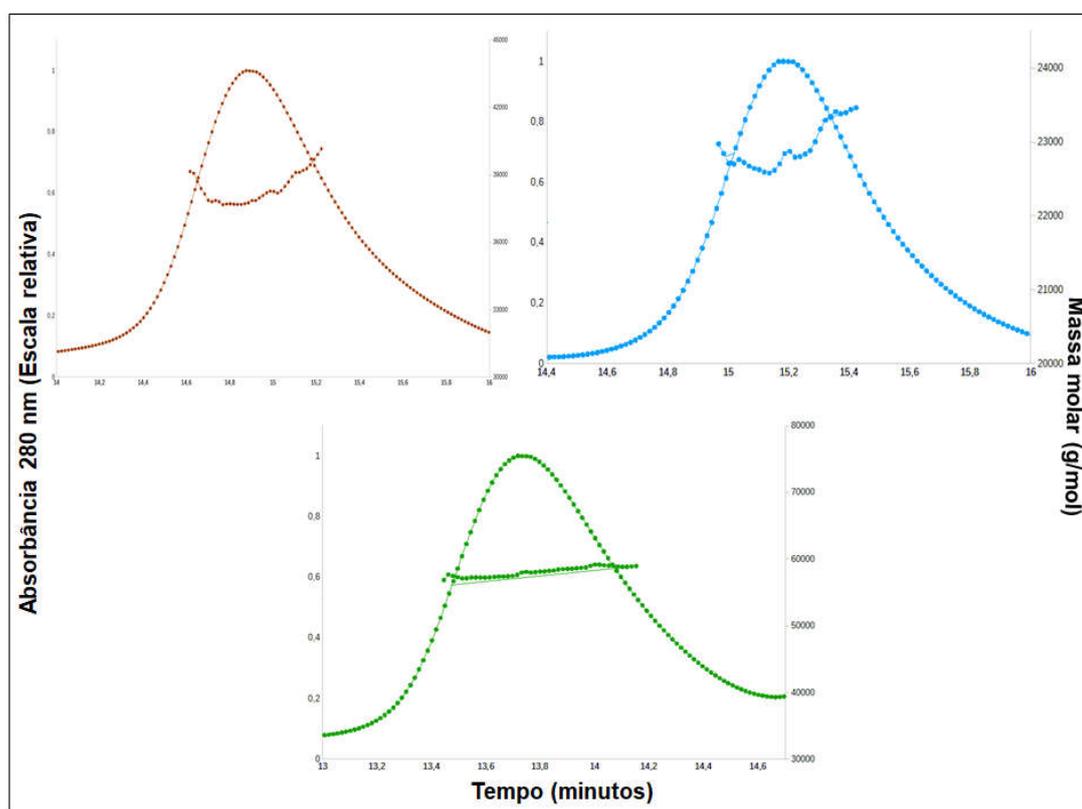


Figura 30. Determinação da massa molar por SEC-MALS de Xac0574^{His 1-309}, Xac0573^{His 49-232} e o complexo entre elas. O ensaio foi feito com uma concentração de 15 μM de cada proteína no tampão 50 mM Tris HCl pH 8, 100 mM KCl, 2 mM MgCl_2 e 0,02 % (p/v) azida de sódio, onde a linha que atravessa o pico representa a distribuição da massa molar calculada, sendo para Xac0574^{His 1-309} (marrom) 38,2 KDa, para Xac0573^{His 49-232} (azul) 22,8 KDa e para o complexo Xac0574^{His 1-309}- Xac0573^{His 49-232} (verde) 58,1 KDa.

Tabela 11. Análise das proteínas Xac0574^{His 1-309}, Xac0573^{His 49-232} e o complexo Xac0574^{His 1-309}-Xac0573^{His 49-232} por SEC-MALS

Proteína	Massa teórica (KDa)	Massa experimental (KDa)	Tempo de retenção (minutos)
Xac0574 ^{His 1-309}	35,0	38,2	14,92
Xac0573 ^{His 49-232}	22,2	22,8	15,21
Complexo	57,2	58,1	13,80

4.4.4 Ensaios de calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

As técnicas de cromatografia de exclusão molecular e SEC-MALS demonstraram que as proteínas Xac0574 e Xac0573 interagem formando um complexo estável mas não permitiram determinar que tipos de forças estão envolvidas no processo e a sua magnitude. Para caracterizar termodinamicamente a interação intermolecular das duas proteínas, foi empregado o método de calorimetria de titulação isotérmica (ITC).

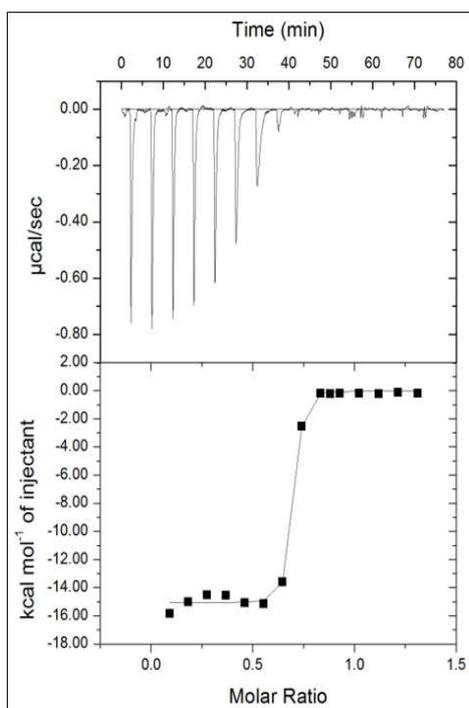


Figura 31. Perfil de titulação isotérmica da interação de Xac0573^{His 49-232} e Xac0574^{His 1-309}. A titulação à 30 °C empregou uma concentração de 200 µM na pipeta de Xac0573^{His 49-232} e 10 µM na célula de reação de Xac0574^{His 1-309}. Ambas proteínas foram diluídas em 20 mM Tris HCl pH 8, 100 mM NaCl e 5 % (v/v) de glicerol. Dados brutos da calorimetria e a linha de base estão no painel superior. A isoterma da titulação, que representa o calor liberado após cada injeção, foi normalizada pela molaridade do titulante (eixo das ordenadas) em função da razão molar de titulante por titulado (eixo das abscissas) no painel inferior.

Esta técnica possibilita determinar a variação da entalpia de ligação (ΔH°), a constante de afinidade (K_d) entre as espécies, a entropia (ΔS°) e a energia livre de Gibbs

(ΔG°) da reação. O calor total medido no experimento está composto pelo calor de diluição de cada uma das proteínas no tampão e o calor da reação de formação do complexo. Depois de ajustar a linha de base do termograma, foi feito o cálculo da área de cada pico e subtraídos os calores de diluição das proteínas, para depois normalizar a isoterma de ligação com respeito à concentração como mostra a Figura 31, para assim determinar os parâmetros termodinâmicos determinados que são apresentados na tabela 12 (Biswas & Tsodikov, 2010; Velazquez-Campoy, Leavitt, & Freire, 2015).

Tabela 12. Determinação dos parâmetros termodinâmicos da interação Xac0573^{His 49-232} e Xac0574^{His 1-309} por calorimetria de titulação isotérmica (ITC). A reação foi conduzida à 30 °C no tampão 20 mM Tris HCl pH 8, 100 mM NaCl e 5 % (v/v) de glicerol. Todos os valores determinados foram medidos em duplicata.

N	K_d (nM)	ΔH° (Kcal/mol)	ΔS° (Cal/mol K)	$-T\Delta S^\circ$ (Kcal/mol)	ΔG° (Kcal/mol)
0,66 ± 0,01	2,5 ± 1,2	-14,6 ± 1,0	-8,6 ± 4,4	2,6 ± 1,3	-12,0 ± 0,4

Os valores da constante de dissociação ($K_d = 2,45\text{nM}$) e ΔG° (-12Kcal/mol), indicam que a formação do complexo está altamente favorecida nas condições avaliadas já que só uma pequena fração das moléculas do complexo se dissociam para voltar a suas condições iniciais, apesar que as concentrações das proteínas no ensaio estiveram na ordem de micromolar. A alta afinidade dada pelo valor determinado do K_d sugere que dentro da célula bacteriana, onde a concentração intracelular das proteínas é da ordem de nanomolar, o complexo formado é estável e isso garante que a bactéria fique protegida contra os efeitos nocivos do efetor (neste caso Xac0574) até ele ser translocado pelo T4SS.

A ΔG de ligação é um balanço de duas forças de contribuição, a entalpia (ΔH) e a entropia (ΔS). Cada uma aporta uma informação diferente que permite ter uma interpretação do processo que está acontecendo na interação entre as duas proteínas. O conceito físico da ΔH é a somatória do calor procedente das variações na energia de ligação não covalente que surgem pela formação e quebra de numerosas ligações individuais nas interações específicas das moléculas envolvidas no processo, como são: ligações de hidrogênio, pontes salinas, interações de van der Waals e processos de hidratação (Fisher & Singh, 1995; Leavitt & Freire, 2001; Perozzo, Folkers, & Scapozza, 2004; Velazquez-Campoy, Leavitt, & Freire, 2004). O ΔH medido para o complexo foi de -14,6 Kcal/mol, característico de um processo exotérmico, onde a liberação da energia do sistema acontece por ter um estado final energeticamente mais favorável em comparação com o estado inicial, que está representado no termograma da titulação de Xac0574 e Xac0573 da Figura 31 (painel

superior).

É muito provável que o valor negativo da ΔH da titulação Xac0574-Xac0573 seja consequência das novas ligações de hidrogênio entre os átomos aceptores e doadores das duas proteínas na interface de interação assim como o aporte dos contatos de van der Waals, já que a distância e os ângulos das ligações geram a geometria apropriada entre os resíduos para que as repulsões sejam muito menores em comparação com as forças de atração. As forças de atração envolvidas na interação favorecem a dessolvatação dos grupos apolares e polares na interface e gera ligações eletrostáticas. A diminuição das ligações de hidrogênio entre a proteína e o solvente não tem o suficiente impacto desfavorável no processo para superar os efeitos do ganho energético pela interação entre Xac0574 e Xac0573 (Perozzo et al., 2004).

Uma ΔH negativa pela interação das proteínas está frequentemente acompanhada por uma penalidade entrópica (ΔS), composta por contribuições relacionadas à dessolvatação (favoráveis) e mudanças conformacionais (frequentemente desfavoráveis). A dessolvatação acontece com a liberação de moléculas de água ordenadas que estão em contato com grupos hidrofóbicos, enquanto as mudanças entrópicas conformacionais surgem pela perda de graus de liberdade translacionais e rotacionais dos ângulos de torção da cadeia principal e das cadeias laterais dos aminoácidos na interface de contato entre as subunidades do complexo. No caso do complexo Xac0574-Xac0573, a penalidade entrópica ($-T\Delta S = 2,6 \pm 1,3$ Kcal/mol) é muito pequena em comparação com a ΔH favorável, portanto, a formação do complexo está principalmente dirigida pela formação de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas (Cooper, 1999; Jelesarov & Bosshard, 1999; Luque & Freire, 2000; Perozzo et al., 2004).

O último parâmetro termodinâmico é N, que corresponde à estequiometria da reação de ligação. Este valor depende do conhecimento exato da concentração da proteína e do ligante para poder obter a relação das ligações do complexo, assumindo que 100 % das moléculas estão em estado nativo. O valor obtido de N foi $0,66 \pm 0,01$, que é diferente do resultado obtido por cromatografia analítica de exclusão molecular e SEC-MALS, que aponta para uma relação 1:1, portanto, há motivos para questionar a validade do valor de N determinado por ITC. Resultados deste tipo já foram descritos em outros estudos, e em geral as principais causas para estes erros são: quantificação errada da proteína da célula e/ou da seringa, degradação ou baixa qualidade do titulado (molécula na célula, no caso Xac0574) por desenovelamento, enovelamento incorreto ou degradação das proteínas

(Luque & Freire, 2000; Perozzo et al., 2004). Tendo em conta o anterior, a razão mais provável que gerou o valor de N inferior a 1,0 foi um erro na quantificação da Xac0574. A construção empregada não possui nenhum triptofano, o que impossibilita a sua quantificação por absorvância no comprimento de onda de 280 nm. Em razão disso, o método de Bradford foi utilizado para a quantificação das duas proteínas, um método que tem a desvantagem de depender de uma curva padrão baseada em outra proteína.

4.4.5 Ensaio de desnaturação térmica por calorimetria diferencial de varredura (DSC)

A técnica de DSC é uma ferramenta que permite a medição direta da captação ou liberação de energia térmica das moléculas em suas transições conformacionais pela diferença de temperatura entre a célula de amostra e a de referência conforme há um incremento da temperatura, portanto, é uma medida da variação da capacidade calorífica da molécula. O processo é representado por um termograma que tem um pico, no qual o valor máximo registrado da capacidade calorífica é denominado temperatura média de transição (T_m), e a integração do pico do termograma permite obter a entalpia de desnaturação (ΔH). No caso das proteínas, a técnica é empregada para a análise do processo de desnaturação térmica e o valor da entalpia total representa o aporte endotérmico para gerar as quebras das ligações de hidrogênio e as perdas das interações hidrofóbicas (Bruylants et al., 2005; P. Gill, Moghadam, & Ranjbar, 2010; Lepock, 2005; Sturtevant, 1987).

O conceito de estabilidade termodinâmica de uma proteína está relacionado com a T_m , já que em essa temperatura metade das proteínas estão em estado nativo e o restante em um estado não nativo, sendo os dois estados separados por uma barreira de energia cinética. A denominação do estado não nativo agrupa os estados desenovelado, parcialmente desenovelado e proteínas mal enoveladas, mas no modelo de dois estados ignora a existência de intermediários parcialmente enovelados, portanto, o estado final duma proteína implica um estado desenovelado e com a perda da sua função biológica (del Pino, Ibarra-Molero, & Sanchez-Ruiz, 2000; Privalov, 1996; Sanchez-Ruiz, 2010).

Os ensaios de DSC foram realizados com a finalidade de determinar a estabilidade térmica (T_m) para Xac0574, Xac0573 e o complexo formado entre elas. Os termogramas obtidos das proteínas foram analisados seguindo o incremento da temperatura para evidenciar a presença de ombros, um pico menor adicional ou muito próximo ao pico principal de cada termograma, já que esse comportamento termodinâmico é característico de diferentes estados intermediários sendo populados durante o processo de desnaturação.

Nos termogramas correspondentes às proteínas individuais há uma ausência de picos adicionais indicando que os domínios que compõem cada proteína não desnaturam individualmente. O termograma do complexo 1:1 também mostra um pico simétrico e único, sugerindo que não há uma dissociação do complexo em seus monômeros possivelmente devido à forte interação das duas proteínas (Figura 32). Estes resultados indicam que a desnaturação pode ser considerada altamente cooperativa e de dois estados para as proteínas individuais e do complexo (Bruylants et al., 2005; Jelesarov & Bosshard, 1999; Luque & Freire, 2000; Vermeer & Norde, 2000).

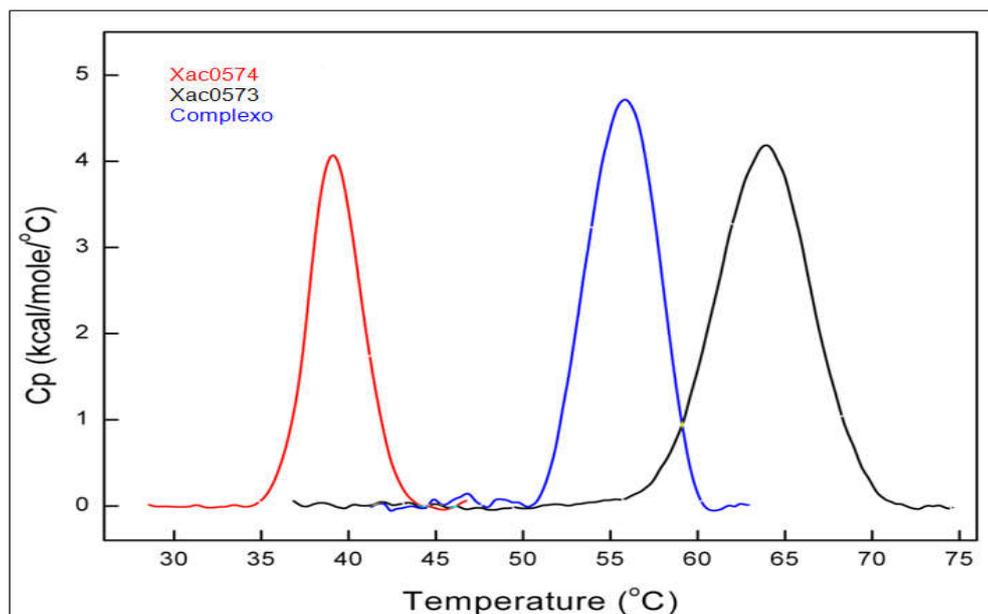


Figura 32. Perfil de desnaturação térmica por DSC de Xac0573^{His 49-232}, Xac0574^{His 1-309} e o complexo Xac0573^{His 49-232}-Xac0574^{His 1-309}. Em vermelho Xac0574^{His 1-309}, em preto Xac0573^{His 49-232} e em azul o complexo 1:1 Xac0574^{His 1-309}-Xac0573^{His 49-232}. Ensaio feito por triplicata.

Os perfis de desnaturação das proteínas individuais e do seu complexo na Figura 32 mostram que Xac0574^{His 1-309} tem uma $T_m = 39,0$ °C, Xac0573^{His 49-232} tem uma $T_m = 63,52$ °C enquanto o complexo interessante possui uma T_m intermediária de $56,42$ °C (tabela 13). A T_m de Xac0573^{His 49-232} é $24,51$ °C maior que a T_m de Xac0574^{His 1-309}, indicando que Xac0573^{His 49-232} é menos suscetível à desnaturação em baixas temperaturas (Bruylants et al., 2005). Essa estabilidade térmica justifica a sua função biológica como inibidor de Xac0574^{His 1-309}, já que no caso hipotético que Xac0573^{His 49-232} tivesse uma T_m menor que o efector e se a temperatura excede a T_m do inibidor, Xac0574^{His 1-309} ficaria livre para poder degradar a membrana interna bacteriana levando à morte celular.

Tabela 13. Parâmetros termodinâmicos determinados por desnaturação térmica por DSC das proteínas Xac0574^{His 1-309}, Xac0573^{His 49-232} e complexo Xac0573^{His 49-232}-Xac0574^{His 1-309}. Todos os valores determinados foram medidos em triplicata. $\Delta T_{1/2}$: Representa a largura média do pico e indica a cooperatividade do processo. Reversibilidade: É uma medida que indica a porcentagem das moléculas que voltaram a sua condição nativa logo do processo de desnaturação.

Proteína	T_m (°C)	ΔH (Kcal/mol)	$\Delta T_{1/2}$	Reversibilidade (%)
Xac0574	39,01±0,83	13,33 ±1,48	3,93 ±0,47	77,40
Xac0573	63,52 ±0,35	27,52 ±3,15	6,23 ±0,44	70,14
Complexo	56,42 ±0,44	20,11± 1,42	4,68 ±0,93	76,11

O pressuposto inicial do comportamento termodinâmico do complexo era que a T_m deveria ser maior do que as proteínas individuais, pois é esperado que a interação entre elas aumente a estabilidade. Porém, no caso do complexo Xac0573^{His 49-232}-Xac0574^{His 1-309} isso não foi observado, já que registrou uma T_m intermediária entre as T_m das proteínas individuais. Este resultado sugere que Xac0573 é mais estável sozinha que no complexo, enquanto Xac0574 tem um incremento da estabilidade (aumento da T_m em 17,41 °C) ao estar em complexo (tabela 13). Esse comportamento termodinâmico do complexo está fortemente relacionado com as propriedades físico-químicas e biológicas das proteínas individuais, já que podem ser mudados os estados conformacionais para estabilizar uma conformação em particular que favoreça a interação com outras biomoléculas ou pequenos ligantes, gerando um comportamento completamente diferente comparado com cada proteína individual (Freire, 2001). A estabilização de uma conformação pela interação pode ser explicada porque em muitos casos as interfaces proteína-proteína estão enriquecidas em resíduos carregados, além de ter resíduos hidrofóbicos espalhados por toda a superfície formando pequenas regiões hidrofóbicas. O anterior gera que as interações eletrostáticas aumentem entre as duas proteínas, fazendo que permaneçam próximas umas das outras, o que lhes permite ter a oportunidade de ter um arranjo na sua orientação para favorecer a ligação e assim ter uma maior estabilidade como uma nova molécula formada (Sheinerman, Norel, & Honig, 2000).

Uma possível hipótese para explicar o aumento da estabilidade de Xac0574 no complexo pode ser que talvez na superfície de Xac0574 há normalmente aminoácidos hidrofóbicos expostos, e no momento que acontece a interação com Xac0573 geraram interações do tipo ponte salino e de hidrogênio das cadeias laterais dos aminoácidos das duas proteínas que permitem cobrir os resíduos hidrofóbicos da superfície gerando maior estabilidade (Kumar, Tsai, & Nussinov, 2000). Um exemplo deste fenômeno foi o estudo feito por (Kamal et al., 2011), que mostra que a lipase LipA de *B. subtilis* apresenta uma irreversibilidade térmica no processo de desnaturação ocasionada pela perda das interações

intermoleculares entre as regiões hidrofóbicas, ficando ditas regiões expostas nos intermediários parcialmente enovelados gerando agregados. Portanto, o trabalho se enfoca em comparar a termoestabilidade de duas mutantes aleatórias de LipA, em um caso substitui 4 resíduos (4D3) e na outra mutante 12 resíduos (6B) com respeito à proteína selvagem. Os resultados de desnaturação térmica indicam que 6B é muito mais estável por ter uma $T_m = 78,2$ °C e uma reversibilidade do 100 %, enquanto a mutante 4D3 possuiu uma $T_m = 71,2$ °C comparada com a $T_m = 56$ °C da proteína selvagem. Os pesquisadores identificaram que as substituições na estrutura proteica foram de aminoácidos não polares por polares, ocasionando que as regiões hidrofóbicas sejam mais hidrofílicas, levando a uma maior solubilidade e reversibilidade da proteína após a desnaturação térmica. 8 das 12 mutações de 6B estão distribuídas em quatro grandes regiões hidrofóbicas expostas ao solvente comparadas com a superfície da proteína selvagem, daí que modifique drasticamente seu comportamento termodinâmico.

Ainda que não haja certeza que as interações hidrofílicas e a perda da exposição dos resíduos hidrofóbicos sejam a razão do aumento da estabilidade de Xac0574 na formação do complexo, o fenômeno do aumento da estabilidade do efector por ligar-se com o inibidor em um complexo é similar ao descrito na interação do inibidor da subtilisina do *Streptomyces albogriseolus* (SSI) e a proteinase subtilisina BPN, que dão origem a um complexo com uma estequiometria 2:2. Para caracterizar a interação inibidor-proteinase por DSC foi desenvolvido ensaios com misturas das duas proteínas mantendo constante a concentração da subtilisina e aumentando a concentração do SSI com a finalidade de identificar as mudanças do perfil de desnaturação térmica das proteínas. As diferentes desnaturações térmicas das misturas das proteínas apresentam um comportamento no qual o aumento da concentração do inibidor ($T_m = 83$ °C) aumenta a estabilidade da subtilisina no complexo até 20 °C mais que do seu T_m ($T_m = 67$ °C) na ausência de SSI. Ademais todas as curvas de desnaturação térmica mostram que acontece um processo irreversível quando interagem as duas proteínas, o que é interessante porque o processo de desnaturação térmica do inibidor sozinho é reversível, pelo que o estudo sugere que SSI não se dissocia da subtilisina no processo de desnaturação térmica (Takahashi & Sturtevant, 1981). O estudo anterior permite indicar que talvez a estabilidade adquirida por Xac0574 no complexo está diretamente relacionada por sua interação com Xac0573 já que as duas proteínas ainda interagem em seu estado desenovelado e essa interação gera o perfil de desnaturação térmica diferente do perfil de desnaturação das proteínas individuais.

O comportamento apresentado na desnaturação térmica do complexo Xac0574-

Xac0573 já foi descrito por (Santos, de Carvalho, & Garcia-Rojas, 2018) ao estudar por DSC o heterocomplexo 1:1 da lisozima e a albumina bovina. O termograma do complexo lisozima-albumina apresenta um só pico, indicando que foi formado um biopolímero com características termodinâmicas completamente diferentes às propriedades originais das proteínas individuais. A temperatura de desnaturação do heterocomplexo foi de 67,0 °C, valor que é a média das temperaturas de desnaturação das proteínas individuais, onde a lisozima possui uma temperatura de desnaturação de 72,3 °C e a albumina uma de 59,7 °C, com um ΔH associado ao processo para o complexo de 9,2 Kcal/mol, que também é o valor intermediário entre os valores observados para a lisozima (35,8 Kcal/mol) e a albumina (6,4 Kcal/mol). Estas características são similares ao observado no complexo Xac0574-Xac0573 (tabela 13), sugerindo que o complexo está atuando aparentemente como uma molécula diferente das proteínas que compõem o complexo por causa das interações entre elas, daí que a suas propriedades termodinâmicas sejam diferentes.

Devido ao comportamento particular apresentado pelo complexo Xac0574-Xac0573 é necessário fazer um estudo mais detalhado a respeito para avaliar as hipóteses geradas até o momento da origem do comportamento termodinâmico, por isso é preciso, i) fazer o perfil de desnaturação do complexo até temperaturas maiores para averiguar se existe ou não outras transições acima da T_m . ii) Os intervalos usados no incremento da temperatura devem ser maiores para garantir que o sistema se aproxima ao equilíbrio em cada temperatura. iii) É preciso avaliar o efeito de diferentes concentrações das proteínas para averiguar se o estado desenovelado consiste de um heterodímero ou dois monômeros. iv) A reversibilidade das proteínas precisa ter um tempo maior na diminuição da temperatura para um novo processo de desnaturação para evidenciar seu efeito na porcentagem de moléculas que voltam a seu estado nativo.

4.5 Estudos da atividade enzimática e biológica das proteínas Xac0574 e Xac0573

4.5.1 Ensaio de crescimento celular e citotoxicidade em *E. coli*

Para avaliar o efeito da produção do efator Xac0574 e seu inibidor Xac0573 no crescimento de células bacterianas, *E. coli* BL21(DE3)*plysS* foi transformada com os plasmídeos pET28a vazio, pET28a contendo Xac0574¹⁻³⁰⁹, pET28a contendo Xac0573⁴⁹⁻²³² e pET28a contendo Lip4, sendo Lip4 uma esterase extracelular identificada em uma biblioteca de metagenômica. Cada cepa foi acompanhada no seu crescimento até atingir uma D.O_{600nm} perto de 1 e depois foi induzida a produção das diferentes proteínas com

IPTG. As curvas de crescimento observadas na presença e ausência de IPTG são mostradas na Figura 33.

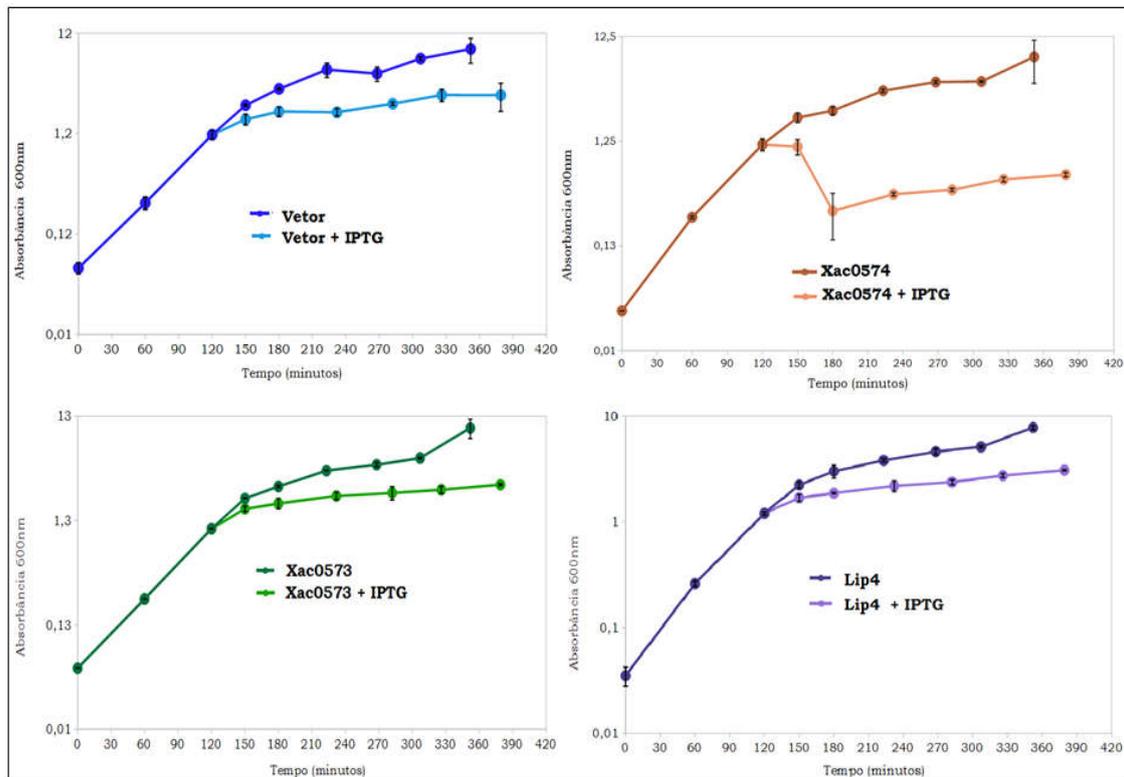


Figura 33. Curvas de crescimento dos diferentes insertos no vector pET28 em *E. coli* BL21(DE3)pLysS. A curva em azul corresponde ao vetor vazio pET28 em presença e ausência de IPTG. A curva em verde corresponde ao pET28a com o inserto de Xac0573 em presença e ausência de IPTG. A curva em roxo corresponde ao pET28a com o inserto de Lip4 em presença e ausência de IPTG e a curva em laranja corresponde ao pET28a com o inserto de Xac0574 em presença e ausência de IPTG.

A cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS contendo os plasmídeos pET28a vazio, Lip4 pET28a e Xac0573 pET28a apresentam uma pequena diminuição no crescimento celular após da indução com IPTG, que ao longo do tempo não tem um efeito significativo na multiplicação bacteriana para a cepa. Esse fenômeno é conhecido como carga metabólica e é ocasionado pela produção mesma da proteína ao ser induzida, já que a produção de proteínas recombinantes em *E. coli* pode chegar a níveis superiores do 50 % da proteína total celular. Portanto, a quantidade de recursos e de energia que são investidos completamente no processo habitual de manutenção celular deve ser distribuída também para manter, replicar e estabilizar o plasmídeo, traduzir os genes do plasmídeo inclusive aqueles envolvidos na resistência ao antibiótico, gerando assim uma escassez de aminoácidos e das subunidades ribossômicas livres para a produção de proteínas próprias da bactéria. Por isso, uma das alternativas para diminuir o estresse é diminuir a taxa de crescimento celular (Overton, 2014; Singha et al., 2017; Sorensen & Mortensen, 2005).

No entanto, no caso das células de *E. coli* expressando Xac0574 (Figura 33, gráfico vermelho), há uma diminuição significativa da população celular, já que depois de 30 minutos de adição do IPTG a D.O_{600nm} cai pela metade e uma hora depois o valor é quase 10 vezes menor que do cultivo não induzido com a mesma construção. Até a última leitura feita da D.O_{600nm} da curva de crescimento (7 horas em total), o cultivo não consegue recuperar a mesma densidade celular antes da indução o longo do tempo.

Dada a notável diminuição do crescimento celular causada pela toxicidade de Xac0574, sugere que a proteína atua sobre algum componente celular bacteriano indispensável para manter a viabilidade celular. A análise da sequência de aminoácidos que compõem a Xac0574 feito no programa bioinformático Pfam (Finn et al., 2016) permitiu determinar a presença de um domínio conservado denominado “lipase tipo 3”, indicando essa informação que um possível alvo do efector é a membrana celular interna, onde há uma maior concentração de lipídios e como as proteínas recombinantes geralmente são expressadas no citoplasma bacteriano isso pode facilitar que Xac0574 migre logo à membrana celular interna e faça a hidrólise de lipídios (Demain & Vaishnav, 2009; Sorensen & Mortensen, 2005). Em seu contexto natural, dentro de *X. citri*, Xac0574 como efector deve ser translocado pelo T4SS dentro de outras bactérias (inicialmente no periplasma) para que possa ocasionar a sua morte, reforçando a idéia que seu alvo seja a membrana celular e talvez sua função não seja só para produzir um dano intracelular senão também para gerar um canal de entrada para que possam atuar outros efetores.

Também com a finalidade de descartar que o efeito na diminuição celular seja pela produção de uma enzima de outro contexto biológico mas com a capacidade de hidrolisar lipídios, as bactérias foram transformadas com um plasmídeo que expressa Lip4, uma esterase envolvida na via β -cetoadipato da degradação de ésteres aromáticos do ciclo do carbono (Carvalho, 2015). Porém a curva de crescimento da cepa expressando a esterase apresentou um comportamento similar à cepa contendo o plasmídeo vazio (Figura 33, gráfico laranja).

Paralelo às curvas de crescimento foram feitas placas de meio 2XTY suplementadas com os antibióticos correspondentes para a cepa e o plasmídeo, com diferentes concentrações de IPTG para identificar a quantidade menor na qual a indução de Xac0574 resultará no retardamento do crescimento da cepa *E. coli*. Na placa sem adição de IPTG já foi possível identificar uma diferença no crescimento celular da cepa contendo Xac0574 com respeito às outras bactérias transformadas, possivelmente por um vazamento do vetor. A

adição de 25 μM de IPTG foi suficiente para inibir completamente o crescimento celular das bactérias contendo Xac0574 a diferença das outras culturas que apresentaram o crescimento habitual como indica a Figura 34.

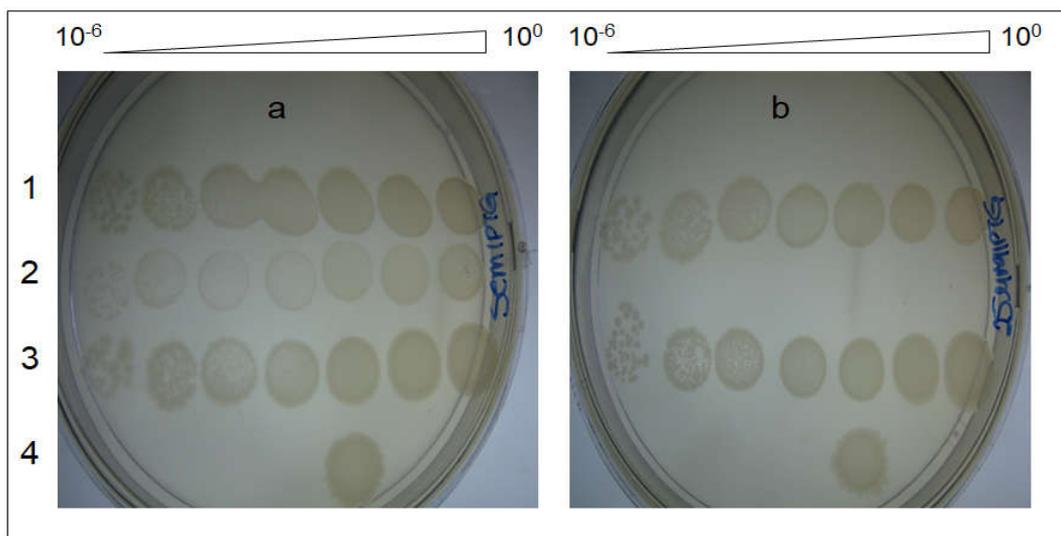


Figura 34. Ensaio de crescimento em placa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS expressando os diferentes insertos no vetor pET28a por indução com IPTG. 1) *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformada com pET28a sem inserto. 2) *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformada com Xac0574. 3) *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformada com Xac0573. 4) *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformada com Lip4. a) Placa sem IPTG. b) Placa com 25 μM de IPTG. Todas as cepas transformadas têm diluições seriadas desde 10^0 (direita) até 10^{-6} (esquerda).

4.5.2 Ensaio *in vitro* de atividade enzimática de Xac0574^{His 1-309} com lecitina de ovo

Xac0574 possui um domínio conservado da superfamília da lipase tipo 3 e os resultados obtidos da diminuição significativa do crescimento celular em *E. coli* ao produzir o efector, geraram a hipótese que Xac0574 estava hidrolisando algum componente da membrana celular bacteriana. Para avaliar aquela hipótese, foram analisadas inicialmente duas reações *in vitro* empregando como substratos lecitina de ovo e azeite de oliva. Os dois substratos empregados têm diferentes composições, por um lado, a lecitina de ovo possui como componentes majoritários os fosfolípidios: fosfatidilcolina (PC) com um 80,5 %, seguido pela fosfatidiletanolamina (PE) com 11,7 %, e uma quantidade muito menor de esfingomielina e lípidios neutros saturados (Joshi, Paratkar, & Thorat, 2006; Palacios & Wang, 2005). O azeite de oliva está composto principalmente por trioleína (70-80 %), que é um triglicérido do ácido oleico (18:1), os ácidos graxos saturados (12-20 %) e poli-insaturados (6-16 %), onde o ácido linoleico é a molécula predominante dos ácidos graxos poli-insaturados e varia a sua concentração entre 5 e 15 % (Maggio et al., 2009).

No ensaio *in vitro* com lecitina, o branco da reação exibiu uma única banda

correspondente à lecitina íntegra e em seguida nos poços 2 e 3 houve só uma banda de migração menor que corresponde à lisolecitina. A atividade enzimática de Xac0574^{His 1-309} é mantida até ser previamente armazenada a -80 °C como mostra a cromatografia na Figura 35. O ensaio *in vitro* permitiu demonstrar que Xac0574 catalisa a hidrólise do substrato lecitina, permitindo assim afirmar que é uma fosfolipase

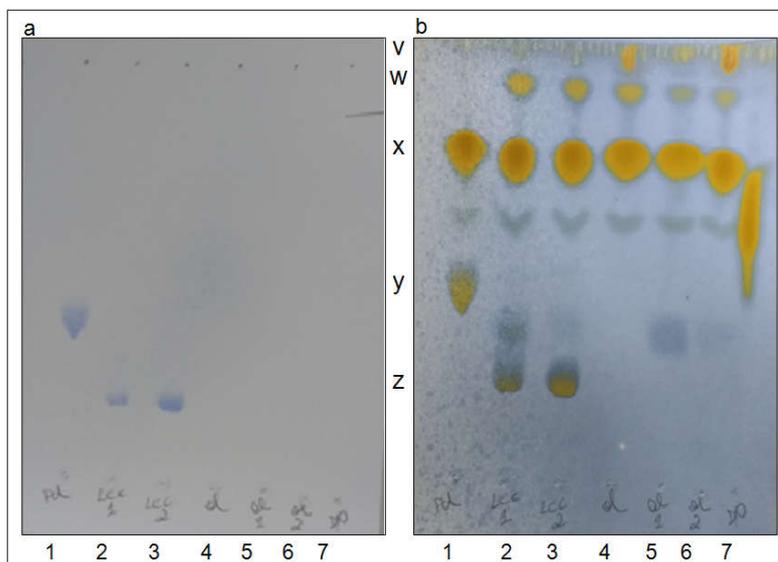


Figura 35. Cromatografia de capa fina em sílica da reação de Xac0574^{His 1-309} com lecitina de ovo e azeite de oliva. a) Placa de sílica revelada com solução de trióxido de molibdênio e ácido sulfúrico. b) Placa de sílica carbonizada a 120 °C após de ser revelada com solução de trióxido de molibdênio e ácido sulfúrico. v) Frente de corrida. w) Banda correspondente aos ácidos graxos. x) Banda correspondente ao deoxicolato de sódio. y) Banda correspondente à lecitina. z) Banda correspondente à lisolecitina. 1) Branco da reação com lecitina. 2) Lecitina em presença de Xac0574^{His 1-309}. 3) Lecitina em presença de Xac0574^{His 1-309} descongelada. 4) Branco da reação com azeite de oliva. 5) Azeite de oliva em presença de Xac0574^{His 1-309}. 6) Azeite de oliva em presença de Xac0574^{His 1-309} descongelada. 7) Deoxicolato de sódio em água.

No ensaio usando como substrato azeite de oliva, não foi possível determinar se Xac0574 tem a capacidade de catalisar a sua hidrólise, devido à solução de identificação de fosfolipídios composta por trióxido de molibdênio e ácido sulfúrico reage especificamente só com o fosfato da cabeça polar do fosfolipídio, e o azeite de oliva tem como composto majoritário a trioleína, um monoácil triglicerídeo, pelo que a solução não vai reagir com o substrato como mostra a Figura 35 nos poços 4, 5 e 6. De igual modo ao ser gerados os ácidos graxos, eles migram com a frente da corrida e tampouco são identificados (Istivan & Coloe, 2006; Parker & Peterson, 1965; Skipski, Peterson, & Barclay, 1964; Vitiello & Zanetta, 1978).

Com a finalidade de caracterizar melhor as condições da reação enzimática de Xac0574 com a lecitina, foram feitos três experimentos adicionais. O primeiro tinha como objetivo observar o efeito que tem não incluir no meio de reação os reagentes deoxicolato de sódio e CaCl₂, já que ditos compostos são descritos em diferentes trabalhos como

necessários para ensaios enzimáticos de fosfolipases. O deoxicolato de sódio, por sua natureza de detergente favorece a formação das vesículas dos fosfolípidios garantindo uma melhor interação na interface água-lipídio entre a enzima e o substrato. No caso do Ca^{2+} , ele funciona como um íon estabilizador da tríade catalítica para algumas fosfolipases A_2 e por isso são denominadas fosfolipases A_2 dependentes de cálcio (Berg, Gelb, Tsai, & Jain, 2001; De Maria, Vind, Oxenboll, Svendsen, & Patkar, 2007). O resultado apresentado na Figura 36 destaca que em ausência de Ca^{2+} e de deoxicolato de sódio, Xac0574 mantém a sua capacidade de hidrolisar a lecitina para produzir lisolecitina e ácidos graxos livres.

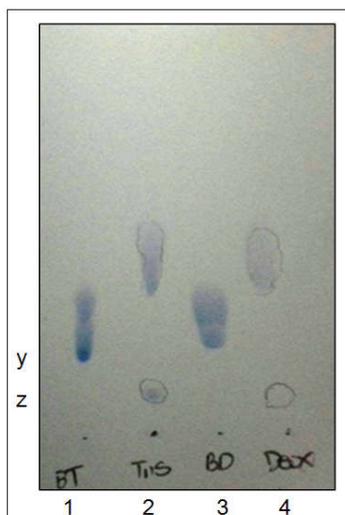


Figura 36. Reação de Xac0574^{His 1-309} com lecitina na presença e ausência do cloreto de cálcio e do deoxicolato de sódio. Placa de sílica revelada com solução de trióxido de molibdênio e ácido sulfúrico. 1) Branco da reação contendo 20 mM Tris HCl pH 8 e 6,13 mM de lecitina de ovo. 2) Mistura da reação composta por 20 mM Tris HCl pH 8, 6,13 mM de lecitina de ovo e 1,4 μM de Xac0574^{His 1-309}. 3) Branco da reação com deoxicolato de sódio constituído por 20 mM Tris HCl pH 8, 6,13 mM lecitina de ovo e 40 mM de deoxicolato de sódio. 4) Reação com deoxicolato de sódio, composta por 20 mM Tris HCl pH 8, 6,13 mM lecitina de ovo, 40 mM de deoxicolato de sódio e 1,4 μM de Xac0574^{His 1-309}. y) Banda de lecitina. z) Banda de lisolecitina.

Em seguida, se realizou um ensaio para determinar como a variação do pH num intervalo de 4 até 8 afeta a atividade enzimática de Xac0574^{His 1-309}. Os resultados obtidos (Figura 37) mostram que Xac0574 tem atividade enzimática na faixa de pH desde 5 até 8, aparentemente com uma atividade máxima nos pH 6 e 7 devido que há uma aparente proporção maior de lisolecitina que de lecitina.

O último teste com lecitina empregou duas concentrações de Xac0574^{His 1-309} com a finalidade de determinar se a concentração gerava uma variação significativa em função do tempo para a geração do produto. Na Figura 38 é possível observar que há detecção dos produtos da reação em todos os tempos avaliados para as duas concentrações da enzima, mas não é possível perceber o aumento progressivo na quantidade do produto nem uma diferença no produto gerado em função das duas concentrações avaliadas de Xac0574. A

possível causa de não poder identificar as variações dos produtos pode estar fundamentada no método de detecção, já que dependendo da quantidade da solução de identificação de fosfolípidios adsorvida na superfície da sílica, ela vai poder reagir com o substrato e produtos da reação.

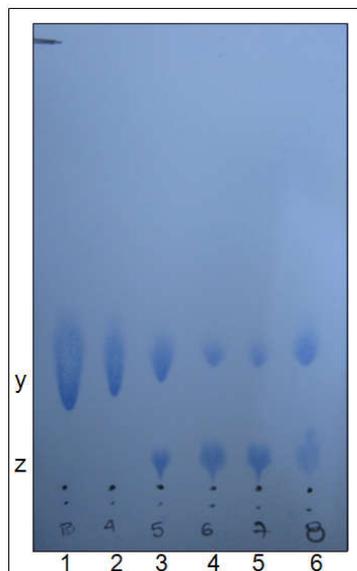


Figura 37. Efeito da variação do pH na atividade enzimática de Xac0574^{His 1-309}. Todas as reações estiveram compostas por: 6,13 mM de lecitina de ovo, 1 μ M de Xac0574^{His 1-309} e 23 mM do tampão correspondente de cada pH, e foram conduzidas à 30 °C. 1) Branco do substrato composto por 6,13 mM de lecitina de ovo ressuspendida em água. 2) Reação de lecitina de ovo ressuspendida com acetato de sódio pH 4. 3) Reação de lecitina de ovo ressuspendida com citrato de sódio pH 5. 4) Reação de lecitina de ovo ressuspendida com Bis Tris HCl pH 6. 5) Reação de lecitina de ovo ressuspendida com Bis Tris propano pH 7. 6) Reação de lecitina de ovo ressuspendida com Tris HCl pH 8. y) Banda de lecitina. z) Banda de lisolecitina.

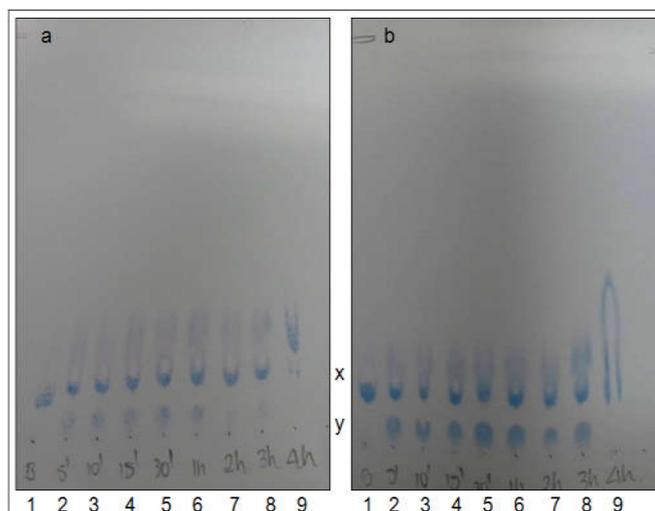


Figura 38. Efeito da concentração de Xac0574^{His 1-309} na detecção do produto de reação em função do tempo. a) Reação com 0,5 μ M de Xac0574^{His 1-309}. b) Reação com 1 μ M de Xac0574^{His 1-309}. x) Banda de lecitina. y) Banda de lisolecitina. 1) Branco de reação composto por 9,2 mM de lecitina em 50 mM Tris HCl pH 8. 2) Tempo de reação 5 minutos. 3) Tempo de reação 10 minutos. 4) Tempo de reação 15 minutos. 5) Tempo de reação 30 minutos. 6) Tempo de reação 60 minutos. 7) Tempo de reação 120 minutos. 8) Tempo de reação 180 minutos. 9) Tempo de reação 240 minutos.

A função biológica de Xac0573^{His 49-232} como possível inibidor da atividade enzimática de Xac0574^{His 1-309} ainda não era confirmada, já que até o momento só foi caracterizada a formação de um complexo estável entre as duas proteínas. Para responder a esta questão, foi desenvolvido o ensaio para examinar a hipótese que Xac0573 ao ligar-se com Xac0574, inibe a sua atividade enzimática. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 39, mostrando que Xac0573 tem a capacidade de inativar a Xac0574 para que ela não possa reagir hidrolisando a lecitina (poço 4). Ao mesmo tempo foi verificado que Xac0573 não possui atividade alguma frente ao substrato.

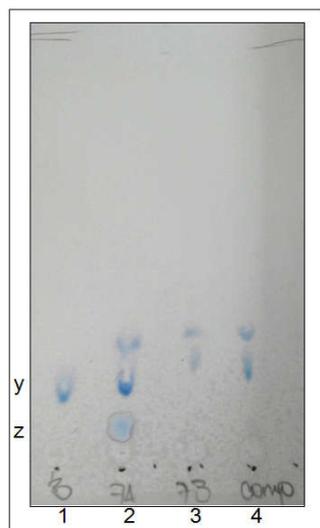


Figura 39. Inibição enzimática de Xac0574^{His 1-309} pela presença de Xac0573^{His 49-232}. 1) Branco do substrato composto por 5,0 mM de lecitina de ovo ressuspendida em água. 2) Reação composta por 5,0 mM de lecitina de ovo, 30 mM de Tris HCl pH 8 e 1 μ M de Xac0574^{His 1-309}. 3) Reação composta por 5,0 mM de lecitina de ovo, 30 mM de Tris HCl pH 8 e 1 μ M de Xac0573^{His 49-232}. 4) Reação composta com 5,0 mM de lecitina de ovo, 30 mM de Tris HCl pH 8, 1 μ M de Xac0574^{His 1-309} e 1 μ M de Xac0573^{His 49-232}. y) Banda de lecitina. z) Banda de lisolecitina.

4.5.3 Classificação da atividade fosfolipase de Xac0574^{His 1-309}

As fosfolipases (PLs) são um subgrupo diverso de enzimas lipolíticas aperfeiçoadas na hidrólise de ligações éster dos fosfolipídios e dependendo da quebra da ligação podem ser classificadas em dois grupos gerais: as acil hidrolases composto por a fosfolipase A1 (PLA₁), a fosfolipase A₂ (PLA₂), a fosfolipase B (PLB) e a lisofosfolipase A_{1/2} (LysoPLA_{1/2}). O segundo grupo corresponde às fosfodiesterases e está composto pelas fosfolipase C (PLC) e a fosfolipase D (PLD) (De Maria et al., 2007; Istivan & Coloe, 2006; Richmond & Smith, 2011). As PLA₁ podem hidrolisar na posição *sn*-1 acil, as PLA₂ hidrolisam na posição *sn*-2 acil, as PLBs são capazes de hidrolisar nas posições *sn*-1 e *sn*-2 da estrutura lipídica, e no caso da lisofosfolipase A_{1/2} (LysoPLA_{1/2}), ela tem a capacidade de hidrolisar a cadeia acil disponível já seja na posição *sn*-1 ou *sn*-2 porém unicamente do lisofosfolipídio. A

fosfolipase C (PLC) é conhecida por hidrolisar a ligação fosfodiéster da posição *sn*-3 produzindo 1,2 diacilglicerol e a PLD hidrolisa a segunda ligação fosfodiéster disponível do grupo fosfato que não está ligada com o glicerol liberando ácido fosfatídico como mostra a Figura 40 (Ghannoum, 2000; Richmond & Smith, 2011; Sugimori, Kano, & Matsumoto, 2012).

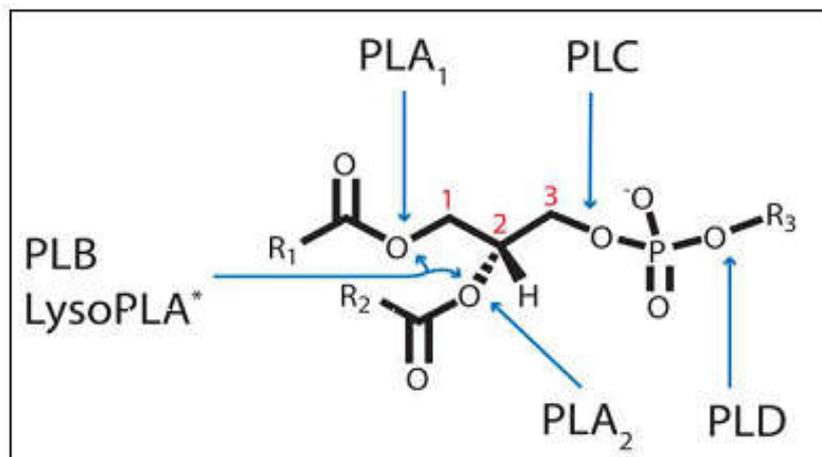


Figura 40. Esquema dos possíveis sítios de corte das diferentes fosfolipase em um fosfolípido. PLA₁: Fosfolipase A₁. PLA₂: Fosfolipase A₂. LysoPLA: Liso fosfolipase A. PLB: Fosfolipase B. PLC: Fosfolipase C. PLD: Fosfolipase D (Richmond & Smith, 2011).

Como foi mencionado anteriormente as quatro ligações éster do fosfolípido são suscetíveis de hidrólise enzimática, por isso a ferramenta principal para a identificação do tipo de fosfolipase está baseada na identificação dos produtos de reação da hidrólise de ligações éster de um fosfolípido. Os fosfolípidos podem ser considerados como derivados de glicerofosfatos os quais possuem dois grupos hidroxilo esterificados com ácidos graxos de cadeia longa e um grupo fosforil que dá origem à ligação fosfodiéster polar (A., 1983). Portanto, os possíveis produtos da reação enzimática podem ser lisofosfolípidos (LPL), ácidos graxos livres, diacilglicerol ou ácidos fosfatídicos. Em razão disso, foi elaborada uma reação *in vitro* tempo dependente com quatro diferentes substratos para identificar os produtos da reação por espectrometria de massas e assim determinar o tipo de fosfolipase que é Xac0574. Os substratos usados foram: POPC (1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicerol-3-fosfocolina), POGG (1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicerol-3-fosfoglicerol), DOPE (1,2-dioleoil-*sn*-glicerol-3-fosfoetanolamina) e cardiolipina bovina (1,3-bis(*sn*-3'-fosfatidil)-*sn*-glicerol) sendo esta última composta por quatro ácidos linoleicos (C18:2). As estruturas dos compostos estão representadas na Figura 41.

Os substratos fosfolípidicos escolhidos foram selecionados tendo em conta dois critérios. O primeiro parâmetro foi com respeito a sua natureza, já que cada um dos grupos

ligados ao glicerol apresenta uma composição de ácidos graxos diferentes e dependendo da ligação que seja quebrada o produto gerado terá uma massa molecular característica que será identificada por espectrometria de massas. O segundo critério está relacionado com a sua função estrutural na composição da membrana citoplasmática bacteriana, já que a fosfatidiletanolamina, o fosfatidilglicerol e a cardiolipina são os principais fosfolipídios que compõem a membrana interna das bactérias Gram negativas (Epand & Epand, 2009; Matsumoto, Kusaka, Nishibori, & Hara, 2006). Portanto, os substratos além de permitir a identificação do tipo de fosfolipase, possivelmente também proporcionaram informação sobre a capacidade de Xac0574 para hidrolisar os fosfolipídios principais da membrana. Ainda que a fosfatidilcolina não esteja presente na membrana celular bacteriana, os ensaios de lecitina anteriormente desenvolvidos evidenciaram que Xac0574 pode usar ela como substrato, e por isso pode ser empregada como uma ferramenta adicional para a classificação do tipo de fosfolipase.

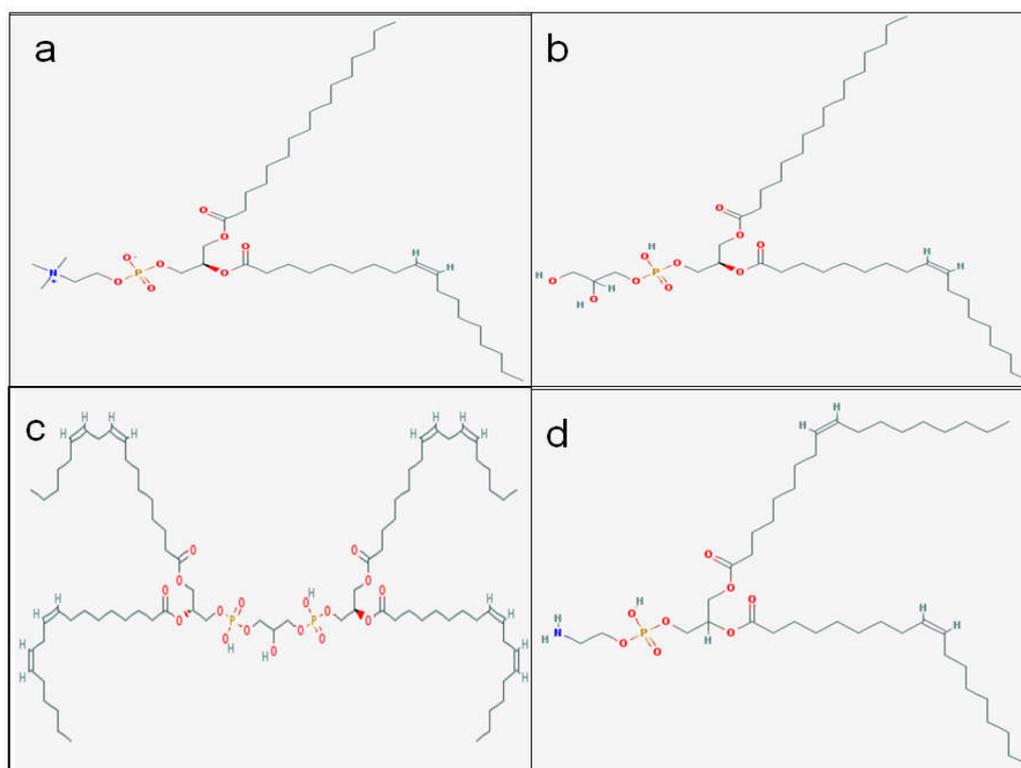


Figura 41. Estrutura molecular dos fosfolipídios usados como substratos nos ensaios *in vitro* de Xac0574^{His 1-309}. a) POPC. b) POPG. c) Cardiolipina bovina (18:2)₄. d) DOPE. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database: CID=5283539 (Cardiolipina), CID=5497103 (POPC), CID=5283509 (POPG) e CID=6437392 (DOPE). (Acessado: 26/01/2018).

As condições de reação com os fosfolipídios foram aquelas mais simples identificadas com lecitina, em razão disso, os filmes de POPC, POPG e cardiolipina foram

ressuspendidos em Tris HCl pH 8, ao contrário do filme de DOPE que requereu a adição de deoxicolato de sódio para a sua ressuspensão completa. Logo após da incubação com a enzima, as reações foram analisadas por TLC como mostra a Figura 42, identificando como produtos LPC, LPE e LPG assim como os substratos intatos PC, PE e PG, onde o PE tem uma maior migração, seguido por PG e finalmente PC que fica perto da origem, apresentando o mesmo padrão de migração conhecido na literatura, indicando que os substratos POPC, POPG, e DOPE são hidrolisados por Xac0574 (Parker & Peterson, 1965; Skipski et al., 1964; Skipski, Smolowe, & Barclay, 1967). A reação e o branco de reação da cardiolipina têm duas manchas no perfil de migração, o que não permitiu concluir se houve ou não reação de hidrólise. No entanto, uma das manchas pode ser um produto de degradação, já que por comparação com os perfis de migração descritos na literatura, a cardiolipina intata migra perto do PE (Figura 42-c,d) (Parker & Peterson, 1965; Rooney, Canavan, & Motoyama, 1974; Vitiello & Zanetta, 1978).

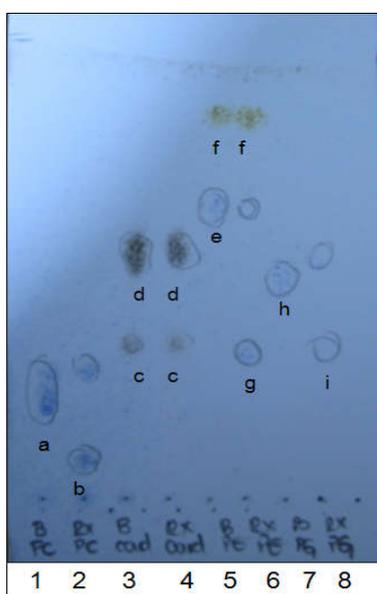


Figura 42. TLC dos produtos da reação *in vitro* de Xac0574^{His 1-309} com os fosfolipídios POPC, POPG, DOPE e cardiolipina. 1) Branco da reação com POPC. 2) Reação com POPC. 3) Branco da reação com cardiolipina. 4) Reação com cardiolipina. 5) Branco da reação com DOPE. 6) Reação com DOPE. 7) Branco da reação com POPG. 8) Reação com POPG. a) POPC. b) LPC (Lisofosfatidilcolina). c) Possível produto de degradação da cardiolipina. d) Cardiolipina. e) DOPE. f) Deoxicolato de sódio. g) LPE (lisofosfatidiletanolamina). h) POPG. i) LPG (Lisofosfatidilglicerol).

Conhecendo os substratos hidrolisados nas reações foi feito a análise dos produtos da reação da Xac0574 por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC/MS), onde na reação com POPC foi identificado POPC, lisofosfatidilcolina (LPC) 18:1, lisofosfatidilcolina (LPC) 16:0, ácido oléico (18:1) e ácido palmítico (16:0) (Figura 43). Ao observar os dados do branco da reação só houve um pico correspondente ao íon POPC-acetato (o acetato é derivado do acetato de amônio empregado nas soluções da

cromatografia) confirmando que o substrato não estava hidrolisado antes do início da reação.

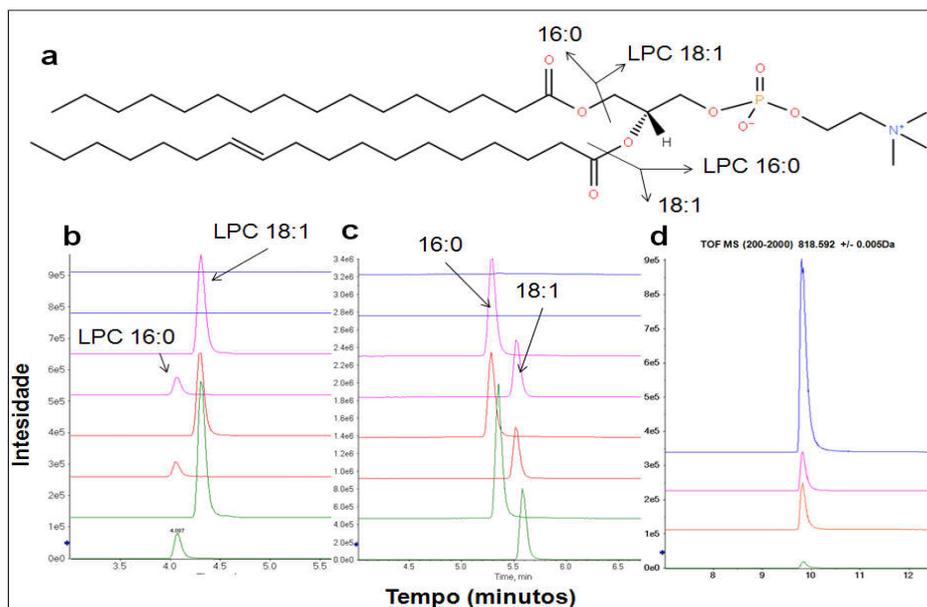


Figura 43 Cromatograma dos íons identificados por LC/MS da reação de Xac0574^{His 1-309} com POPC em 20 mM Tris HCl pH 8. a) Estrutura do POPC ressaltando os possíveis sítios das quebras das ligações pela reação enzimática. b) Cromatograma correspondente ao LPC 18:1 (m/z 580,362) e LPC 16:0 (m/z 554,346). c) Cromatograma dos ácidos graxos palmítico (16:0) (m/z 255,233) e oleico (18:1) (m/z 281,249). d) Cromatograma correspondente ao POPC-Acetato (m/z 818,592). Os tempos de reação comparados foram: 2 horas (rosa), 4 horas (laranja), 22 horas (verde) com o controle da reação (azul).

A análise qualitativa consistiu em comparar cada pico do cromatograma correspondente aos produtos e a relação entre eles em função do tempo, indicando que a produção de lisofosfatidilcolina (LPC) 18:1 e de ácido palmítico (16:0) está aumentando a sua quantidade consideravelmente ao longo do tempo, sugerindo que a ligação éster da posição *sn*-1 está sendo hidrolisada. Apesar disso, nos mesmos tempos avaliados também foi detectada uma quantidade menor de lisofosfatidilcolina (LPC) 16:0 e de ácido oléico (18:1), sugerindo que a ligação éster na posição *sn*-2 também estava sendo hidrolisada (Figura 43). Como já foi mencionado antes, o branco sempre apresentou um só pico com uma massa conforme com o POPC, portanto, os resultados apontavam a que a atividade enzimática de Xac0574 poderia ser classificada em dois tipos, sendo ela uma PLB ou uma PLA₁ com uma atividade residual lisofosfolipase.

No caso de que Xac0574 fosse uma PLB, ela deve ter a capacidade de hidrolisar as ligações nas posições *sn*-1 e *sn*-2 indiscriminadamente por causa que esse tipo de fosfolipase possui a atividade conjunta de fosfolipase e lisofosfolipase, sendo a atividade fosfolipase majoritária na posição *sn*-2, o que ocasiona que haja uma mínima acumulação do intermediário lisofosfolípídico no meio de reação e as quantidades produzidas dos ácidos

graxos palmítico (16:0) e oléico (18:1) também sejam similares (Ghannoum, 2000; Kohler et al., 2006; Maury et al., 2002). Não obstante, os resultados expõem uma marcada preferência a longo do tempo com a hidrólise na posição *sn*-1, gerando como produtos majoritários na reação LPC 18:1 e o ácido palmítico.

Na hipótese de que Xac0574 tinha uma atividade de lisofosfolipase além de ser uma PLA₁, as quantidades entre os ácidos graxos liberados deveriam ser similares devido ao acoplamento das duas reações enzimáticas. Na primeira etapa de reação, há a liberação do ácido palmítico da posição *sn*-1 e logo a saída do ácido oléico da posição *sn*-2 do lisofosfolípídios, e conjuntamente deve ser gerado uma grande quantidade de glicerofosfocolina (GPC) que é a molécula residual da ação das duas atividades enzimáticas (Kovacic et al., 2013; Vargas-Villarreal et al., 1995). Nos cromatogramas dos produtos de reação com POPC não foi identificada a mesma quantidade entre os ácidos graxos liberados e ao mesmo tempo tampouco foi observado um pico adicional de um íon com massa *m/z* 257,102 correspondentes ao GPC (mas isso pode ser por causa que a extração dos lipídios foi orgânica e a molécula residual é polar). Logo, estes resultados apontam para uma classificação de Xac0574 como uma PLA₁ em vez de uma PLB.

O outro substrato avaliado que possui as cadeias de ácidos graxos diferentes é o POPG (1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicerol-3-fosfoglicerol), o que permite que ele seja outro ponto de referência para fazer uma comparação com os resultados obtidos previamente com POPC. A primeira observação que é necessária destacar é a maior atividade de Xac0574 frente ao substrato POPG, já que em 90 minutos de reação ele foi completamente consumido, apresentando uma velocidade de reação em torno de 15 vezes mais rápida que com o POPC (Figura 44). Esta observação é consistente com a hipótese que a Xac0574 deveria ter uma maior afinidade pelos componentes principais da membrana celular bacteriana.

A análise por espectrometria de massas indica que o branco apresenta somente o pico pertencente ao POPG ionizado com *m/z* 747,518, e os produtos da reação expõe o mesmo fenômeno observado para a reação com POPC e é que são produzidos os dois lisofosfolípídios e os dois ácidos graxos, onde as quantidades de LPG 18:1 e o ácido palmítico (16:0) foram sempre muito maiores do que as quantidades de LPG 16:0 e do ácido oléico (18:1) (Figura 44-b,c). Com 90 minutos de reação, todo o substrato é consumido, mas a produção de LPG 16:0 não aumentou, sempre ficou muito menor que LPG 18:1. Do mesmo modo, a quantidade de ácido palmítico (16:0) foi muito maior que do ácido oléico

(18:1), reafirmando que Xac0574 é uma PLA₁.

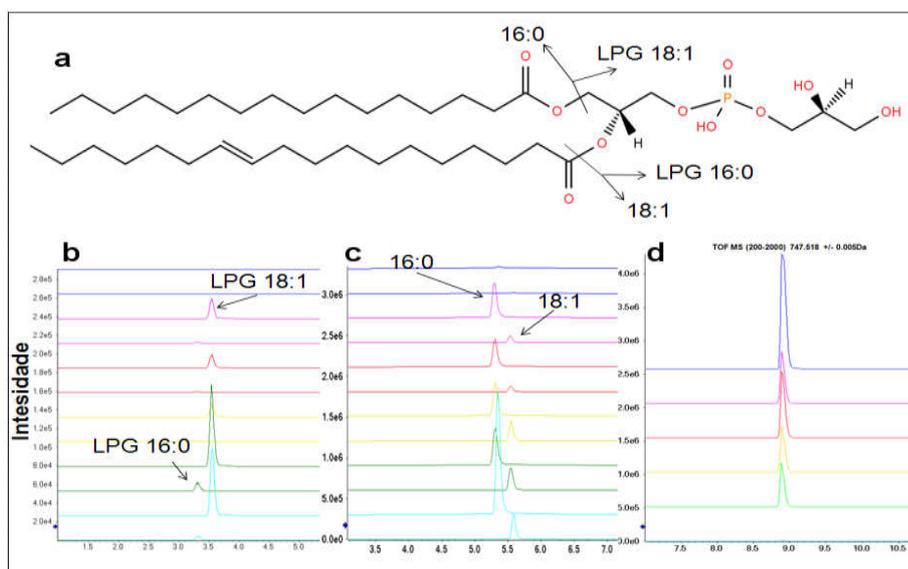


Figura 44. Cromatograma dos íons identificados por LC/MS da reação de POPG em 20 mM Tris HCl pH 8. a) Estrutura do POPG ressaltando os possíveis sítios das quebras das ligações pela reação enzimática. b) Cromatograma correspondente ao LPG 18:1 (m/z 509,285) e LPG 16:0 (m/z 483,269). c) Cromatograma dos ácidos graxos palmítico (16:0) (m/z 255,232) e oleico (18:1) (m/z 281,247). d) Cromatograma correspondente ao POPG ionizado (m/z 747,518). Os tempos de reação comparados foram: 10 minutos (rosa), 20 minutos (vermelho), 30 minutos (amarelo), 45 minutos (verde), 90 minutos (azul claro) com o controle da reação (azul).

Finalmente, foi estudada a reação da Xac0574 com os substratos DOPE (1,2-dioleoil-*sn*-glicerol-3-fosfoetanolamina) e cardiolipina bovina (1,3-bis(*sn*-3'-fosfatidil)-*sn*-glicerol). É importante lembrar que a fosfatidiletanolamina (PE) é o fosfolípido majoritário na membrana celular bacteriana, enquanto a cardiolipina se encontra em uma quantidade menor e similar à do fosfatidilglicerol (PG) (Epanand & Epanand, 2009; Vanounou, Parola, & Fishov, 2003). A reação da Xac0574 com DOPE teve uma velocidade de reação aproximadamente 18 vezes mais rápida que com POPG, ocasionando que em 5 minutos de reação todo o substrato disponível fosse consumido (Figura 45-d). Isso pode ser um indicativo que a PE é o substrato preferencial de Xac0574, portanto, a sua rápida hidrólise pode ser a causa principal que compromete a viabilidade celular bacteriana no momento que é feita a indução para produzir a Xac0574 na bactéria.

A interpretação dos resultados obtidos com DOPE reafirmam que Xac0574 é uma fosfolipase A₁, apesar de que as posições *sn*-1 e *sn*-2 do DOPE estão substituídas pelo mesmo ácido graxo, não há um comportamento variável da quantidade dos produtos da reação no tempo, e depois de 5 minutos de reação não há mais DOPE (substrato inicial) disponível para ser hidrolisado ficando na solução só LPE 18:1 e ácido oléico. A persistência do produto LPE, que é o substrato ideal para a possível atividade LysoPLA, indica

claramente que Xac0574 não possui atividade LysoPLA₂, como sugeria os produtos de reação com POPC e POPG.

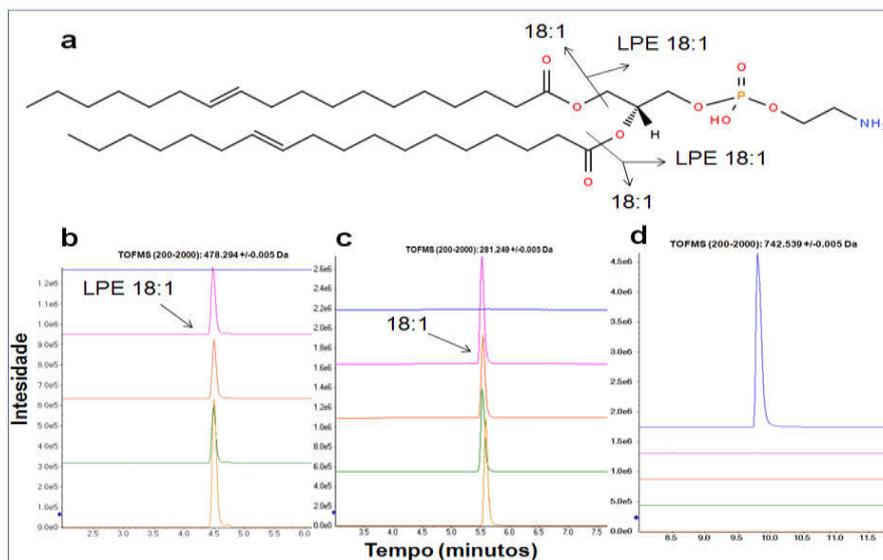


Figura 45. Cromatograma dos íons identificados por LC/MS da reação de DOPE em 20 mM Tris HCl pH 8 e 4,76 mM de deoxicolato de sódio. a) Estrutura do DOPE ressaltando os possíveis sítios das quebras das ligações pela reação enzimática b) Cromatograma correspondente ao LPE 18:1 (m/z 478,295). c) Cromatograma do ácido oleico (18:1) (m/z 281,250). d) Cromatograma correspondente ao DOPE ionizado (m/z 742,539). Os tempos de reação comparados foram: 5 minutos (rosa), 30 minutos (laranja), 60 minutos (verde), 90 minutos (amarelo) com o controle da reação (azul).

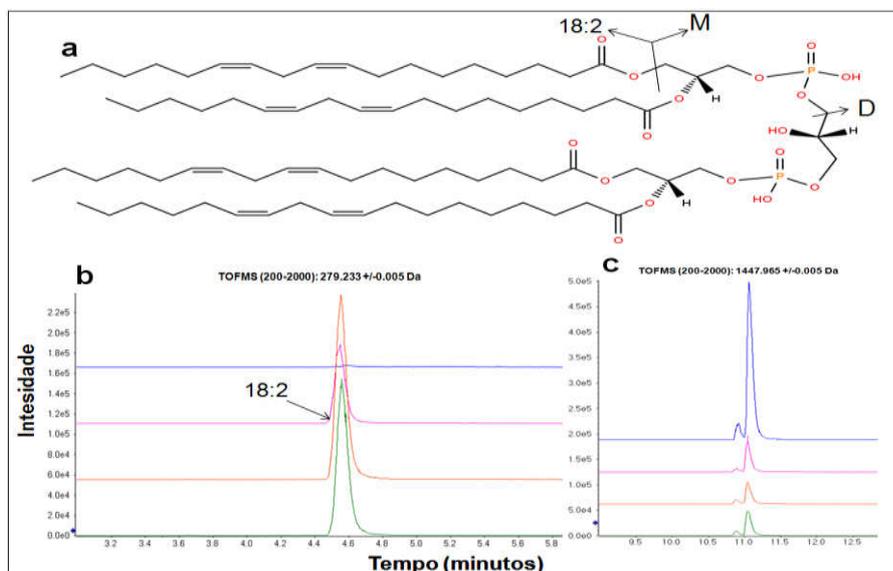


Figura 46. Cromatograma dos íons identificados por LC/MS da reação de cardiolipina bovina em 20 mM Tris HCl pH 8. a) Estrutura da cardiolipina bovina com os sítios das quebras pela ionização. M: Monoacilglicerolfosfato. D: diacilglicerolfosfato. b) Cromatograma correspondente ao ácido linoleico 18:2 (m/z 279,235). c) Cromatograma correspondente à cardiolipina ionizada (m/z 1447,959). Os tempos de reação comparados foram: 30 minutos (rosa), 45 minutos (laranja), 60 minutos (verde) com o controle da reação (azul).

O último substrato testado que compõe a membrana bacteriana foi a cardiolipina. Nestes ensaios foram identificados a cardiolipina ionizada com uma massa m/z 1447,959 no

branco de reação e o ácido linoleico (18:2) com uma massa m/z 279,235 como produto da reação (Figura 46). A fragmentação do pico de m/z 1447,959 da cardiolipina ionizada resultou na liberação do diacilglicerolfosfato, do monoacilglicerolfosfato e o ácido linoleico livre, igual ao padrão de fragmentação descrito na literatura sobre a caracterização por espectrometria de massas das espécies moleculares da cardiolipina (Minkler & Hoppel, 2010). Isso permitiu confirmar que o substrato só possuía como ácidos graxos o ácido linoleico e a presença dele livre confirma que sim houve reação de hidrólise. É preciso lembrar que com o TLC não foi capaz de detectar os produtos da reação de Xac0574 com a cardiolipina (Figura 42).

A cardiolipina é o produto final de uma reação de transferência do grupo fosfatidil proveniente de uma molécula de fosfatidilglicerol ao grupo 3'-hidroxí do glicerol de outra molécula de fosfatidilglicerol, produzindo uma molécula de tamanho maior ao ser comparada com os outros fosfolipídios utilizados como substratos. A cardiolipina que foi empregada como substrato é purificada de tecido animal e a sua composição de ácidos graxos é diferente à bacteriana, já que os ácidos graxos que compõem a cardiolipina do tecido animal são principalmente cadeias de 18 carbonos sendo 80 % deles ácido linoleico, em comparação com a bacteriana na qual os ácidos graxos variam de 14 a 18 carbonos e são majoritariamente saturados e monoinsaturados (Valianpour, Wanders, Barth, Overmars, & van Gennip, 2002). Portanto, estas diferenças na composição e o impedimento estérico fundamentado pela natureza da molécula podem resultar em que somente uma fração do substrato seja facilmente hidrolisável pelo acesso à posição *sn*-1 da molécula, talvez na presença da cardiolipina bacteriana Xac0574 pode ter um melhor rendimento, mas o ensaio já demonstra a capacidade de hidrolisar o substrato pelo efector que era o objetivo.

Em razão de que nos ensaios de caracterização do tipo de fosfolipase que era Xac0574 foi sugerida uma possível ação residual como lisofosfolipase A_1 (LysoPLA₁), ou seja, com a capacidade de hidrolisar na posição *sn*-1 de um lisofosfolipídio e dado que até o momento só foi demonstrado que Xac0574 não tinha atividade como LysoPLA₂, foi feita a reação *in vitro* usando como substrato L- α -lisofosfatidilcolina de ovo contendo na posição *sn*-1 uma mistura de ácido palmítico (16:0) e ácido esteárico (18:0). A escolha do substrato é fundamentada em duas razões: uma é que os lisofosfolipídios predominantes que se encontram na membrana celular possuem entre doze e dezoito carbonos (Kovacic et al., 2013), e os substratos testados que estavam mostrando uma possível atividade lisofosfolipase tinham na sua posição *sn*-1 o ácido palmítico. De tal modo, o substrato escolhido permitia manter as condições similares de reação dos substratos já testados e da

composição da membrana bacteriana. A Figura 47 mostra que Xac0574 não possui atividade como LysoPLA₁, porque tanto o branco como a reação exibem o mesmo padrão de migração composto por uma mancha só na placa de TLC. Para garantir que o resultado da ausência de atividade lisofosfolipase de Xac0574 não era por um efeito de inativação enzimática, ao mesmo tempo foi desenvolvida a reação com lecitina de ovo, mostrando que Xac0574 estava ativa nas condições testadas de reação. De igual forma também foi verificado que Xac0573 não possui uma atividade enzimática como LysoPLA₁, só como inibidor de Xac0574.

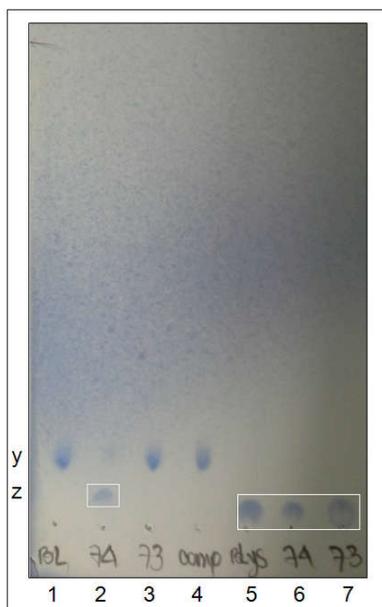


Figura 47. Reação in vitro com Xac0574^{His 1-309} utilizando como substrato L- α -lisofosfatidilcolina. 1) Branco da reação com 5 mM de lecitina de ovo ressuspendida em água. 2) Reação composta por 5 mM de lecitina de ovo, 30 mM de Tris HCl pH 8 e 1 μ M de Xac0574^{His 1-309}. 3) Reação composta por 5 mM de lecitina de ovo, 30 mM de Tris HCl pH 8 e 1 μ M de Xac0573^{His 49-232}. 4) Reação composta por 5 mM de lecitina de ovo, 30 mM de Tris HCl pH 8, 1 μ M de Xac0574^{His 1-309} e 1 μ M de Xac0573^{His 49-232}. 5) Branco da reação com 5 mM L- α -lisofosfatidilcolina ressuspendida em água. 6) Reação composta por 5 mM L- α -lisofosfatidilcolina, 30 mM de Tris HCl pH 8 e 1 μ M de Xac0574^{His 1-309}. 7) Reação composta por 5 mM L- α -lisofosfatidilcolina, 30 mM de Tris HCl pH 8 e 1 μ M de Xac0573^{His 49-232}. y) Banda de lecitina. z) Banda de lisolecitina

Em vista dos argumentos apresentados até agora, é possível afirmar que Xac0574 é uma fosfolipase A₁ com a capacidade de hidrolisar os três fosfolípidios majoritários que compõem a membrana celular bacteriana, o que é consistente com a hipótese que o seu alvo no nível intracelular é a membrana citoplasmática. A capacidade do efator de hidrolisar os três fosfolípidios da membrana explica a forte inibição do crescimento celular de *E. coli* com a produção de Xac0574 e também fundamenta a sua preferência pela fosfatidiletanolamina, o fosfolípidio mais abundante. Do mesmo modo, foi verificado que Xac0574 carece da capacidade de hidrolisar lisofosfolípidios tanto da posição *sn*-1 como *sn*-2, e Xac0573 não tem atividade fosfolipase nem lisofosfolipase mas inibe efetivamente a atividade enzimática de Xac0574.

A tabela 14 apresenta um resumo da caracterização por espectrometria de massas dos substratos empregados e seus produtos de hidrólise gerados pela ação enzimática de Xac0574 que permitiram a sua identificação como uma PLA₁.

Tabela 14. Caracterização por espectrometria de massas dos fosfolipídios POPC, POPG, DOPE, cardiolipina bovina e dos produtos de cada um deles nas reações com Xac0574^{HIS 1-309}.

Lipídio	Massa molecular – MS (Da)	Tempo de retenção em HPLC (minutos)	MS/MS
POPC – Acetato PLC 18:1 PLC16:0 18:1 16:0	818,595 580,362 554,346 281,249 255,233	9,801 4,303 4,074 5,579 5,354	744,554 / 281,249 / 255,233 281,249 255,233
POPG LPG 18:1 LPG 16:0 18:1 16:0	747,515 509,285 483,269 281,247 255,232	8,886 3,539 3,311 5,579 5,349	281,246 / 255,231 / 152,993 281,245 / 152,994 255,229 / 152,993
DOPE LPE 18:1	742,539 478,295 281,250	9,798 4,495 5,593	281,254 281,249
(C18:2) ₄ 18:2	1447,959 279,235	9,052 4,557	695,462 / 415,222 / 279,231

4.6 Ensaios cristalográficos

As construções das proteínas Xac1918¹⁻⁴⁷³, Xac0574¹⁻³⁰⁹ e Xac0573⁴⁹⁻²³² foram submetidas a ensaios de cristalização empregando a técnica de vapor de difusão e uma matriz esparsa de condições de cristalização. Em placas de 24 poços a solução de cristalização composta geralmente por um tampão e um precipitante é adicionada dentro do reservatório de cada poço, para depois fazer uma mistura na plataforma superior do poço com uma gota da proteína em solução e uma gota da solução de cristalização, tendo como característica principal que a solução de cristalização contém o dobro ou mais da concentração do precipitante que a solução da proteína. Depois, os poços são selados hermeticamente e a diferença da concentração do precipitante na mistura e na solução do reservatório provoca a evaporação e difusão constante da água do poço até ter um equivalente na concentração do precipitante no poço e no reservatório. Devido ao maior volume da solução do reservatório que da mistura é gerado um aumento da concentração

da proteína e do precipitante, portanto, há um processo de supersaturação da proteína que pode provocar a nucleação e o crescimento de cristais (Gavira, 2016; Russo Krauss et al., 2013).

4.6.1 Cristais das proteínas Xac1918¹⁻⁴⁷³, Xac0573⁴⁹⁻²³², Xac0574¹⁻³⁰⁹ e o complexo Xac0573⁴⁹⁻²³²-Xac0574¹⁻³⁰⁹

4.6.1.1 Cristais da proteína Xac1918¹⁻⁴⁷³

O teste inicial de cristalização de Xac1918¹⁻⁴⁷³ identificou uma ampla e diversa variedade de condições para a formação de cristais com os kits empregados. Posteriormente estas condições foram suplementadas com 1 mM CaCl₂, o que gerou melhores cristais. O cristal crescido na condição 0,2M de sulfato de amônio, 0,1M de Tris HCl pH 8,5 e 19 % (p/v) PEG 3350 difratou com uma resolução máxima 3,0 Å. Por causa de não existir um modelo de uma proteína com uma identidade maior ao 23 % para Xac1918, não foi possível resolver as fases por substituição molecular para gerar um modelo da proteína, por isso foi preciso desenvolver novos ensaios de cristalização com as condições iniciais refinadas empregando Xac1918¹⁻⁴⁷³ marcada com selênio-metionina (SeMet), para posteriormente resolver as fases utilizando o método de espalhamento anômalo (MAD).

Os cristais de SeMet Xac1918¹⁻⁴⁷³ tiveram todos a mesma morfologia de placas muito finas, frágeis e sobrepostas nas diferentes condições avaliadas, inclusive após do refinamento das condições. Ditos cristais crescidos foram aproveitados para aplicar a técnica de microsemeamento (microseeding), e conjuntamente foram feitas novas placas utilizando os kits Additive Screen e Silver Bullets da Hampton Research para ampliar as possibilidades de cristalização da proteína marcada. Os kits mencionados se caracterizam por ter compostos adicionais ao tampão e o agente precipitante na solução (cofatores, ligantes fisiológicos, íons, inibidores enzimáticos, detergentes ou agentes redutores) que podem favorecer o processo de cristalização por gerar modificações no ambiente da proteína, seja por ligar-se à proteína, por modificar a sua conformação, por produzir uma estabilidade maior ou por perturbar as interações proteína-proteína ou proteína-solvente (McPherson & Cudney, 2014; Russo Krauss et al., 2013). Os resultados gerados utilizando os kits com aditivos e a técnica de microsemeamento foram iguais aos obtidos previamente com os refinamentos das condições iniciais, já que não houve mudança da morfologia dos cristais gerados como mostra a Figura 48.

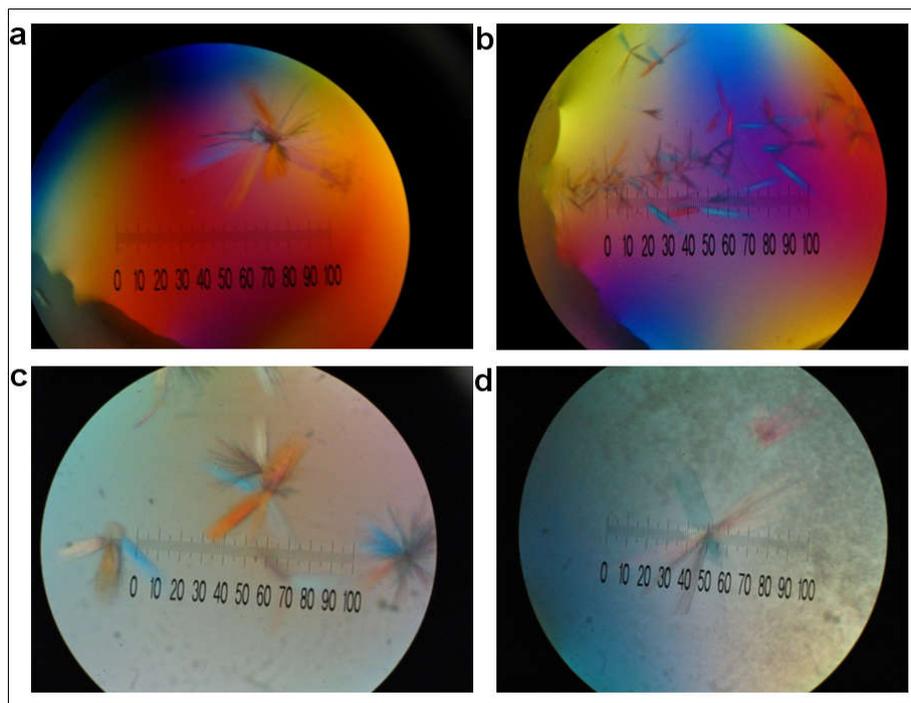


Figura 48. Cristais de Xac1918¹⁻⁴⁷³ obtidos nas diferentes metodologias de refinamento. a) Cristais obtidos do refinamento por variação das concentrações do composto precipitante e o pH da solução. Condição: 0,1 M (NH₄)₂SO₄; 0,1 M Bis Tris pH 6,4; 24 % PEG 3350. b) Cristais obtidos pela técnica de microseeding na condição: 0,1 M HEPES pH 7,5; 19 % PEG 3350. c) Cristais obtidos com o kit Additive screen na condição: 0,1 M (NH₄)₂SO₄; 0,1 M Bis Tris pH 6,4; 24 % PEG 3350 suplementada com 2,0 M NDSB - 211. d) Cristais obtidos com o kit Silver bullets na condição: 0,1 M (NH₄)₂SO₄; 0,1 M Bis Tris pH 6,4; 24 % PEG 3350 suplementada com 0,2 % (p/v) 1,4-Diaminobutano, 0,2 % (p/v) 1,8-Diaminooctano, 0,2 % (p/v) cadaverina, 0,2 % (p/v) Dicloridrato de cistamina, 0,2 % (p/v) Espermidina e 0,02 M HEPES de sódio pH 6,8.

Para tentar obter cristais de melhor qualidade, Xac1918 foi tratada com baixas concentrações de proteases para remover segmentos da proteína que apresentam como características ser regiões expostas e desestruturadas. As proteases usadas no processo foram a quimotripsina e a tripsina, sendo que a quimotripsina cliva no C-terminal da cadeia lateral de resíduos aromáticos como a fenilalanina, tirosina e triptofano, enquanto a tripsina cliva no C-terminal da cadeia lateral dos resíduos básicos lisina e arginina (Abskharon et al., 2011; Dong et al., 2007; Little et al., 2012; Wernimont & Edwards, 2009).

Duas metodologias de proteólise foram utilizadas em Xac1918^{His 1-473}, proteólise *in vitro* que acontece simultaneamente com a cristalização e proteólise controlada que é desenvolvida antes do processo de cristalização. Na proteólise controlada a diluição de da protease a 30°C com um tempo total de reação de 2 horas foi escolhida por gerar um fragmento mais estável como mostra a Figura 49. Os produtos das duas reações de proteólise foram purificados por cromatografia de exclusão molecular para garantir a pureza da proteína no momento de fazer os subsequentes ensaios de cristalização, além de permitir comparar no cromatograma o perfil da proteína sem ser digerida e digerida com as

duas proteases para garantir que aconteceu a reação. O cromatograma da Figura 50 mostra claramente um deslocamento do pico, indicando uma diminuição no peso molecular da proteína causada pela reação enzimática.

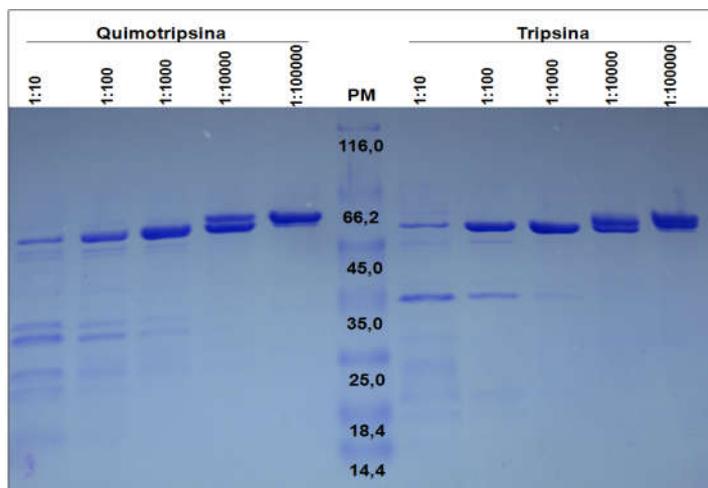


Figura 49. Proteólise controlada de Xac1918^{His1-473} com diluições de quimotripsina e tripsina a 30°C por duas horas. Gel SDS PAGE de tricina 12%. PM: Padrão de massa molecular.

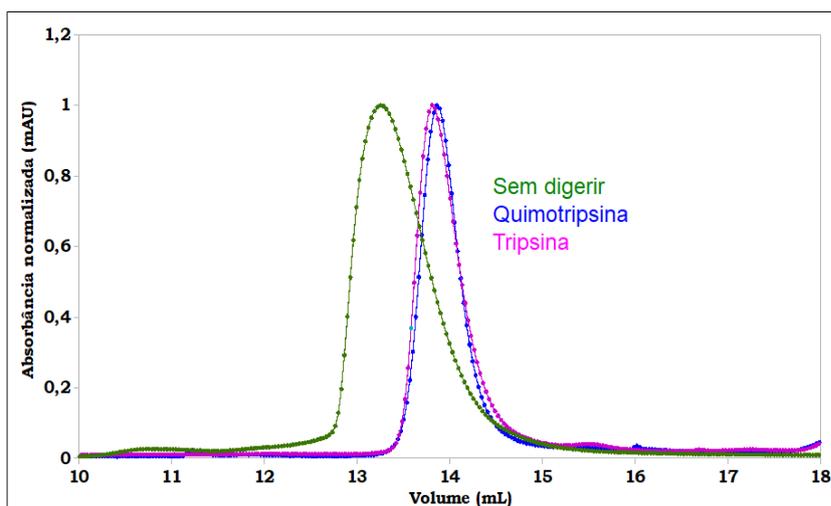


Figura 50. Comparação dos cromatogramas de Xac1918^{His1-473} das proteólises controlada com quimotripsina e tripsina e a proteína sem digerir. Corrida cromatográfica acompanhada no comprimento de onda de 280 nm.

Para identificar o possível sítio de corte das duas proteases foi feito um Western blot com os produtos das reações das duas proteólises purificadas por cromatografia de exclusão molecular usando o anticorpo anti-Histag. Os resultados obtidos indicam que a proteólise com quimotripsina estava removendo principalmente algum fragmento do C-terminal enquanto a proteólise com tripsina agia no N-terminal removendo a cauda de polihistidina da proteína e neste caso o produto não era detectado no Western blot (Figura

51). Conhecendo que os sítios de corte das proteases em Xac1918^{His 1-473} não atingiam as mesmas regiões foram feitas placas com os kits de screening inicial, obtendo de novo uma ampla variedade de condições de cristalização, mas só as condições com o produto da reação com quimotripsina foram refinado tabela 15.

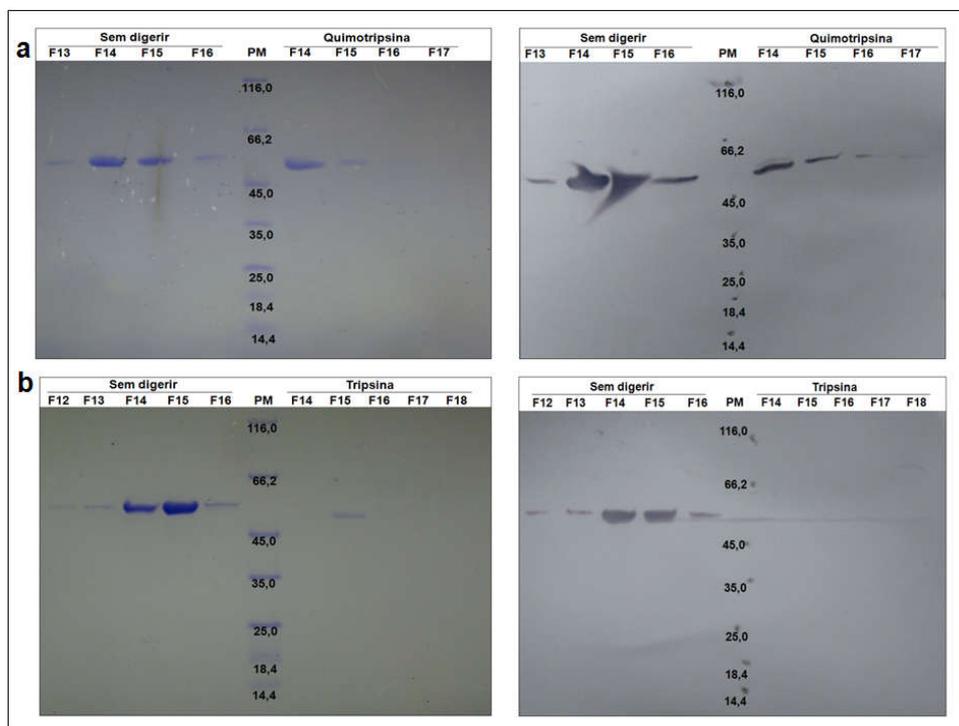


Figura 51. Western blot anti-His na reação de proteólise controlada em Xac1918^{His 1-473} com quimotripsina e tripsina. a) SDS-PAGE e Western blot Anti-His das frações eluídas do pico cromatográfico da proteólise com quimotripsina. b) SDS-PAGE e Western blot Anti-His das frações eluídas do pico cromatográfico da proteólise com tripsina. F: Frações da eluição. PM: Peso molecular.

No caso da proteólise que acontece conjuntamente com a cristalização (*in situ*), os ensaios foram feitos com os kits de screening inicial e em duas temperaturas. Umhas placas sempre ficaram a temperatura ambiente e outras ficaram só por 6 horas em temperatura ambiente para posteriormente ser armazenadas à 18 °C, porém nenhuma das variações metodológicas da proteólise gerou um cristal de melhor qualidade, posto que os cristais mantinham a mesma morfologia já descrita (Figura 48). Em vista que as diferentes metodologias usadas não melhoraram a qualidade dos cristais foi necessário fazer duas novas construções de Xac1918, as quais foram removidas duas regiões da proteína que estão previstas como desestruturadas no C-terminal, a primeira construção abrange desde o resíduo 1 até 426 e a segunda construção desde o resíduo 1 até 451 (Xac1918^{His 1-426} e Xac1918^{His 1-451}), sendo que as construções não foram testadas em novos ensaios de cristalização. Na tabela 15 está o resumo das principais condições de cristalização da

construção Xac1918^{His 1-473}.

Tabela 15. Principais condições de cristalização da construção Xac1918^{His 1-473}. A condição para os testes feitos com os kits Additive screen e Silver Bullets foi 0,1 M Sulfato de amônio, 0,1 M Bis Tris pH 6,5 e 24 % (p/v) PEG 3350. NT: Cristal não testado em experimentos de difração. PC-quimotripsina: Proteólise controlada com quimotripsina. Convencional: Procedimento usado inicialmente com os kits de screen.

HisTag N-terminal	Técnica	Íon adicionado	Condição de cristalização	Difração máxima
Não	Convencional	1mM CaCl ₂	0,1 M Formato de magnésio e 15 % (p/v) PEG 3350.	7,25 Å
Não	Convencional	1mM CaCl ₂	0,2 M Sulfato de amônio, 0,1 M de Tris HCl pH 8,5 e 19 % (p/v) PEG 3350.	3,0 Å
Não	Convencional	1mM CaCl ₂	0,2 M Manolato de sódio pH 7,0 e 20 % (p/v) PEG 3350.	Não
Não	Convencional	1mM CaCl ₂	0,15 M DL- ácido málico pH 7,0, 20 % (p/v) PEG 3350.	8,32 Å
Não	Convencional	Não	0,1 M Bis Tris HCl pH 6,5, 45 % (v/v) polipropilenglicol P400.	Não
Não	Convencional	Não	0,2 M Sulfato de lítio, 0,1 M HEPEs pH 7,5 e 25 % (p/v) PEG 3350.	Não
Não	Convencional	Não	0,2 M Cloreto de magnésio, 0,1 M citrao de sódio pH 5,0 e 10 % (p/v) PEG 20000.	9,17 Å
Sim	Convencional	1mM CaCl ₂	0,2 M Manolato de sódio pH 7,0 e 20 % (p/v) PEG 3350.	Não
Sim	Convencional	1mM CaCl ₂	0,1 M Sulfato de amônio, 0,1M HEPES pH 7,6 e 27 % (p/v) PEG 3350.	Não
Não	Microseeding	1mM CaCl ₂	0,1 M Ácido málico pH 7,0 e 20 % (p/v) PEG 3350.	NT
Não	Microseeding	1mM CaCl ₂	0,1 M Sulfato de amônio, 0,1 M Tris HCl pH 7,7 e 27 % (p/v) PEG 3350.	NT
Não	Microseeding	1mM CaCl ₂	0,1 M Sulfato de amônio, 0,1 M HEPEs pH 7,6 e 27 % (p/v) PEG 3350.	NT
Não	Microseeding	1mM CaCl ₂	0,1 M Sulfato de amônio, 0,1 M Bis Tris pH 6,5 e 25 % (p/v) PEG 3350.	NT
Não	Additive screen	1mM CaCl ₂	Aditivo: 0,1 M de Cloreto de hexamina de colbalto III.	NT
Não	Additive screen	1mM CaCl ₂	Aditivo: 2,0 M de 3- (dimetil-(2-hidroxi)etil)amônio)-1-propano sulfonato.	NT
Não	Additive screen	1mM CaCl ₂	Aditivo: 1,0 M de dimetilbezilamônio - 1- propano sulfonato.	NT

Sim	Silver Bullets	1mM CaCl ₂	Aditivo: 0,2 % (p/v) D-frutose, sal de 1,6-bisfosfato de trisódio, 0,2 % (p/v) sal de glicerol fosfato disódio, 0,2 % (p/v) L-O- fosfoserina, 0,2 % (p/v) O-fosfo-L- tirosina, 0,2 % (p/v) sal de sódio e ácido fítico e 0,02 M HEPES de sódio pH 6,8.	Não
Sim	Silver Bullets	1mM CaCl ₂	Aditivo: 0,11 % (p/v) dos ácidos: dodecanedioico, fumárico, glutárico, hexadecanedioico, maleico, oxamico, pimelico, sebáico, suberico, e 0,02 M HEPES de sódio pH 6,8.	Não
Sim	Proteólise <i>in situ</i>	1mM CaCl ₂	Tripsina (1/1000), 0,2 M citrato de sódio e 20 % (p/v) PEG 3350.	NT
Sim	Proteólise <i>in situ</i>	1mM CaCl ₂	Tripsina (1/1000), 0,2 M Cloreto de magnésio, 0,1 M Bis Tris pH 6,5, 25 % (p/v) PEG 3350.	NT
Sim	Proteólise <i>in situ</i>	1mM CaCl ₂	Tripsina (1/1000), 0,2 M Cloreto de sódio, 0,1 M Bis Tris pH 5,5 e 25 % (p/v) PEG 3350.	Não
Sim	Proteólise <i>in situ</i>	1mM CaCl ₂	Quimotripsina (1/100), 0,2 M Sulfato de lítio, 0,1 M HEPES pH 7,5 e 25 % (p/v) PEG 3350	Não
Sim	Proteólise <i>in situ</i>	1mM CaCl ₂	Quimotripsina (1/100), 0,056 M fosfato de sódio monobásico, 1,344 M fosfato de potássio dibásico pH 8,2.	NT
Sim	Proteólise <i>in situ</i>	1mM CaCl ₂	Quimotripsina (1/100), 0,1 M formato de magnésio e 15 % (p/v) PEG 3350.	NT
Sim	PC-quimotripsina	1mM CaCl ₂	60 % (v/v) Tacsimate pH 7,0.	NT
Sim	PC-quimotripsina	1mM CaCl ₂	0,1 M BICINE pH 9,0, 2 % (v/v) 1,4-dioxano e 10 % PEG 20000.	NT
Sim	PC-quimotripsina	1mM CaCl ₂	0,1 M Cloreto de sódio, 0,1 M Bis Tris propano pH 9,0 e 25 % (p/v) PEG 1500.	NT

4.6.1.2 Cristais da proteína Xac0573⁴⁹⁻²³²

Os ensaios de cristalização da proteína Xac0573⁴⁹⁻²³² foram feitos empregando os kits de screening geral da Hampton Research em placas de 24 poços de gota sentada pelo método de difusão por vapor. Em algumas condições iniciais testadas houve formação de cristais que logo depois foram refinadas empregando proteína sem cauda de histidina e marcada com selênio-metionina, para assim gerar 13 novas condições de cristalização, das quais duas geraram dois cristais que difrataram. Uma condição foi 0,05 M ácido cítrico, 0,05 M Bis Tris propano pH 5,0 e 16 % (p/v) PEG 3350 tendo uma resolução máxima de 1,9 Å. A segunda condição de refinamento foi 0,22 M de CaCl₂ e 24 % (p/v) PEG 3350 que teve um

padrão de difração até 2,4 Å. Além disso, utilizando a técnica de proteólise *in situ*, foi obtido um cristal adicional da proteína sem conter selênio metionina na condição 0,10 M citrato de amônio, 24 % (p/v) PEG 3350 na presença de uma razão tripsina: Xac0573 de 1/1000. O cristal produzido por proteólise *in situ* foi imerso em uma solução de NaI para poder utilizar a difração anômala única (SAD) ou espalhamento anômalo com substituição isomorfa única (SIRAS) para determinar as fases (Figura 52).

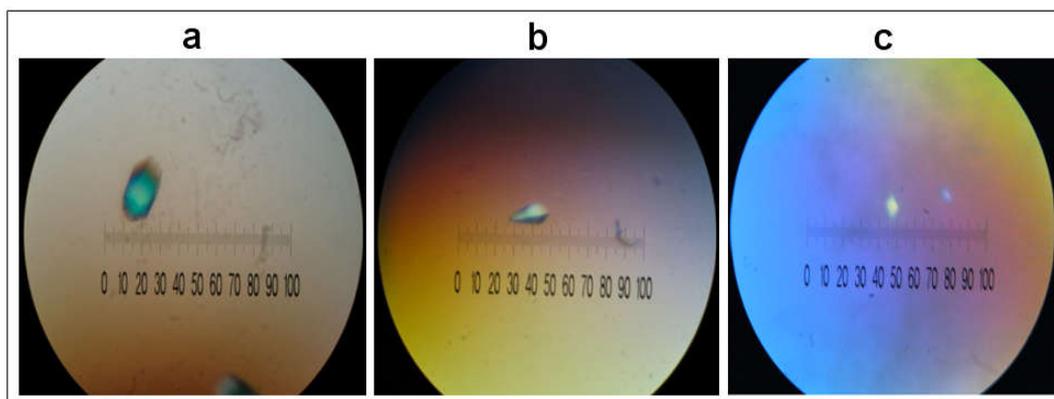


Figura 52. Cristais de Xac0573⁴⁹⁻²³² obtidos por refinamento tradicional e proteólise *in situ*. a) Cristal gerado na condição 0,22 M de CaCl₂ e 24 % (p/v) PEG 3350. b) Cristal formado na condição 0,05 M de ácido cítrico, 0,05 M Bis Tris propano pH 5,0 e 16 % (p/v) PEG 3350. c) Cristal produzido da proteólise com tripsina (1/1000) na condição 0,10 M citrato de amônio e 24 % (p/v) PEG 3350.

4.6.1.3 Cristais da proteína Xac0574¹⁻³⁰⁹

Os testes iniciais de cristalização de Xac0574¹⁻³⁰⁹ foram desenvolvidos em presença e ausência de CaCl₂, por motivo de que muitas das fosfolipases que já foram caracterizadas precisam de um íon bivalente para estabilizar a sua tríade catalítica no momento da reação enzimática (Jaeger et al., 1994; Scott et al., 1990). Além disso, os ensaios de cristalização foram feitos usando a proteína antes e depois de ser tratada com a resina de trombina para remover a cauda de histidina, devido a que a reação de corte da cauda com a resina de trombina tinha um rendimento muito baixo deixando uma porção majoritária ainda com cauda. Os ensaios de cristalização na presença de CaCl₂ somente produziram cristais de sal. Nos ensaios feitos na ausência do íon houve formação de cristais, mas sempre foram muito pequenos apesar de ter dois processos de refinamento (Figura 53).

Por outro lado, também foram conduzidos testes de cristalização de Xac0574^{His 1-309} na presença do fosfolipídio POPC, já que dos fosfolipídios testados previamente, este foi o que precisou de um maior tempo para ser hidrolisado completamente. Tendo em conta o pressuposto anteriormente mencionado, no momento de fazer as últimas placas do screening inicial, a mistura ficou transparente indicando que provavelmente ficava muita

pouca quantidade do substrato sem hidrolisar, apesar de que a mistura ficou à 4 °C. Essa mudança macroscópica da reação é ocasionada principalmente pela quantidade de enzima e substrato utilizados. Ainda assim, o screening foi concluído e armazenado a 18°C. Ao inspecionar as placas após de uma semana, três semanas, cinco semanas e 12 semanas não houve a formação de nenhum cristal, mas muitas das condições avaliadas geraram um precipitado, que é um indicativo que a concentração da proteína era muito alta. Portanto, foi diminuída a concentração da proteína e aumentada a concentração do substrato para a nova avaliação das condições de cristalização, das quais tampouco teve crescimento de cristais. Futuramente, novas abordagens para tentar obter um cristal do complexo enzima-substrato podem incluir a remoção da cauda de histidina antes de fazer a mistura de reação, adicionar algum detergente para estabilizar melhor a superfície de interação, assim como mudar o fosfolipídio por um substrato que não seja hidrolisável pela enzima, ou usar um mutante inativo da enzima.

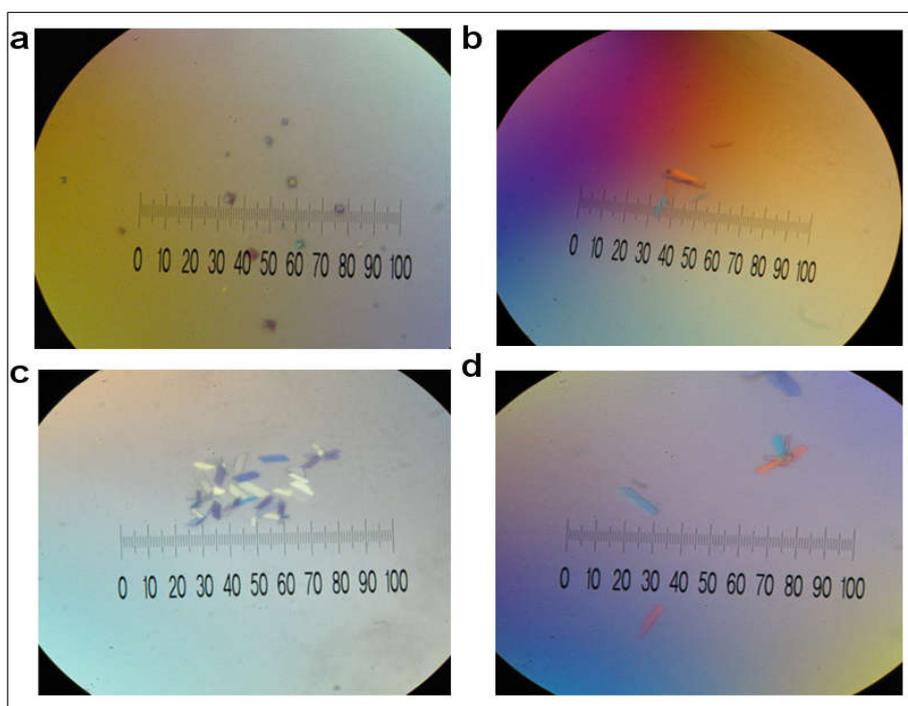


Figura 53. Cristais de Xac0574¹⁻³⁰⁹ obtidos por refinamento tradicional. a) Cristal de sal. b) Cristal obtido no teste inicial com o kit Crystal screen 2 na condição 0,2 M fosfato de amônio monobásico, 0,1 M Tris pH 8,5 e 50 % (v/v) MDP. c,d) Refinamento da condição b variando o pH e a porcentagem de MDP.

4.6.1.4 Cristais do complexo Xac0574¹⁻³⁰⁹-Xac0573⁴⁹⁻²³²

As frações eluídas da co-purificação de Xac0574-Xac0573 por cromatografia de exclusão molecular que aparentemente apresentavam uma porção equivalente das duas

proteínas no gel de poliacrilamida foram escolhidas para ser concentradas e usadas no teste inicial de cristalografia. Essa estratégia gerou a formação de cristais em algumas das condições (Figura 54), que logo depois foram refinadas pelo método tradicional de pequenas variações na composição da solução de cristalização, porém nas novas condições de refinamento não houve a formação de cristal nenhum.

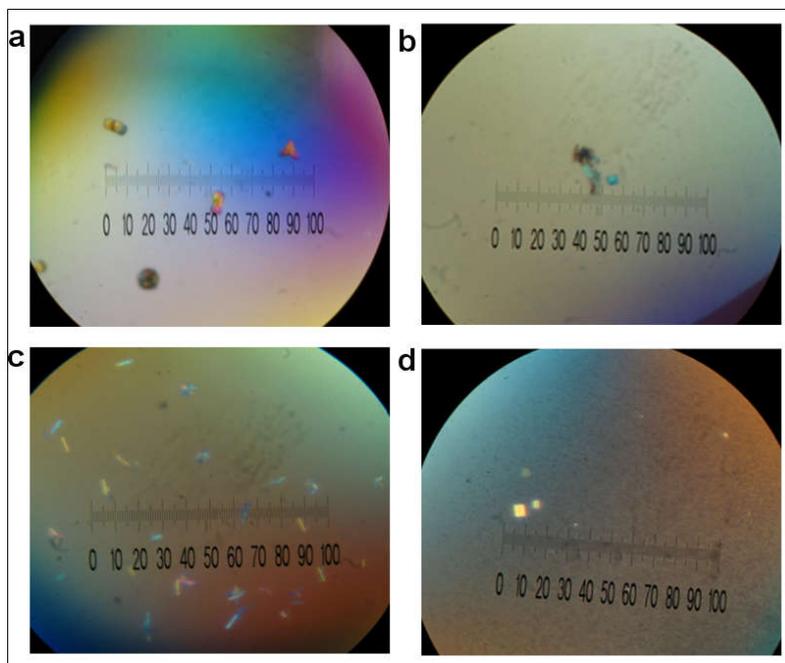


Figura 54. Cristais do complexo Xac0574¹⁻³⁰⁹-Xac0573⁴⁹⁻²³². a) Cristal obtido com o Kit Crystal screen 2 na condição 0,2 M fosfato monobásico de amônio, 0,1 M Tris pH 8,5 e 50 % (v/v) MDP. b) Cristal obtido com o kit Index na condição 0,2 M acetato de amônio monobásico, 0,1 M Bis Tris pH 5,5 e 25 % (p/v) PEG 3350. c) Cristais gerados na condição 0,2 M CaCl₂ e 20 % (p/v) PEG 3350 do kit PEG ION. d) Cristais gerados com o kit PEGRX 2 na condição 0,2 M cloreto de magnésio, 0,1 M citrato de sódio tribásico e 10 % (p/v) PEG 20000.

A possível causa que o refinamento não teve novos cristais é que as concentrações das duas proteínas não fosse a mesma com que foi feito o teste inicial porque ao ser uma co-purificação não há um controle do número de moléculas que estão interagindo e, portanto, não favoreceu o processo de cristalização. Um fato que dá força a essa hipótese é que duas das condições de cristalização onde houve crescimento de cristais do complexo foram as mesmas condições nas quais cristalizou Xac0573 sozinha e permitiu a difração do cristal com boa resolução, o que é um indicativo que a proteína que estava cristalizando era só Xac0573 e não o complexo. Portanto, ao repetir a mesma condição de cristalização e o seu refinamento não foram obtidos novos cristais.

Para tentar ter uma concentração equimolar das duas proteínas, a fosfolipase Xac0574 foi clonada no vetor pET11a para depois ser usada nas três novas abordagens

metodológicas. O primeiro ensaio foi fazer a co-expressão Xac0574 pET11a com Xac0573 pET28a nas cepas *E. coli* BL21(DE3) e *E. coli* BL21(DE3)pLysS, porém a transformação não aconteceu em nenhuma das duas cepas, ainda diminuindo a concentração dos plasmídeos e dos antibióticos para que o processo fosse mais favorável para a bactéria. O problema no processo de transformação das cepas pode ser por causa de uma incompatibilidade dos plasmídeos de expressão usados devido que muitos possuem mecanismos similares ou iguais no controle da replicação, ocasionado uma competição pela maquinaria metabólica comum ou um aumento no número de moléculas que são necessárias no processo de replicação já que os componentes reguladores compartilhados pelos plasmídeos favorece a sua ação em *trans* entre eles, portanto, a replicação de um dos plasmídeos pode ser suscetível de ser inibida pelos elementos reguladores do outro plasmídeo interferindo assim com a regulação autóloga. No final, isso ocasiona que as células filhas não possam manter cópias de os dois plasmídeos e, por conseguinte, não podem sobreviver à seleção por antibiótico (Camps, 2010; Kittell & Helinski, 1993; Singha et al., 2017; Yang, Zhang, Lu, Tao, & Zhao, 2001).

A segunda abordagem foi realizar uma co-purificação das construções Xac0574 pET11a e Xac0573 pET28a por cromatografia de afinidade partindo da mistura das células expressando individualmente cada construção, já que era esperado que no momento da lise das células o complexo fosse formado entre Xac0574 e Xac0573. Infelizmente, o processo de purificação permitiu purificar em sua maioria Xac0573 como mostra a Figura 55, sendo uma possível causa que o tampão de lise não deu a estabilidade necessária para que Xac0574 se mantivesse em sua maioria solúvel, tendo como consequência que após da lise celular foi muita pouca a quantidade do complexo de Xac0574/Xac0573 formado comparada com uma quantidade maior de Xac0573 livre ao ligar-se à coluna.

A última tentativa foi purificar inicialmente Xac0574 pET11a por troca aniônica para logo fazer uma cromatografia de afinidade com Xac0573 pET28a e por último uma cromatografia de exclusão molecular do complexo formado. Infelizmente, a quantidade de Xac0574 gerada pela bactéria e recuperada da lise é baixa, pelo que a gradiente de sal na troca aniônica não permite separar a Xac0574 das proteínas contaminantes além de gerar uma perda da proteína de interesse.

Em virtude do mencionado anteriormente, uma abordagem futura para purificar o complexo Xac0574-Xac0573 será clonar as duas proteínas em um mesmo vetor para que seja produzida a mesma quantidade de moléculas de cada proteína e simultaneamente o

complexo se forme, gerando um processo de purificação mais simplificado.

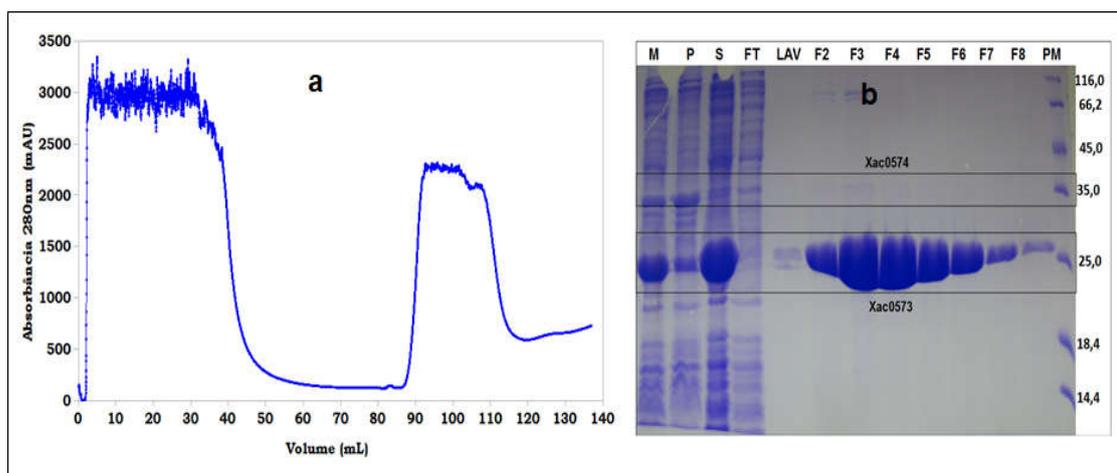


Figura 55. Purificação por cromatografia de afinidade do complexo Xac0574 pET11a-Xac0573 pET28a. a) Cromatograma da cromatografia de afinidade HiTrap obtido no comprimento de onda de 280 nm. b) SDS-PAGE das frações que aluíram na cromatografia. M: Mistura de células, P: Material insolúvel, S: Sobrenadante, FT: Flow through, LAV: Lavado, F: Frações. PM: Padrão de massa molecular.

4.6.2 Coleta e processamento de dados cristalográficos

Os cristais obtidos das proteínas Xac1918¹⁻⁴⁷³ e Xac0573⁴⁹⁻²³² foram levados ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, LNLS (Campinas, Brasil) e analisados na linha de luz MX-2 utilizando o detector Pilatus. Do cristal de Xac1918¹⁻⁴⁷³ foram coletadas 1120 imagens que ao serem processadas permitiram determinar que o cristal é monoclinico com uma resolução máxima de 2,6 Å e um grupo espacial P2₁. A proteína cristalizada apresentou 47 % do solvente e uma molécula por unidade assimétrica, sendo isso determinado pelo coeficiente de Matthews no programa MATTPROB (Kantardjieff & Rupp, 2003). Devido à ausência de um modelo com uma identidade maior que 20 % para ser usado em um processo de substituição molecular, foram obtidos novos cristais incorporando selênio-metionina, mas sem gerar um bom padrão de difração. As informações adicionais correspondentes do processamento dos dados estão na tabela 16.

Do mesmo modo que Xac1918, Xac0573 não possui um modelo com uma identidade maior que 20 %, conseqüentemente, foram desenvolvidos experimentos de cristalização da proteína com a incorporação de selênio-metionina, sendo que Xac0573 possui só uma metionina na sua composição de aminoácidos. O padrão de difração do cristal contendo selênio-metionina foi coletado em 683 imagens empregando somente o comprimento de luz de 0,979 Å, o qual é o pico máximo do sinal anômalo gerado pelo selênio. A resolução

máxima atingida pelos dados foi de 2,30 Å, com um grupo espacial P3₂21, com uma molécula por unidade assimétrica e 56 % do solvente segundo os valores calculados pelo coeficiente de Matthews segundo o programa MATTPROB (Kantardjieff & Rupp, 2003).

Tabela 16. Dados estatísticos da coleta do cristal nativo de Xac1918¹⁻⁴⁷³. Os dados para a camada de maior resolução são mostrados em parênteses.

Característica cristalográfica	Coleta de dados
Comprimento de onda (Å)	1,458
Grupo espacial	P2 ₁
Parâmetros da cela unitária	
a (Å)	38,02
b (Å)	61,54
c (Å)	101,74
α (Å)	90,00
β (Å)	97,22
γ (Å)	90,00
Faixa de resolução (Å)	50,0 – 2,60 (2,76 – 2,60)
Número de reflexões	
Total	93888 (15457)
Única	14436 (2296)
Completeza (%)	99,4 (98,7)
Redundância	6,54 (6,73)
I/σI	6,85 (1,86)
R _{meas} (%)	23,1 (101,1)
CC(1/2) (%)	99,1 (90,3)

Enquanto era processado o conjunto de dados para resolver as fases por Se-SAD (ver secção 4.6.2), foram também feitos experimentos de “quick cryo-soaking” utilizando iodeto de sódio. De tal forma então foi adicionado 700 mM de NaI na condição de cristalização de Xac0573 com proteólise *in situ* com tripsina, para assim tentar resolver as fases usando o Iodeto na dispersão anômala única (SAD). O cristal difratou com uma resolução até 1,90 Å, 400 imagens foram coletadas e os dados foram processados no grupo espacial de P6₂22. Informações adicionais do processamento dos dados da coleta para os dois cristais de Xac0573 estão na tabela 17.

O método escolhido para a resolução estrutural de Xac0573 foi Se-SAD. A posição do selênio e as fases iniciais estimadas foi encontrada pelo programa HKL2MAP (Pape & Schneider, 2004) e submetida ao Parrot (Cowtan, 2010), o qual melhorou as fases iniciais por modificação da densidade eletrônica. A partir dessas fases, foi utilizado Buccaneer (Cowtan, 2006) que traça de forma estatística a cadeia principal por identificar e conectar a posição dos carbonos alfa. Esse modelo inicial obtido foi utilizado pelo PHENIX (Adams et al., 2002) para gerar um modelo atômico de Xac0573⁴⁹⁻²³². Este modelo foi refinado por ciclos iterativos com os programas COOT (Emsley & Cowtan, 2004) e PHENIX (Adams et al., 2002). O refinamento dos dados estão descritos na tabela 18.

Tabela 17. Dados estatísticos da coleta dos cristais de Xac0573⁴⁹⁻²³² incorporando selênio-metionina e a proteólise *in vitro*. Os dados para a camada de maior resolução são mostrados em parênteses

Característica cristalográfica	Coleta de dados do cristal Xac0573 nativo contendo selênio-metionina	Coleta de dados do cristal Xac0573 com proteólise <i>in situ</i> contendo NaI
Comprimento de onda (Å)	0,979	1,450
Grupo espacial	P3 ₂ 21	P6 ₂ 22
Parâmetros da cela unitária		
a (Å)	58,62	56,98
b (Å)	58,62	56,98
c (Å)	114,71	97,66
α (Å)	90,0	90,0
β (Å)	90,0	90,0
γ (Å)	120,0	120,0
Faixa de resolução (Å)	50,0 – 2,30 (2,44 – 2,30)	50,0 – 1,90 (2,01 – 1,90)
Número de reflexões		
Total	77464 (12589)	145672 (14445)
Únicas	19599 (3181)	13983 (2238)
Completeza (%)	99,8 (99,3)	99,9 (99,3)
Redundância	3,95 (3,95)	10,41 (6,45)
I/σ	10,32 (2,08)	20,61 (2,33)
R _{meas} (%)	12,2 (75,2)	8,1 (77,1)
CC(1/2) (%)	99,5 (68,4)	99,9 (76,2)

Tabela 18. Refinamento dos dados de difração de raios-X de Xac0573⁴⁹⁻²³²

Característica cristalográfica	Coleta de dados do cristal Xac0573 nativo contendo selênio-metionina
R_{work} / R_{free}	21,4 / 26,3
R_{rmsd}	
Comprimento de ligação (Å)	0,017
Ângulo de ligação (°)	1,316
Número de átomos:	
Proteína	1396
Água	63
Ramachandran (%)	
Favoráveis	94,89
Permitidas	5,11
Não permitidas	0,00

4.6.3 Estrutura de Xac0573⁴⁹⁻²³²

A topologia que apresenta Xac0573 é de 8 fitas que formam duas folhas β antiparalelas e uma pequena hélice α de 6 resíduos ($\alpha 2$) entre as fitas $\beta 6$ e $\beta 7$, assim como dois segmentos que completam apenas uma volta correspondentes à $\alpha 3$ e $\alpha 4$ entre as fitas $\beta 7$ e $\beta 8$ (Figura 56 e Figura 57). A hélice $\alpha 1$, predita entre os aminoácidos 9 e 26 segundo a análise de estrutura secundária (Figura 16), faz parte do peptídeo sinal que foi removido da construção utilizada.

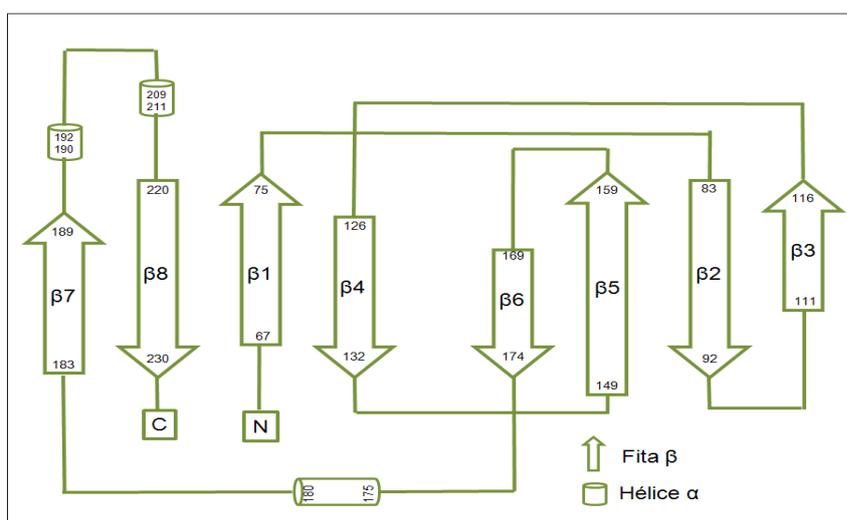


Figura 56. Diagrama da topologia de Xac0573. O enovelamento majoritariamente em arquitetura de β sanduíche

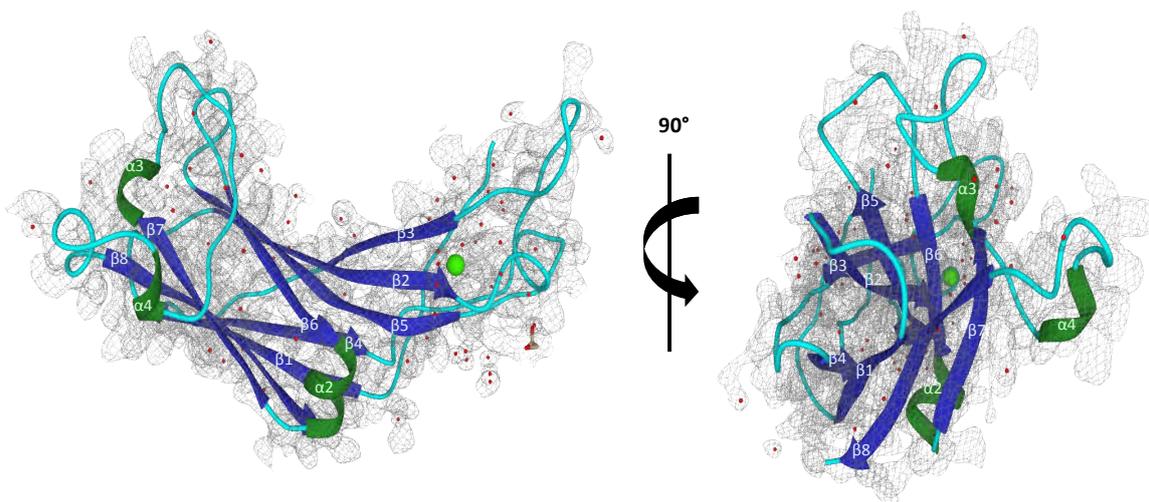


Figura 57. Modelo em cartoon de Xac0573 que destaca as estruturas secundárias após da rotação de 90°. Estruturas resolvida por Se-SAD à 2,4 Å de resolução. Em azul escuro as folhas β , em verde as hélice α , em azul claro as alças, em vermelho as moléculas de água e em verde claro o átomo de cálcio

A análise da estrutura de Xac0573 no programa PDBePISA server (Krissinel & Henrick, 2007) determinou que a área da superfície acessível ao solvente foi de 9892,6 Å², indicando que dos 177 aminoácidos da estrutura, 169 (95.5 %) deles estão expostos pelo menos parcialmente à superfície com uma energia de solvatação, ΔG , de -153,1 kcal/mol. A área da superfície acessível ao solvente (ASA) em uma proteína corresponde aos átomos da proteína que estão na superfície e podem ter interações com as moléculas de água a uma distância de 1,4 Å, já que pode gerar os contatos máximos de van der Waals sem penetrar em nenhum outro átomo. É bem conhecido que enterrar os resíduos hidrofóbicos é um fator muito importante para o enovelamento das proteínas, já que fornece a maior parte da energia livre necessária para dobrar a proteína, assim os grupos hidrofóbicos que estão expostos na superfície aquosa ficam protegidos no interior formando um núcleo que previne que moléculas de água do solvente fiquem em cavidades não polares (Islam & Weaver, 1990; Moret & Zebende, 2007; Samanta, Bahadur, & Chakrabarti, 2002). Consequentemente o processo gera uma estabilização na proteína proporcional à perda da área da superfície acessível (ASA) que acontece logo no enovelamento (Ali, Hassan, Islam, & Ahmad, 2014; Chothia, 1975).

O anterior acontece porque os grupos não polares se distribuem na mesma proporção entre a superfície acessível da proteína nativa como em seu interior, enquanto os grupos polares contribuem significativamente menos na superfície e os grupos carregados têm uma contribuição de duas vezes mais. Como consequência, a porção da proteína que é

protegida pelo processo de enovelamento tem a mesma fração não polar que na superfície que permanece acessível, porém há mais grupos polares e carregados que não são levados ao interior (Chothia, 1975; Miller, Janin, Lesk, & Chothia, 1987). Para ter uma noção se a ASA determinada de Xac0573 está em proporção com sua massa molecular de 20320 Da, foi feita uma comparação com diferentes proteínas monoméricas tendo como parâmetros principais uma massa molecular similar a Xac0573 e sua correspondente ASA como mostra a tabela 19.

Tabela 19. Área de superfície acessível de proteína monoméricas. MM: Massa molecular. ASA: Área de superfície acessível ao solvente

Proteína	MM (Da)	ASA (Å)	Referência
Papaina	23270	9140	(Bryant, Islam, & Weaver, 1989)
Precursor de acitidina	23737	9031	(Miller et al., 1987)
Gamma B cristalina de lente de olho bovino	20992	8760	(Islam & Weaver, 1990)
Proteína de ligação ao retinol	20050	9160	(Miller et al., 1987)
Tripsinogeno bovino	24012	9412	(Bryant et al., 1989)

Segundo os dados apresentados, Xac0573 tem uma área de superfície acessível no intervalo esperado para seu peso molecular apesar de ter uma porcentagem maior com respeito às proteínas comparadas. A diferença de porcentagem se deve a que a determinação da área da proteína depende da conformação adoptada por ela no processo de cristalização, além da escala de hidrofobicidade dos aminoácidos empregada no cálculo e o algoritmo mesmo da quantificação da área (Ali et al., 2014).

Em proteínas pequenas aproximadamente 55 % dos aminoácidos são parcialmente expostos ao solvente e nas proteínas maiores a porcentagem muda para 77 %. Ainda assim, no processo de enovelamento são muito poucos os resíduos em que seu ASA é efetivamente zero, no caso das proteínas menores, elas possuem apenas um ou dois resíduos completamente inacessíveis e no caso das proteínas maiores apenas é 15 %. Aqueles resíduos que ficam no interior das proteínas, em geral são resíduos não polares alifáticos e aromáticos, enquanto os resíduos polares (carregados) estão na superfície, já que interagem com o solvente por serem aceptores de ligações de hidrogênio ou por ter grupos doadores nas cadeias laterais ajudando na estabilidade (Islam & Weaver, 1990; Moret & Zebende, 2007; Samanta et al., 2002).

Os aminoácidos valina, leucina, isoleucina, fenilalanina e cisteína constituem aproximadamente o 37 % dos resíduos protegidos no interior das proteínas, mas também outros resíduos abundantes são alanina e glicina com 21 %, serina e treonina com 10 %, e

sem esquecer que todos eles também são muito comuns na superfície. Por outro lado, a superfície da proteína é rica em resíduos carregados, e em média, aspartato, glutamato, lisina e arginina constituem 27 % da superfície da proteína e apenas 4 % do interior (Miller et al., 1987).

Segundo a superfície acessível ao solvente determinada para Xac0573, ela tem exposta 169 resíduos (95,5 %), indicando que 8 resíduos estão completamente enterrados no interior da proteína, os quais foram identificados no modelo gerado. No centro do sanduíche β da estrutura é possível identificar claramente um núcleo hidrofóbico composto pelos resíduos Val70, Ala86, Val117, Leu131, Ala 154, Val156, Ile 173 e Leu225 (Figura 58).

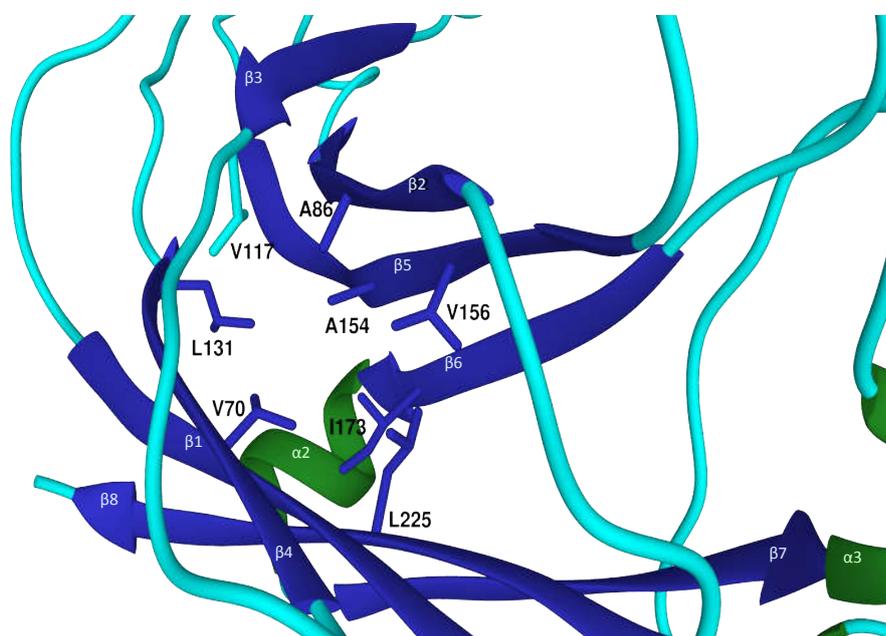


Figura 58 Núcleo hidrofóbico da estrutura de Xac0573. Os resíduos que compõem o núcleo são: Val70, Ala86, Val117, Leu131, Ala154, Val156, Ile173 e Leu225.

Além disso, Xac0573 possui duas cisteínas, Cys98 e Cys147, que formam uma ponte dissulfeto entre duas alças da estrutura, mas a ligação está completamente exposta ao solvente como mostra a Figura 59. Isso é interessante porque este tipo de ligação geralmente é associado com um valor muito alto na escala de hidrofobicidade como uma das ligações que geralmente é protegida no interior das proteínas (Samanta et al., 2002).

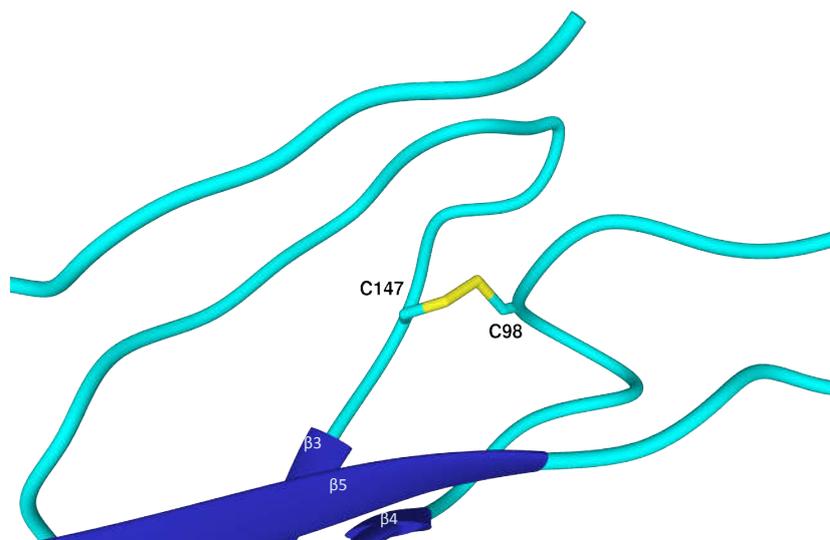


Figura 59 Ponte dissulfeto entre os resíduos da cisteína 98 e cisteína 143

Adicionalmente, na superfície de Xac0573 se apresenta uma interação com um íon de cálcio procedente da solução de cristalização, que poderia indicar um possível motivo de ligação ao cálcio (Figura 60). Na literatura há descritos três motivos de ligação ao cálcio em proteínas de bactérias Gram negativas. O primeiro corresponde ao motivo de repetições em toxina (RTX), no qual no C-terminal há várias repetições do motivo GGxGxDxUx como já foi mencionado na introdução na descrição dos domínios conservados de Xac1918. O segundo motivo corresponde a “EF-hand”, que está composto por duas hélices α quase perpendiculares separadas por uma alça de 12 resíduos e que são organizadas em domínios pareados para facilitar o contato entre elas. Os resíduos 1,3,5,7,9 e 12 da alça ligam ao cálcio pela formação de uma geometria de coordenação bipiramidal pentagonal que tem uma sequência consenso DxDxDxxx(S/I/D/E)xx(D/E) (onde x pode ser qualquer resíduo). A última possibilidade é que as proteínas podem ligar cálcio por ter átomos de oxigênio disponíveis proporcionados por resíduos de glutamato ou aspartato em sequência, como foi descrito no antiportador de membrana de *E. coli* ChaA $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, que tem o motivo ácido de ligação EHEDDSDDDD, no entanto, esse motivo não é tão fácil de definir nos dados estruturais (Michiels et al., 2002).

A região onde está acontecendo à interação com o cálcio segundo o diagrama de potencial de carga da proteína (Figura 60), mostra uma carga negativa na região superficial por conta do resíduo Glu95 que é quem interage com o cálcio, enquanto 4 moléculas de água da superfície estão coordenando e estabilizando a interação. Os outros resíduos que

estão perto da interação são a Val92 e a Ile111 que por sua condição não polar não estão interagindo com o cálcio. Também foi procurada na sequência de aminoácidos uma organização similar a algum dos motivos de ligação descritos anteriormente perto da alça onde está a interação, já que todos os domínios compartilham a característica de ligar ao cálcio nas alças, mas a sequência da alça perto da região tampouco apresenta algum dos motivos. Por tanto, a análise da estrutura da proteína e dos resíduos que compõem os motivos de ligação ao cálcio descritos, indica que a presença do cálcio na estrutura de Xac0573 é só um tipo de interação eletrostática gerada pelo processo de cristalização e provavelmente sem relevância na sua função biológica.

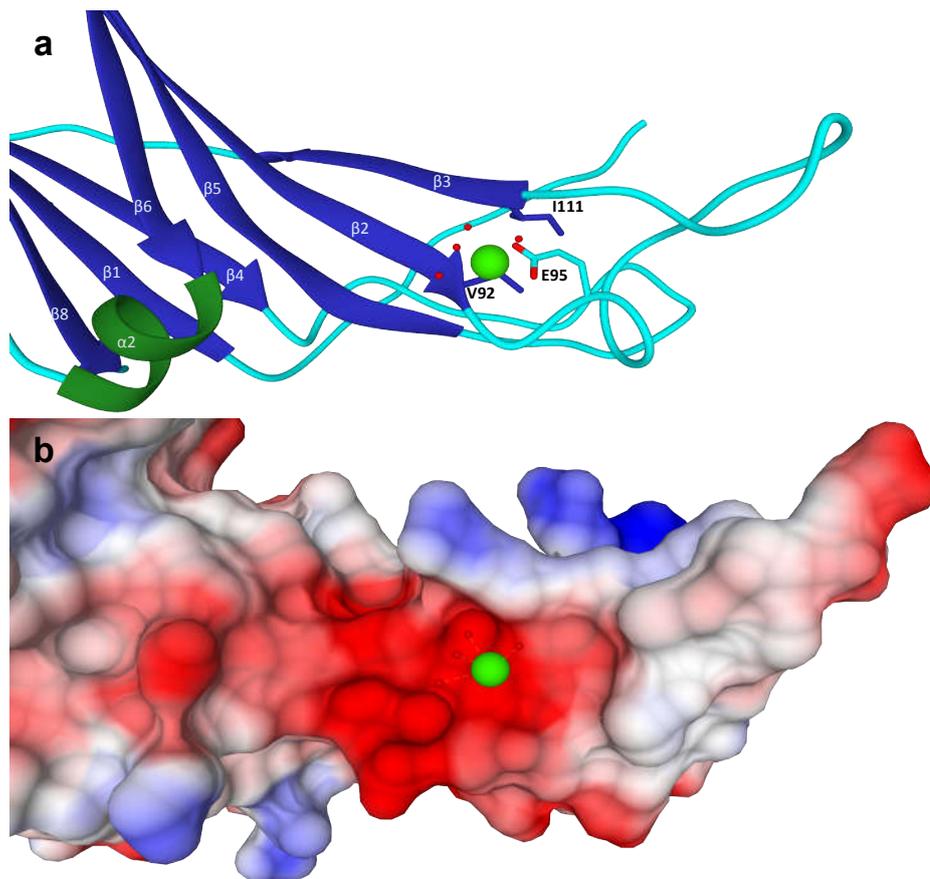


Figura 60. Interação eletrostática entre Xac0573 e um íon de cálcio favorecido pelas condições de cristalização. a) Interação do átomo de cálcio com o Glu95. Os resíduos pertos à interação são Val92 e Ile111. b) Mapa de potencial eletrostático da região envolvida na interação com o cálcio. Em vermelho são apresentadas as moléculas de água.

Ao realizar uma busca pelo Dali server (http://ekhidna.biocenter.helsinki.fi/dali_server) (Holm & Laakso, 2016), para procurar topologias similares da Xac0573 no banco de dados do Protein Data Bank (PDB), o alinhamento estrutural determinou um enovelamento semelhante ao do domínio C2 que são

estruturalmente definidos como membros da superfamília beta do domínio C2 dos domínios de ligação Ca^{2+} / lípido (CaLB) (tabela 20).

Tabela 20. Alinhamento estrutural de Xac0573 realizado no Dali Server. Z-Score: Medida da confiança do resultado da busca. RMSD ("Root mean square deviation"): Medida da distância média da posição entre os átomos da cadeia principal da proteína e Xac0573. Lali: Número de posições alinhadas nos dois modelos. Nres: Número de resíduos na estrutura. %i d: Identidade entre as duas proteínas.

PDB	Z-Score	rmsd	lali	nres	%id	Descrição
3pyc-A	6,1	3,4	100	132	6	E3 Ubiquitin ligase Smurf1
3b7y-A	5,7	3,2	98	144	8	E3 Ubiquitin ligase NEDD4
5izr-A	5,6	3,5	94	674	7	Fosfolipase citosolica δ -A2
5ue8-A	5,4	4,6	99	847	10	Proteína UNC-13 homologa A
5t21-A	5,3	3,6	103	830	10	Proteína de soque térmico HPS90- α

Os domínios C2 estão formados de 120 a 130 resíduos que podem estar presentes em uma ou múltiplas cópias em uma mesma proteína e estão associados a outros domínios de diferente natureza, já que atuam como amarras na membrana para diversos domínios enzimáticos como quinases, fosfatases, peptidases, ligandos E3 de ubiquitina e fosfolipases, assim como para domínios que regulam a sinalização intracelular. O domínio C2 está principalmente envolvido na tradução de sinais do tipo GTPase e processos de ligação aos lipídios de membrana que relacionam diferentes atividades subcelulares como à ancoragem do citoesqueleto nas membranas, tráfico vesicular de movimentos organelares e reparo da membrana. Essas funções fundamentais para a manutenção da célula eucariótica, sugerem que a proliferação da família do domínio C2 acompanha o surgimento da complexidade intracelular da célula eucariótica, desse modo, os domínios C2 não foram, até agora, associados com bactérias (Corbalan-Garcia & Gomez-Fernandez, 2014; Essen, Perisic, Cheung, Katan, & Williams, 1996; Zhang & Aravind, 2010; Zhao, Qiao, Oyajobi, Mundy, & Chen, 2003).

Apesar de ter uma similaridade restrita entre os domínios C2, eles compartilham a mesma estrutura de um sanduíche β com um centro compacto composto por duas folhas β contendo cada folha quatro fitas β antiparalelas que estão conectadas por regiões variáveis formando alças com uma ou mais hélices α . A superfamília inclui as variantes do tipo sinaptotagmina C2A também referidas como Família S ou topologia tipo I e as variantes do tipo PLC denominadas como família P ou de topologia do tipo II. A diferença entre as

topologias está determinada pela conectividade entre as folhas β , já que a primeira fita β na topologia I ocupa a mesma posição estrutural da fita $\beta 8$ na topologia II como representa a Figura 61 e por isso são interconvertíveis quando é cortado o loop entre as fitas $\beta 1$ e $\beta 2$ da topologia I (Essen et al., 1996; Nalefski & Falke, 1996; Zhang & Aravind, 2010).

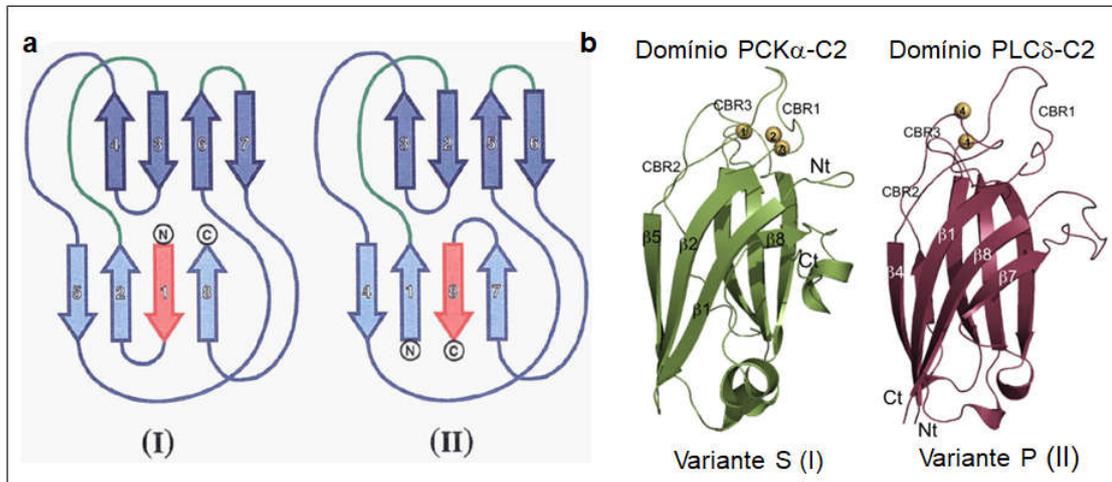


Figura 61. Estrutura e topologia dos dois domínios C2 determinados por cristalografia de raios X. a) Representação das duas topologias do domínio C2, (I) Sinaptotagmina I –Tipo I (PDB 1DYS), (II) PLC- $\delta 1$ – Tipo II (PDB 1DJ1) (Nalefski & Falke, 1996). b) Representação da estrutura em cartoon da topologia I da PCK α e a topologia II da PLC δ (Corbalan-Garcia & Gomez-Fernandez, 2014).

A formação do empacotamento estrutural e o núcleo hidrofóbico (descrito anteriormente em Xac0573) que caracteriza aos domínios C2 das outras estruturas de sanduíche β é devido aos aminoácidos localizados principalmente na porção que conecta a cadeia $\beta 3$ com a cadeia $\beta 4$, junto com os segmentos de hélices conservado e certos resíduos aromáticos nas fitas 2, 4 e 7. Também foram identificados dois resíduos hidrofóbicos altamente conservados no início da fita $\beta 2$ e no final da fita $\beta 5$ que estão expostos na superfície e têm dois tipos diferentes de interações na estrutura. O primeiro tipo envolve outros resíduos hidrofóbicos ou aromáticos por meio de interações de empilhamento π - π , enquanto o segundo tipo de interação permite a estabilização conformacional da estrutura por estar expostos na superfície em uma curvatura côncava que permite as interações com os ligandos, gerando uma depressão pouco profunda num lado do sanduíche. Conjuntamente a estrutura apresenta um segmento helicoidal conservado que bloqueia uma das extremidades do sanduíche β , deixando apenas a outra extremidade disponível para a interação com os lipídios (Zhang & Aravind, 2010).

As alças são os sítios putativos de ligação ao cálcio por ser uma região carregada negativamente, onde é possível coordenar até três íons Ca^{2+} entre duas alças, por isso elas

são nomeadas como “alças superiores” e geralmente a alça 1 possui dois dos cinco resíduos de aspartato conservados envolvidos na coordenação. Na topologia I as alças de ligação estão entre as fitas $\beta 2$ e $\beta 3$ (alça 2) e as fitas $\beta 6$ e $\beta 7$ (alça 6) enquanto para a topologia II estão entre as fitas $\beta 1$ e $\beta 2$ (alça 1) e as fitas $\beta 5$ e $\beta 6$ (alça 3) (Figura 61). Embora que há domínios C2 sem a capacidade de ligar cálcio, a ligação não depende unicamente de gerar uma carga superficial negativa, já que mutações de quatro resíduos por aspartatos na região putativa de ligação ao Ca^{2+} não foram suficientes para estabelecer a faculdade de ligação, indicando que são necessárias também outras propriedades físicoquímicas e estruturais da proteína (Helfmann et al., 2011; Nalefski & Falke, 1996; Zhang & Aravind, 2010)

A maioria dos domínios C2 da PKC (Proteína kinase C, topologia I) são reconhecidos por ser recrutados nas membranas dependendo da concentração do Ca^{2+} , devido que a coordenação dos íons pela carga negativa permite as interações eletrostáticas com a fosfatidilserina (fosfolípido majoritário da membrana nos eucarióticos). O Ca^{2+} age como uma ponte conectando a proteína e os lipídios da membrana, já que o grupo fosforil da fosfoerina preenche a esfera de coordenação incompleta do Ca^{2+} no sítio de ligação um do domínio C2. Outros quatro resíduos estabelecem diretamente ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas com os grupos acil *sn-1* e *sn-2* e o éster carbonil do fosfolípido, assim como também há alguns resíduos básicos na extremidade oposta do sítio de ligação ao cálcio que são necessários para a penetração na membrana (Corbalan-Garcia & Gomez-Fernandez, 2014; Zhang & Aravind, 2010). No entanto, a análise da estrutura do PKC-C2 independente Ca^{2+} permitiu propor que os resíduos básicos na região que normalmente acontece a ligação do íon pode fazer contatos diretos com a membrana, sendo isso confirmado na família PI3K – C2, já que interage por um loop básico entre as fitas $\beta 5$ e 6 que estão localizadas na região de ligação ao Ca^{2+} na extremidade do PKC-C2 (Helfmann et al., 2011; Zhang & Aravind, 2010).

Com a finalidade de identificar possíveis características de similitude estrutural baseada na descrição prévia dos domínio C2, foi feita uma sobreposição de Xac0573 com o domínio C2 da E3 Ubiquitin ligase Smurf1 de humanos (PDB 3pyc-A) como esquematiza a Figura 62-a, por ter o menor r.m.s.d. identificado no alinhamento estrutural feito pelo Dali server (Tabela 20), indicando que há várias regiões entre as proteínas que divergem, principalmente as alças entre as fitas β . À par foi feito uma análise do alinhamento das sequências não redundantes de proteínas semelhantes à Xac0573 empregando o programa MUSCLE (Edgar, 2004), o qual permitiu identificar regiões altamente conservadas na alça

que conecta as fitas $\beta 4$ e $\beta 5$, que é mantida fixa pela ponte de dissulfeto entre as cisteínas 98 e 147, além da extremidade entre as fitas $\beta 1$ e $\beta 2$, e $\beta 5$ e $\beta 6$ (Figura 62-b,c) (Ashkenazy et al., 2010), constituindo duas interfaces que possivelmente devem ser responsáveis por interagir com Xac0574 bloqueando o acesso de fosfolipídios ao efetor ou impedindo rearranjos estruturais na proteína que são necessários para sua atividade. Aquelas regiões conservadas nas fitas $\beta 1, \beta 2$, $\beta 5$ e $\beta 6$ assim como a topologia determinada por cristalografia de raios x de Xac0573 permitiu identificar que na topologia de classificação dos domínio C2, Xac0573 é tipo II.

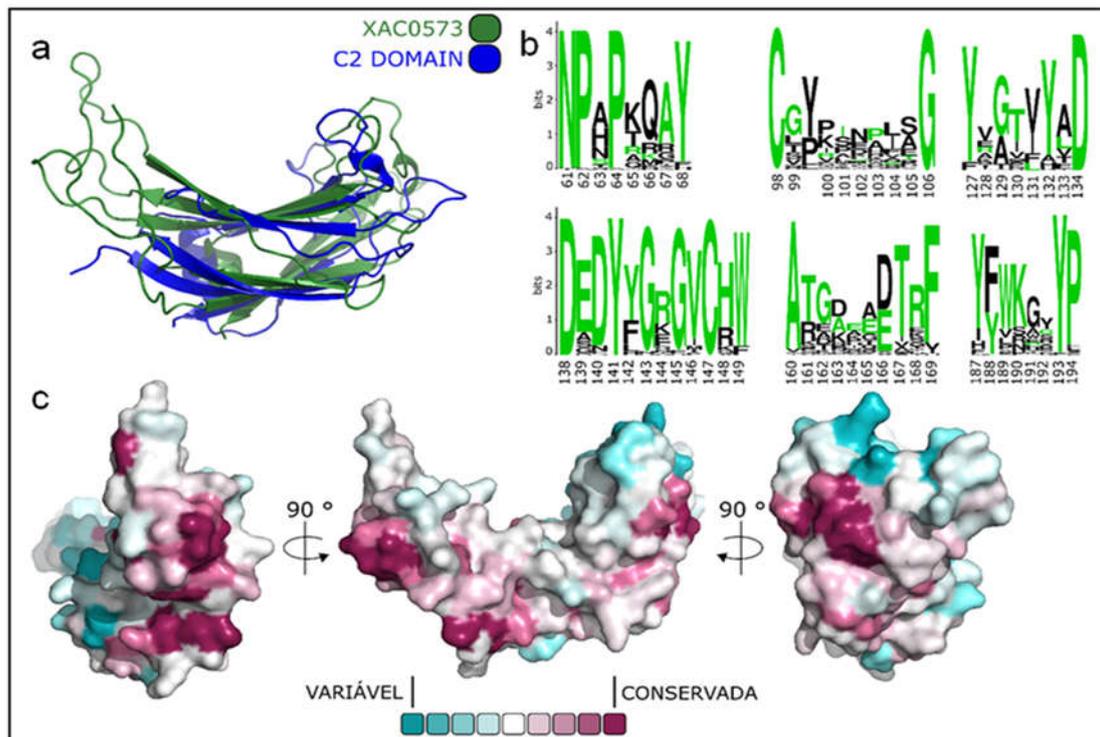


Figura 62. Análise de resíduos conservados de Xac0573. a) Sobreposição entre Xac0573⁴⁹⁻²³² e domínio C2 de E3 Ubiquitin ligase Smurf1 (PDB 3pyc-A). b) Regiões conservadas de Xac0573. c) Mapeamento das regiões conservadas sobre a superfície de Xac0573⁴⁹⁻²³² realizada pelo CONSURF (Ashkenazy, Erez, Martz, Pupko, & Ben-Tal, 2010).

Entre as proteínas que possuem múltiplos domínios incluindo o domínio C2 e que já é conhecida a sua estrutura está a fosfolipase C- δ específica de fosfoinosítide de rato (PI-PLC), a qual tem um domínio catalítico com atividade fosfolipase, antecedido pelo do domínio C2 que apresenta uma topologia tipo II (Figura 63-c). A função principal da PI-PLC é transferir os sinais que são regulados pelos receptores de proteínas G e tirosina quinases através da hidrólise de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PtdInsP₂) para gerar D-*myo*-inositol-1,4,5-trifosfato e *sn*-1,2-diacilglicerol. A PLC- $\delta 1$ está composta por quatro domínios, o primeiro domínio no N-terminal é PH, seguido do domínio de ligação ao cálcio “EF-hand”

com a sua topologia típica de hélice-loop-hélice. O terceiro domínio é um barril TIM (triosefosfato isomerase) catalítico com uma arquitetura $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha\beta$, com seu sítio ativo composto pelos resíduos His 311 e His 356 em uma concavidade ampla no final da fita $\beta 8$, e o último domínio no C-terminal é o domínio C2 com sua topologia de sanduíche β . A disposição espacial dos quatro domínios ocasiona que o domínio “EF-hand” não este em contato com o domínio catalítico enquanto o domínio C2 tem várias interfaces de contato com o domínio catalítico e em menor proporção com o domínio “EF-hand” (Essen 1996) (Figura 63-c). O mecanismo proposto de ação da enzima envolve os quatro domínios, no primeiro passo a enzima é ancorada à membrana pelo domínio PH por uma ligação específica ao PtdInsP₂, enquanto o domínio C2 fixa o domínio catalítico com uma orientação favorável para agir na membrana, com a característica sobressalente que a interface entre o domínio C2 e o domínio catalítico é rígida e extensa. Além disso, o sítio de ligação ao lipídio dependente do cálcio do domínio C2 está do mesmo lado que o sítio ativo do domínio catalítico confirmando a importância de dar uma orientação apropriada na membrana para favorecer a reação enzimática (Essen et al., 1996; Nalefski & Falke, 1996).

Tendo em conta a interface de interação entre o domínio catalítico e o domínio C2 da PI-PLC foi feita uma sobreposição de Xac0573 no domínio C2 da fosfolipase com a finalidade de tentar ter uma melhor compreensão do papel das alças na função inibitória de Xac0573 na interface de interação com Xac0574. A sobreposição das estruturas mostra que ao igual que no domínio C2 da E3 Ubiquitin ligase Smurf1 de humanos, há várias regiões da estrutura que não são compatíveis, incluso as hélices α de Xac0573 tem uma orientação completamente diferente às PI-PLC que corrobora o r.m.s.d. de 3,8 Å (Figura 63-a), porém a sobreposição das estruturas expõe claramente que o sítio catalítico está longe das alças de Xac0573 como é ressaltado na Figura 63-b pelos resíduos de histidina em vermelho.

Tendo em conta o anterior, possivelmente a inibição da atividade enzimática de Xac0574 é alostérica tendo dois possíveis mecanismos, em um mecanismo a interação das alças de Xac0573 com Xac0574 poderia ocasionar uma mudança conformacional que bloqueie o acesso ao sítio catalítico. A segunda proposta é baseada no fato que na estrutura de PI-PLC do lado do sítio catalítico também estão os possíveis sítios de ligação de lipídios no domínio C2 ,então pode aocntecer que a interação fosfolípido-Xac0574-Xac0573 evita que a enzima e o substrato interatuem apropriadamente e, portanto, não há reação, mas para isso se assume que Xac0573 tem a capacidade de interagir com fosfolipídios.

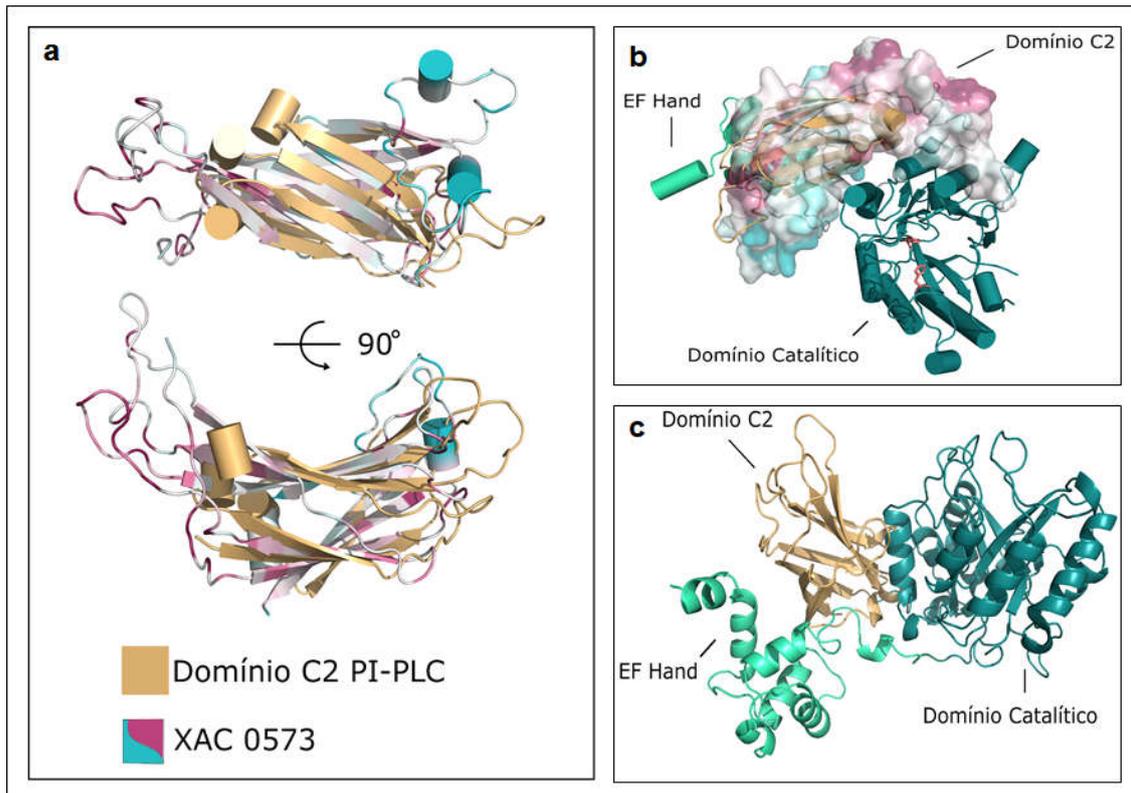


Figura 63 Análise da estrutura de Xac0573⁴⁹⁻²³² e o domínio C2 de PI-PLC. a) Sobreposição da Xac0573⁴⁹⁻²³² e o domínio C2 de PI-PLC. b) Sobreposição de Xac0573 na estrutura de PI-PLC mostrando os domínio "EF-hand", C2 e catalítico. c) Estrutura cristalográfica da PI-PLC (PDB 2ISD).

Estudos futuros serão conduzidos a fim de compreender o papel das alças e as regiões conservadas de Xac0573 em sua função inibitória, servindo como base para a determinação de um novo domínio funcional C2 em procariotos, que permitirá descrever uma nova classe de inibidores de fosfolipases bacterianas.

5. CONCLUSÕES

Entre os possíveis pares efetor/inibidor associados ao sistema de secreção tipo IV de *Xanthomonas citri* empregados na competição interbacteriana que foram propostos pelo estudo de (19), os estudos do par efetor/inibidor Xac0574/Xac0573 permitiu identificar que são duas proteínas majoritariamente enoveladas, com uma predominância na estrutura secundária por folha β , principalmente para Xac0573. As duas proteínas em solução são monômeros e formam um complexo com uma proporção 1:1 o suficientemente estável que permite a sua purificação. A análise termodinâmica indicou que o processo de formação do complexo é exotérmico, altamente favorecido ($\Delta G^\circ = -12\text{Kcal/mol}$) pela formação de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, com uma baixa penalidade entrópica, assim como uma alta afinidade entre as proteínas ($K_d = 2,45\text{nM}$) para gerar o complexo, o que garante que a bactéria fique protegida contra os efeitos nocivos do efetor (Xac0574) quando ele é produzido intracelularmente. Por outro lado, foi determinado que Xa0573 tem maior estabilidade térmica que Xac0574, ocasionando que seja menos suscetível a processos de desnaturação em temperaturas elevadas, favorecendo a sua função inibitória. Interessantemente, os dados coletados até o momento sugerem que Xac0573 perde estabilidade térmica quando faz parte do complexo proteico com Xac0574 enquanto Xac0574 ganha estabilidade térmica.

Uma análise bioinformática de domínios conservados da sequência de Xac0574 permitiu classificar ela dentro da superfamília das lipases tipo III, no entanto, os ensaios de atividade enzimática *in vitro* possibilitaram demonstrar que é uma fosfolipase A_1 sem capacidade de hidrolisar lisofosfolipídios tanto da posição *sn*-1 como *sn*-2. Ela apresenta atividade na faixa de pH entre 5 até 8 na ausência de cloreto de cálcio e deoxicolato de sódio, indicando que não precisa de estabilizantes da superfície de interação com o substrato nem cofatores para a reação catalítica. Além disso, foi identificado que Xac0574 pode hidrolisar os três fosfolipídios majoritários que compõem a membrana interna de bactérias Gram negativas (fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol e cardiolipina), mostrando uma aparente preferência pela fosfatidiletanolamina que é o fosfolipídio mais abundante na membrana. Dita atividade é consistente com a hipótese que o seu alvo intracelular é a membrana citoplasmática, já que nos ensaios de crescimento celular desenvolvidos na cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS, a indução de Xac0574 gerou uma diminuição significativa da população celular, até quase 10 vezes menos que a cultura não induzida com a mesma construção no mesmo tempo de crescimento. Do mesmo modo, foi verificado que Xac0573 não tem atividade fosfolipase nem lisofosfolipase mas inibe efetivamente a atividade

enzimática de Xac0574.

Os ensaios de cristalização e difração por raios X permitiram gerar um modelo da estrutura de Xac0573, a qual está composta por duas folhas β antiparalelas que geram uma topologia de sanduíche β com uma pequena hélice α e duas voltas. Dos 177 aminoácidos que compõem a estrutura, 169 deles estão expostos pelo menos parcialmente à superfície, já que os oito resíduos restantes estão protegidos em um núcleo hidrofóbico no centro, composto pelos resíduos: Val70, Ala86, Val117, Leu131, Ala154, Val156, Ile 173 e Leu225. Além disso, Xac0573 possui duas cisteínas: Cys98 e Cys147 que formam uma ponte dissulfeto, que está completamente exposta ao solvente por sua localização em uma alça.

O alinhamento estrutural de Xac0573 identificou um enovelamento semelhante ao domínio C2, também conhecido como domínio de ligação ao lipídios e cálcio de eucariotos. Este tipo de domínio está comumente associado em proteínas que adicionalmente tem domínios enzimáticos envolvidos em processos de regulação de sinalização de segundos mensageiros lipídicos, proteínas de tráfego de membranas e eventos celulares de fusão de membrana em eucariotos. Portanto, esses domínios não foram, até agora, associados com processos bacterianos e menos com a função de ser um inibidor proteico. É importante ressaltar que as regiões conservadas que foram identificadas em Xac0573 se localizam nas alças, indicando dois possíveis mecanismos de inibição alostéricos, em um a interação das alças de Xac0573 com Xac0574 poderia ocasionar uma mudança conformacional que bloqueie o acesso ao sítio catalítico, enquanto no segundo mecanismo proposto, a interação fosfolípido-Xac0574-Xac0573 evita que a enzima e o substrato interatuem apropriadamente para que aconteça a catálise, assumindo que Xac0573 tem a capacidade de interagir com fosfolipídios. Estudos futuros serão enfocados na caracterização deste novo domínio funcional que será representativo de uma nova classe de inibidores de fosfolipases bacterianas.

Ainda bem que o par Xac1918/Xac1917 não foi caracterizado, foi estabelecido um protocolo para a purificação e cristalização de Xac1918, além de obter um conjunto de dados da proteína efetora que pode ser usado posteriormente para resolver a estrutura.

6. REFERÊNCIAS

- A., D. E. (1983). Phospholipases *The enzymes* (Vol. XVI, pp. 307-353): Academic Press, Inc.
- Abskharon, R. N. N., Soror, S. H., Pardon, E., El Hassan, H., Legname, G., Steyaert, J., & Wohlkönig, A. (2011). Combining in-situ proteolysis and microseed matrix screening to promote crystallization of PrPc-nanobody complexes. *Protein Engineering Design & Selection*, 24(9), 737-741. doi: 10.1093/protein/gzr017
- Adams, P. D., Grosse-Kunstleve, R. W., Hung, L. W., Ioerger, T. R., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., . . . Terwilliger, T. C. (2002). PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 58, 1948-1954. doi: 10.1107/S0907444902016657
- Alegria, M. C., Souza, D. P., Andrade, M. O., Docena, C., Khater, L., Ramos, C. H., . . . Farah, C. S. (2005). Identification of new protein-protein interactions involving the products of the chromosome- and plasmid-encoded type IV secretion loci of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *J Bacteriol*, 187(7), 2315-2325. doi: 10.1128/JB.187.7.2315-2325.2005
- Ali, S. A., Hassan, M. I., Islam, A., & Ahmad, F. (2014). A Review of Methods Available to Estimate Solvent-Accessible Surface Areas of Soluble Proteins in the Folded and Unfolded States. *Current Protein & Peptide Science*, 15(5), 456-476. doi: Doi 10.2174/1389203715666140327114232
- Arpigny, J. L., & Jaeger, K. E. (1999). Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem J*, 343 Pt 1, 177-183.
- Ashkenazy, H., Erez, E., Martz, E., Pupko, T., & Ben-Tal, N. (2010). ConSurf 2010: calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res*, 38, W529-W533. doi: 10.1093/nar/gkq399
- Atmakuri, K., Cascales, E., & Christie, P. J. (2004). Energetic components VirD4, VirB11 and VirB4 mediate early DNA transfer reactions required for bacterial type IV secretion. *Mol Microbiol*, 54(5), 1199-1211. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04345.x
- B, R. (2010). *Biomolecular Crystallography Principles, Practice, and Application to Structural Biology* (S. Scholl Ed.). New York: Garland Science, Taylor and Francis Group.
- Babu, M. M., Priya, M. L., Selvan, A. T., Madera, M., Gough, J., Aravind, L., & Sankaran, K. (2006). A database of bacterial lipoproteins (DOLOP) with functional assignments to predicted lipoproteins. *J Bacteriol*, 188(8), 2761-2773. doi: 10.1128/JB.188.8.2761-2773.2006
- Backert, S., & Meyer, T. F. (2006). Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*, 9(2), 207-217. doi: 10.1016/j.mib.2006.02.008
- Bagos, P. G., Tslrigos, K. D., Liakopoulos, T. D., & Hamodrakas, S. J. (2008). Prediction of Lipoprotein Signal Peptides in Gram-Positive Bacteria with a Hidden Markov Model. *Journal of Proteome Research*, 7(12), 5082-5093. doi: 10.1021/pr800162c
- Bansal, K., Midha, S., Kumar, S., & Patil, P. B. (2017). Ecological and Evolutionary Insights into *Xanthomonas citri* Pathovar Diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(9). doi: UNSP e02993
10.1128/AEM.02993-16
- Benz, R. (2016). Channel formation by RTX-toxins of pathogenic bacteria: Basis of their biological activity. *Biochim Biophys Acta*, 1858(3), 526-537. doi: 10.1016/j.bbamem.2015.10.025
- Berg, O. G., Gelb, M. H., Tsai, M. D., & Jain, M. K. (2001). Interfacial enzymology: the secreted phospholipase A(2)-paradigm. *Chem Rev*, 101(9), 2613-2654.
- Bi, D., Liu, L., Tai, C., Deng, Z., Rajakumar, K., & Ou, H. Y. (2013). SecReT4: a web-based bacterial type IV secretion system resource. *Nucleic Acids Res*, 41(Database issue), D660-665. doi: 10.1093/nar/gks1248
- Biswas, T., & Tsoodikov, O. V. (2010). An easy-to-use tool for planning and modeling a calorimetric titration. *Anal Biochem*, 406(1), 91-93. doi: 10.1016/j.ab.2010.06.050

- Blake, C. C., Johnson, L. N., Mair, G. A., North, A. C., Phillips, D. C., & Sarma, V. R. (1967). Crystallographic studies of the activity of hen egg-white lysozyme. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 167(1009), 378-388.
- Brunings, A. M., & Gabriel, D. W. (2003). *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Mol Plant Pathol*, 4(3), 141-157. doi: 10.1046/j.1364-3703.2003.00163.x
- Bruylants, G., Wouters, J., & Michaux, C. (2005). Differential scanning calorimetry in life science: Thermodynamics, stability, molecular recognition and application in drug design. *Current Medicinal Chemistry*, 12(17), 2011-2020. doi: Doi 10.2174/0929867054546564
- Bryant, S. H., Islam, S. A., & Weaver, D. L. (1989). The Surface-Area of Monomeric Proteins - Significance of Power Law Behavior. *Proteins-Structure Function and Genetics*, 6(4), 418-423. doi: DOI 10.1002/prot.340060408
- Buchan, D. W. A., Minneci, F., Nugent, T. C. O., Bryson, K., & Jones, D. T. (2013). Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. *Nucleic Acids Res*, 41(W1), W349-W357. doi: 10.1093/nar/gkt381
- Burns, D. L. (1999). Biochemistry of type IV secretion. *Curr Opin Microbiol*, 2(1), 25-29.
- Buttner, D., & Bonas, U. (2010). Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiol Rev*, 34(2), 107-133. doi: 10.1111/j.1574-6976.2009.00192.x
- Cambronne, E. D., & Roy, C. R. (2006). Recognition and delivery of effector proteins into eukaryotic cells by bacterial secretion systems. *Traffic*, 7(8), 929-939. doi: 10.1111/j.1600-0854.2006.00446.x
- Camps, M. (2010). Modulation of ColE1-like plasmid replication for recombinant gene expression. *Recent Pat DNA Gene Seq*, 4(1), 58-73.
- Carvalho, C. F. (2015). *Caracterização funcional e estrutural de uma enzima lipolítica encontrada na Biblioteca Metagenômica de solo de Terra Preta de Índio*. (Doutor(a)), Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Chothia, C. (1975). Structural invariants in protein folding. *Nature*, 254(5498), 304-308.
- Christie, P. J., & Cascales, E. (2005). Structural and dynamic properties of bacterial type IV secretion systems (review). *Mol Membr Biol*, 22(1-2), 51-61.
- Christie, P. J., Whitaker, N., & Gonzalez-Rivera, C. (2014). Mechanism and structure of the bacterial type IV secretion systems. *Biochim Biophys Acta*, 1843(8), 1578-1591. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.12.019
- Clarke, D. T. (2012). Circular dichroism in protein folding studies. *Curr Protoc Protein Sci*, Chapter 28, Unit28 23. doi: 10.1002/0471140864.ps2803s70
- Cooper, A. (1999). Thermodynamic analysis of biomolecular interactions. *Curr Opin Chem Biol*, 3(5), 557-563.
- Corbalan-Garcia, S., & Gomez-Fernandez, J. C. (2014). Signaling through C2 domains: More than one lipid target. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1838(6), 1536-1547. doi: 10.1016/j.bbamem.2014.01.008
- Costa, T. R., Felisberto-Rodrigues, C., Meir, A., Prevost, M. S., Redzej, A., Trokter, M., & Waksman, G. (2015). Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nat Rev Microbiol*, 13(6), 343-359. doi: 10.1038/nrmicro3456
- Cowtan, K. (2006). The Buccaneer software for automated model building. 1. Tracing protein chains. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 62, 1002-1011. doi: 10.1107/S0907444906022116
- Cowtan, K. (2010). Recent developments in classical density modification. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 66, 470-478. doi: 10.1107/S090744490903947x
- D'Arcy, A., Mac Sweeney, A., & Haber, A. (2003). Using natural seeding material to generate nucleation in protein crystallization experiments. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 59, 1343-1346. doi: 10.1107/S0907444903009430
- Davies, G., & Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3(9), 853-859. doi: 10.1016/S0969-2126(01)00220-9
- De Maria, L., Vind, J., Oxenboll, K. M., Svendsen, A., & Patkar, S. (2007). Phospholipases

- and their industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 74(2), 290-300. doi: 10.1007/s00253-006-0775-x
- del Pino, I. M. P., Ibarra-Molero, B., & Sanchez-Ruiz, J. M. (2000). Lower kinetic limit to protein thermal stability: A proposal regarding protein stability in vivo and its relation with misfolding diseases. *Proteins-Structure Function and Genetics*, 40(1), 58-70.
- Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv*, 27(3), 297-306. doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.01.008
- Ding, Z., Atmakuri, K., & Christie, P. J. (2003). The outs and ins of bacterial type IV secretion substrates. *Trends Microbiol*, 11(11), 527-535.
- Dittmer, J. C., & Lester, R. L. (1964). A Simple, Specific Spray for the Detection of Phospholipids on Thin-Layer Chromatograms. *J Lipid Res*, 5, 126-127.
- Dong, A. P., Xu, X. H., & Edward, A. M. (2007). In situ proteolysis for protein crystallization and structure determination. *Nature Methods*, 4(12), 1019-1021. doi: 10.1038/nmeth1118
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*, 32(5), 1792-1797. doi: 10.1093/nar/gkh340
- Emsley, P., & Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 60, 2126-2132. doi: 10.1107/S09074444904019158
- Epand, R. M., & Epand, R. F. (2009). Lipid domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1788(1), 289-294. doi: 10.1016/j.bbamem.2008.08.023
- Essen, L. O., Perisic, O., Cheung, R., Katan, M., & Williams, R. L. (1996). Crystal structure of a mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C delta. *Nature*, 380(6575), 595-602. doi: Doi 10.1038/380595a0
- Ference, C. M., Gochez, A. M., Behlau, F., Wang, N., Graham, J. H., & Jones, J. B. (2018). Recent advances in the understanding of *Xanthomonas citri* ssp *citri* pathogenesis and citrus canker disease management. *Mol Plant Pathol*, 19(6), 1302-1318. doi: 10.1111/mpp.12638
- Ferrer, M., Chernikova, T. N., Yakimov, M. M., Golyshin, P. N., & Timmis, K. N. (2003). Chaperonins govern growth of *Escherichia coli* at low temperatures. *Nature Biotechnology*, 21(11), 1266-1267.
- Finn, R. D., Coghill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Mistry, J., Mitchell, A. L., . . . Bateman, A. (2016). The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Res*, 44(D1), D279-285. doi: 10.1093/nar/gkv1344
- Fisher, H. F., & Singh, N. (1995). Calorimetric methods for interpreting protein-ligand interactions. *Methods Enzymol*, 259, 194-221.
- Freire, E. (2001). The Thermodynamic Linkage Between Protein Structure, Stability, and Function. In M. K.P. (Ed.), *Protein Structure, Stability, and Folding. Methods in Molecular Biology* (Vol. 168, pp. 37-68): Humana Press.
- Gasteiger E., H. C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In J. M. Walker (Ed.), *The proteins protocols handbook* (pp. 571-607): Humana Press.
- Gavira, J. A. (2016). Current trends in protein crystallization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 602, 3-11. doi: 10.1016/j.abb.2015.12.010
- Ghannoum, M. A. (2000). Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*, 13(1), 122-143, table of contents.
- Gill, P., Moghadam, T. T., & Ranjbar, B. (2010). Differential scanning calorimetry techniques: applications in biology and nanoscience. *J Biomol Tech*, 21(4), 167-193.
- Gill, S. C., & von Hippel, P. H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem*, 182(2), 319-326.
- Gottwald, T. R., Graham, J. H., & Schubert, T. S. (2002). Citrus Canker: The Pathogen and Its Impact. *Plant Management Network*. doi: 10.1094/PHP-2002-0812-01-RV

- Graham, J. H., Gottwald, T. R., Cubero, J., & Achor, D. S. (2004). *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. *Mol Plant Pathol*, 5(1), 1-15. doi: 10.1046/j.1364-3703.2004.00197.x
- Greenfield, N. J. (2006). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols*, 1(6), 2876-2890. doi: 10.1038/nprot.2006.202
- Helfmann, S., Neumann, P., Tittmann, K., Moser, T., Ficner, R., & Reisinger, E. (2011). The Crystal Structure of the C(2)A Domain of Otoferlin Reveals an Unconventional Top Loop Region. *Journal of Molecular Biology*, 406(3), 479-490. doi: 10.1016/j.jmb.2010.12.031
- Holm, L., & Laakso, L. M. (2016). Dali server update. *Nucleic Acids Res*, 44(W1), W351-W355. doi: 10.1093/nar/gkw357
- Islam, S. A., & Weaver, D. L. (1990). Molecular-Interactions in Protein Crystals - Solvent Accessible Surface and Stability. *Proteins-Structure Function and Genetics*, 8(1), 1-5. doi: DOI 10.1002/prot.340080103
- Istivan, T. S., & Coloe, P. J. (2006). Phospholipase A in Gram-negative bacteria and its role in pathogenesis. *Microbiology*, 152(Pt 5), 1263-1274. doi: 10.1099/mic.0.28609-0
- Jaeger, K. E., Dijkstra, B. W., & Reetz, M. T. (1999). Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu Rev Microbiol*, 53, 315-351. doi: 10.1146/annurev.micro.53.1.315
- Jaeger, K. E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., van Heuvel, M., & Misset, O. (1994). Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev*, 15(1), 29-63.
- Javed, S., Azeem, F., Hussain, S., Rasul, I., Siddique, M. H., Riaz, M., . . . Nadeem, H. (2018). Bacterial lipases: A review on purification and characterization. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 132, 23-34. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2017.07.014
- Jelesarov, I., & Bosshard, H. R. (1999). Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *Journal of Molecular Recognition*, 12(1), 3-18. doi: Doi 10.1002/(Sici)1099-1352(199901/02)12:1<3::Aid-Jmr441>3.0.Co;2-6
- Jin, L., Kim, K. K., Im, W. T., Yang, H. C., & Lee, S. T. (2007). *Aspromonas composti* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Xanthomonadaceae. *Int J Syst Evol Microbiol*, 57(Pt 8), 1876-1880. doi: 10.1099/ijs.0.64472-0
- Johnson, C. M. (2013). Differential scanning calorimetry as a tool for protein folding and stability. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 531(1-2), 100-109. doi: 10.1016/j.abb.2012.09.008
- Joshi, A., Paratkar, S. G., & Thorat, B. N. (2006). Modification of lecithin by physical, chemical and enzymatic methods. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108(4), 363-373. doi: 10.1002/ejlt.200600016
- Juncker, A. S., Willenbrock, H., Von Heijne, G., Brunak, S., Nielsen, H., & Krogh, A. (2003). Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein Science*, 12(8), 1652-1662. doi: 10.1110/ps.0303703
- Kabiri, M., & Unsworth, L. D. (2014). Application of Isothermal Titration Calorimetry for Characterizing Thermodynamic Parameters of Biomolecular Interactions: Peptide Self-Assembly and Protein Adsorption Case Studies. *Biomacromolecules*, 15(10), 3463-3473. doi: 10.1021/bm5004515
- Kamal, M. Z., Ahmad, S., Molugu, T. R., Vijayalakshmi, A., Deshmukh, M. V., Sankaranarayanan, R., & Rao, N. M. (2011). In Vitro Evolved Non-Aggregating and Thermostable Lipase: Structural and Thermodynamic Investigation. *Journal of Molecular Biology*, 413(3), 726-741. doi: 10.1016/j.jmb.2011.09.002
- Kantardjieff, K. A., & Rupp, B. (2003). Matthews coefficient probabilities: Improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA, and protein-nucleic acid complex crystals. *Protein Science*, 12(9), 1865-1871. doi: 10.1110/ps.0350503
- Kato, A., Yamada, M., Nakamura, S., Kidokoro, S. I., & Kuroda, Y. (2007). Thermodynamic properties of BPTI variants with highly simplified amino acid sequences. *Journal of Molecular Biology*, 372(3), 737-746. doi: 10.1016/j.jmb.2007.06.066

- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. E. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, *10*(6), 845-858. doi: 10.1038/nprot.2015.053
- Kittell, B. L., & Helinski, D. R. (1993). Plasmid Incompatibility and Replication Control. In D. B. Clewell (Ed.), *Bacterial conjugation* (pp. 223-242). New York: Plenum press.
- Kohler, G. A., Brenot, A., Haas-Stapleton, E., Agabian, N., Deva, R., & Nigam, S. (2006). Phospholipase A2 and phospholipase B activities in fungi. *Biochim Biophys Acta*, *1761*(11), 1391-1399. doi: 10.1016/j.bbali.2006.09.011
- Kovacic, F., Granzin, J., Wilhelm, S., Kojic-Prodic, B., Batra-Safferling, R., & Jaeger, K. E. (2013). Structural and Functional Characterisation of TesA - A Novel Lysophospholipase A from *Pseudomonas aeruginosa*. *Plos One*, *8*(7). doi: UNSP e6912510.1371/journal.pone.0069125
- Kraepiel, Y., & Barny, M. A. (2016). Gram-negative phytopathogenic bacteria, all hemibiotrophs after all? *Mol Plant Pathol*, *17*(3), 313-316. doi: 10.1111/mpp.12345
- Krissinel, E., & Henrick, K. (2007). Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *Journal of Molecular Biology*, *372*(3), 774-797. doi: 10.1016/j.jmb.2007.05.022
- Kumar, S., Tsai, C. J., & Nussinov, R. (2000). Factors enhancing protein thermostability. *Protein Engineering*, *13*(3), 179-191. doi: DOI 10.1093/protein/13.3.179
- Kurien, B. T., & Scofield, R. H. (2006). Western blotting. *Methods*, *38*(4), 283-293. doi: 10.1016/j.ymeth.2005.11.007
- Lally, E. T., Hill, R. B., Kieba, L. R., & Korostoff, J. (1999). The interaction between RTX toxins and target cells. *Trends Microbiol*, *7*(9), 356-361. doi: Doi 10.1016/S0966-842x(99)01530-9
- Leavitt, S., & Freire, E. (2001). Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. *Curr Opin Struct Biol*, *11*(5), 560-566.
- Lepock, J. R. (2005). Measurement of protein stability and protein denaturation in cells using differential scanning calorimetry. *Methods*, *35*(2), 117-125. doi: 10.1016/j.ymeth.2004.08.002
- Li, Y., Chirgadze, D. Y., Bolanos-Garcia, V. M., Sibanda, B. L., Davies, O. R., Ahnesorg, P., . . . Blundell, T. L. (2008). Crystal structure of human XLF/Cernunnos reveals unexpected differences from XRCC4 with implications for NHEJ. *Embo Journal*, *27*(1), 290-300. doi: 10.1038/sj.emboj.7601942
- Lin, T. Y., & Koshland, D. E., Jr. (1969). Carboxyl group modification and the activity of lysozyme. *J Biol Chem*, *244*(2), 505-508.
- Linhartova, I., Bumba, L., Masin, J., Basler, M., Osicka, R., Kamanova, J., . . . Sebo, P. (2010). RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism. *FEMS Microbiol Rev*, *34*(6), 1076-1112. doi: 10.1111/j.1574-6976.2010.00231.x
- Little, D. J., Whitney, J. C., Robinson, H., Yip, P., Nitz, M., & Howell, P. L. (2012). Combining in situ proteolysis and mass spectrometry to crystallize *Escherichia coli* PgaB. *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications*, *68*, 842-845. doi: 10.1107/S1744309112022075
- Lopes, D. B., Fraga, L. P., Fleuri, L. F., & Macedo, G. A. (2011). Lipase and esterase - to what extent can this classification be applied accurately? *Ciencia E Tecnologia De Alimentos*, *31*(3), 608-613.
- Louis-Jeune, C., Andrade-Navarro, M. A., & Perez-Iratxeta, C. (2012). Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics*, *80*(2), 374-381. doi: 10.1002/prot.23188
- Low, H. H., Gubellini, F., Rivera-Calzada, A., Braun, N., Connery, S., Dujeancourt, A., . . . Waksman, G. (2014). Structure of a type IV secretion system. *Nature*, *508*(7497), 550-553. doi: 10.1038/nature13081
- Luque, I., & Freire, E. (2000). The structural stability of binding sites. *Biophysical Journal*, *78*(1), 152a-152a.
- MacPhee, D. J. (2010). Methodological considerations for improving Western blot analysis.

- Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 61(2), 171-177. doi: 10.1016/j.vascn.2009.12.001
- Maggio, R. M., Kaufman, T. S., Del Carlo, M., Cerretani, L., Bendini, A., Cichelli, A., & Compagnone, D. (2009). Monitoring of fatty acid composition in virgin olive oil by Fourier transformed infrared spectroscopy coupled with partial least squares. *Food Chemistry*, 114(4), 1549-1554. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.11.029
- Marchler-Bauer, A., Derbyshire, M. K., Gonzales, N. R., Lu, S., Chitsaz, F., Geer, L. Y., . . . Bryant, S. H. (2015). CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Res*, 43(Database issue), D222-226. doi: 10.1093/nar/gku1221
- Matsumoto, K., Kusaka, J., Nishibori, A., & Hara, H. (2006). Lipid domains in bacterial membranes. *Mol Microbiol*, 61(5), 1110-1117. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05317.x
- Matyash, V., Liebisch, G., Kurzchalia, T. V., Shevchenko, A., & Schwudke, D. (2008). Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *J Lipid Res*, 49(5), 1137-1146. doi: 10.1194/jlr.D700041-JLR200
- Maury, E., Prevost, M. C., Nauze, M., Redoules, D., Tarroux, R., Charveron, M., . . . Gassama-Diagne, A. (2002). Human epidermis is a novel site of phospholipase B expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 295(2), 362-369. doi: Pii S0006-291x(02)00657-5
Doi 10.1016/S0006-291x(02)00657-5
- McPherson, A., & Cudney, B. (2014). Optimization of crystallization conditions for biological macromolecules. *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology Communications*, 70, 1445-1467. doi: 10.1107/S2053230x14019670
- Michiels, J., Xi, C. W., Verhaert, J., & Vanderleyden, J. (2002). The functions of Ca²⁺ in bacteria: a role for EF-hand proteins? *Trends Microbiol*, 10(2), 87-93. doi: Doi 10.1016/S0966-842x(01)02284-3
- Micsonai, A., Wien, F., Kernya, L., Lee, Y. H., Goto, Y., Refregiers, M., & Kardos, J. (2015). Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(24), E3095-E3103. doi: 10.1073/pnas.1500851112
- Miller, S., Janin, J., Lesk, A. M., & Chothia, C. (1987). Interior and Surface of Monomeric Proteins. *Journal of Molecular Biology*, 196(3), 641-656. doi: Doi 10.1016/0022-2836(87)90038-6
- Minkler, P. E., & Hoppel, C. L. (2010). Separation and characterization of cardiolipin molecular species by reverse-phase ion pair high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J Lipid Res*, 51(4), 856-865. doi: 10.1194/jlr.D002857
- Moret, M. A., & Zebende, G. F. (2007). Amino acid hydrophobicity and accessible surface area. *Physical Review E*, 75(1). doi: Artn 011920
10.1103/Physreve.75.011920
- Nalefski, E. A., & Falke, J. J. (1996). The C2 domain calcium-binding motif: Structural and functional diversity. *Protein Science*, 5(12), 2375-2390. doi: DOI 10.1002/pro.5560051201
- Narita, S., & Tokuda, H. (2017). Bacterial lipoproteins; biogenesis, sorting and quality control. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1862(11), 1414-1423. doi: 10.1016/j.bbalip.2016.11.009
- Noland, C. L., Kattke, M. D., Diao, J. Y., Gloor, S. L., Pantua, H., Reichelt, M., . . . Murray, J. M. (2017). Structural insights into lipoprotein N-acylation by Escherichia coli apolipoprotein N-acyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(30), E6044-E6053. doi: 10.1073/pnas.1707813114
- Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., . . . Goldman, A. (1992). The Alpha/Beta-Hydrolase Fold. *Protein Engineering*, 5(3), 197-211. doi: DOI 10.1093/protein/5.3.197
- Overton, T. W. (2014). Recombinant protein production in bacterial hosts. *Drug Discovery*

- Today*, 19(5), 590-601. doi: 10.1016/j.drudis.2013.11.008
- Palacios, L. E., & Wang, T. (2005). Egg-yolk lipid fractionation and lecithin characterization. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 82(8), 571-578. doi: DOI 10.1007/s11746-005-1111-4
- Paliy, O., & Gunasekera, T. S. (2007). Growth of E-coli BL21 in minimal media with different gluconeogenic carbon sources and salt contents. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(5), 1169-1172. doi: 10.1007/s00253-006-0554-8
- Pape, T., & Schneider, T. R. (2004). HKL2MAP: a graphical user interface for macromolecular phasing with SHELX programs. *Journal of Applied Crystallography*, 37, 843-844. doi: 10.1107/S0021889804018047
- Parker, F., & Peterson, R. F. (1965). Quantitative analysis of phospholipids and phospholipid fatty acids from silica gel thin-layer chromatograms. *J Lipid Res*, 6, 455-460.
- Perozzo, R., Folkers, G., & Scapozza, L. (2004). Thermodynamics of protein-ligand interactions: history, presence, and future aspects. *J Recept Signal Transduct Res*, 24(1-2), 1-52.
- Pierce, M. M., Raman, C. S., & Nall, B. T. (1999). Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions. *Methods-a Companion to Methods in Enzymology*, 19(2), 213-221. doi: DOI 10.1006/meth.1999.0852
- Privalov, P. L. (1996). Intermediate states in protein folding. *Journal of Molecular Biology*, 258(5), 707-725. doi: DOI 10.1006/jmbi.1996.0280
- Rego, A. T., Chandran, V., & Waksman, G. (2010). Two-step and one-step secretion mechanisms in Gram-negative bacteria: contrasting the type IV secretion system and the chaperone-ushe pathway of pilus biogenesis. *Biochem J*, 425(3), 475-488. doi: 10.1042/BJ20091518
- Richmond, G. S., & Smith, T. K. (2011). Phospholipases A(1). *Int J Mol Sci*, 12(1), 588-612. doi: 10.3390/ijms12010588
- Ripoll-Rozada, J., Zunzunegui, S., de la Cruz, F., Arechaga, I., & Cabezón, E. (2013). Functional interactions of VirB11 traffic ATPases with VirB4 and VirD4 molecular motors in type IV secretion systems. *J Bacteriol*, 195(18), 4195-4201. doi: 10.1128/JB.00437-13
- Rooney, S. A., Canavan, P. M., & Motoyama, E. K. (1974). The identification of phosphatidylglycerol in the rat, rabbit, monkey and human lung. *Biochim Biophys Acta*, 360(1), 56-67.
- Rossmann, M. G. (1990). The Molecular Replacement Method. *Acta Crystallographica a- Foundation and Advances*, 46, 73-82. doi: Doi 10.1107/S0108767389009815
- Russo Krauss, I., Merlino, A., Vergara, A., & Sica, F. (2013). An overview of biological macromolecule crystallization. *Int J Mol Sci*, 14(6), 11643-11691. doi: 10.3390/ijms140611643
- Samanta, U., Bahadur, R. P., & Chakrabarti, P. (2002). Quantifying the accessible surface area of protein residues in their local environment. *Protein Engineering*, 15(8), 659-667. doi: DOI 10.1093/protein/15.8.659
- Sambrook J, R. D. (2001). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (3 ed. Vol. 1). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez-Ruiz, J. M. (2010). Protein kinetic stability. *Biophysical Chemistry*, 148(1-3), 1-15. doi: 10.1016/j.bpc.2010.02.004
- Santos, M. B., de Carvalho, C. W. P., & Garcia-Rojas, E. E. (2018). Heteroprotein complex formation of bovine serum albumin and lysozyme: Structure and thermal stability. *Food Hydrocolloids*, 74, 267-274. doi: 10.1016/j.foodhyd.2017.08.016
- Schagger, H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols*, 1(1), 16-22. doi: 10.1038/nprot.2006.4
- Scott, D. L., White, S. P., Otwinowski, Z., Yuan, W., Gelb, M. H., & Sigler, P. B. (1990). Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A2. *Science*, 250(4987), 1541-1546.
- Sheinerman, F. B., Norel, R., & Honig, B. (2000). Electrostatic aspects of protein-protein

- interactions. *Curr Opin Struct Biol*, 10(2), 153-159.
- Singha, T. K., Gulati, P., Mohanty, A., Khasa, Y. P., Kapoor, R. K., & Kumar, S. (2017). Efficient genetic approaches for improvement of plasmid based expression of recombinant protein in *Escherichia coli*: A review. *Process Biochemistry*, 55, 17-31. doi: 10.1016/j.procbio.2017.01.026
- Skipski, V. P., Peterson, R. F., & Barclay, M. (1964). Quantitative analysis of phospholipids by thin-layer chromatography. *Biochem J*, 90(2), 374-378.
- Skipski, V. P., Smolowe, A. F., & Barclay, M. (1967). Separation of Neutral Glycosphingolipids and Sulfatides by Thin-Layer Chromatography. *J Lipid Res*, 8(4), 295-+.
- Skubak, P., & Pannu, N. S. (2013). Automatic protein structure solution from weak X-ray data. *Nat Commun*, 4. doi: Unsp 2777
10.1038/Ncomms3777
- Sorensen, H. P., & Mortensen, K. K. (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 115(2), 113-128. doi: 10.1016/j.jbiotec.2004.08.004
- Souza, D. P., Oka, G. U., Alvarez-Martinez, C. E., Bisson-Filho, A. W., Dunger, G., Hobeika, L., . . . Farah, C. S. (2015). Bacterial killing via a type IV secretion system. *Nat Commun*, 6, 6453. doi: 10.1038/ncomms7453
- Storf, S., Pfeiffer, F., Dilks, K., Chen, Z. Q., Imam, S., & Pohlschroder, M. (2010). Mutational and Bioinformatic Analysis of Haloarchaeal Lipobox-Containing Proteins. *Archaea-an International Microbiological Journal*. doi: Artn 410975
10.1155/2010/410975
- Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, 41(1), 207-234. doi: 10.1016/j.pep.2005.01.016
- Sturtevant, J. M. (1987). Biochemical Applications of Differential Scanning Calorimetry. *Annual Review of Physical Chemistry*, 38, 463-488. doi: DOI 10.1146/annurev.physchem.38.1.463
- Sugimori, D., Kano, K., & Matsumoto, Y. (2012). Purification, characterization, molecular cloning and extracellular production of a phospholipase A1 from *Streptomyces albidoflavus* NA297. *FEBS Open Bio*, 2, 318-327. doi: 10.1016/j.fob.2012.09.006
- Takahashi, K., & Sturtevant, J. M. (1981). Thermal-Denaturation of *Streptomyces* Subtilisin Inhibitor, Subtilisin Bpn', and the Inhibitor-Subtilisin Complex. *Biochemistry*, 20(21), 6185-6190. doi: Doi 10.1021/Bi00524a042
- Taylor, G. L. (2010). Experimental phasing and radiation damage Introduction to phasing. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 66, 325-338. doi: 10.1107/S0907444910006694
- Thaller, C., Weaver, L. H., Eichele, G., Wilson, E., Karlsson, R., & Jansonius, J. N. (1981). Repeated seeding technique for growing large single crystals of proteins. *Journal of Molecular Biology*, 147(3), 465-469.
- Tokuda, H., & Matsuyama, S. (2004). Sorting of lipoproteins to the outer membrane in *E. coli* (vol 1693, pg 5, 2004). *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1694(1-3), 329-IN329. doi: 10.1016/S0147-4889(04)00340-4
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets - Procedure and Some Applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9), 4350-4354. doi: DOI 10.1073/pnas.76.9.4350
- Trocter, M., Felisberto-Rodrigues, C., Christie, P. J., & Waksman, G. (2014). Recent advances in the structural and molecular biology of type IV secretion systems. *Curr Opin Struct Biol*, 27, 16-23. doi: 10.1016/j.sbi.2014.02.006
- Tseng, T. T., Tyler, B. M., & Setubal, J. C. (2009). Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiol*, 9 Suppl 1, S2. doi: 10.1186/1471-2180-9-S1-S2
- Valianpour, F., Wanders, R. J., Barth, P. G., Overmars, H., & van Gennip, A. H. (2002).

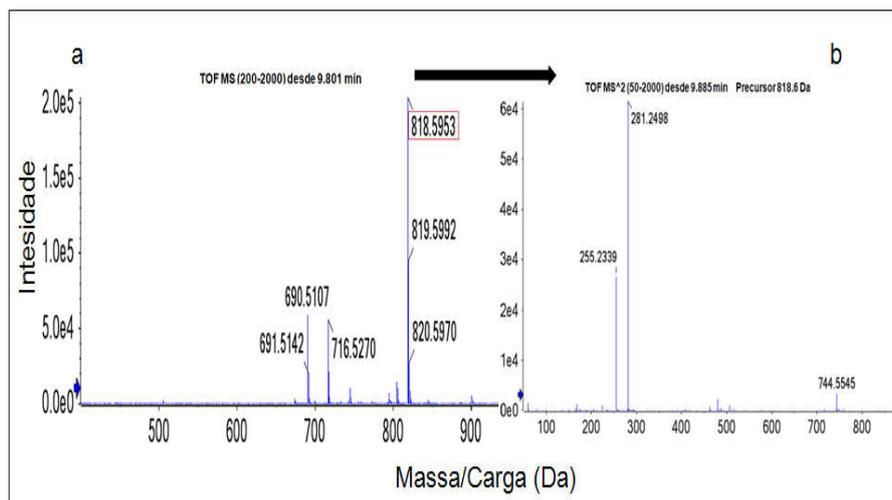
- Quantitative and compositional study of cardiolipin in platelets by electrospray ionization mass spectrometry: application for the identification of Barth syndrome patients. *Clin Chem*, 48(9), 1390-1397.
- Vanduyne, G. D., Standaert, R. F., Karplus, P. A., Schreiber, S. L., & Clardy, J. (1993). Atomic Structures of the Human Immunophilin Fkbp-12 Complexes with Fk506 and Rapamycin. *Journal of Molecular Biology*, 229(1), 105-124. doi: DOI 10.1006/jmbi.1993.1012
- Vanounou, S., Parola, A. H., & Fishov, I. (2003). Phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol are segregated into different domains in bacterial membrane. A study with pyrene-labelled phospholipids. *Mol Microbiol*, 49(4), 1067-1079.
- Vargas-Villarreal, J., Martinez-Rodriguez, H., Castro-Garza, J., Mata-Cardenas, B. D., Gonzalez-Garza, M. T., & Said-Fernandez, S. (1995). Identification of *Entamoeba histolytica* intracellular phospholipase A and lysophospholipase L1 activities. *Parasitol Res*, 81(4), 320-323.
- Velazquez-Campoy, A., Leavitt, S. A., & Freire, E. (2004). Characterization of protein-protein interactions by isothermal titration calorimetry. *Methods Mol Biol*, 261, 35-54. doi: 10.1385/1-59259-762-9:035
- Velazquez-Campoy, A., Leavitt, S. A., & Freire, E. (2015). Characterization of protein-protein interactions by isothermal titration calorimetry. *Methods Mol Biol*, 1278, 183-204. doi: 10.1007/978-1-4939-2425-7_11
- Vermeer, A. W., & Norde, W. (2000). The thermal stability of immunoglobulin: unfolding and aggregation of a multi-domain protein. *Biophysical Journal*, 78(1), 394-404. doi: 10.1016/S0006-3495(00)76602-1
- Vitiello, F., & Zanetta, J. P. (1978). Thin-layer chromatography of phospholipids. *J Chromatogr*, 166(2), 637-640.
- Vocadlo, D. J., Davies, G. J., Laine, R., & Withers, S. G. (2001). Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate. *Nature*, 412(6849), 835-838. doi: Doi 10.1038/35090602
- Walden, H. (2010). Selenium incorporation using recombinant techniques. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 66, 352-357. doi: 10.1107/S0907444909038207
- Wang, L. C., Hu, C. X., Liu, S. X., Chang, M., Gao, P., Wang, L. L., . . . Xu, G. W. (2016). Plasma Lipidomics Investigation of Hemodialysis Effects by Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Proteome Research*, 15(6), 1986-1994. doi: 10.1021/acs.jproteome.6b00170
- Wernimont, A., & Edwards, A. (2009). In Situ Proteolysis to Generate Crystals for Structure Determination: An Update. *Plos One*, 4(4). doi: ARTN e5094 10.1371/journal.pone.0005094
- Wu, Y. L., Li, Q., & Chen, X. Z. (2007). Detecting protein-protein interactions by far western blotting. *Nature Protocols*, 2(12), 3278-3284. doi: 10.1038/nprot.2007.459
- Wyatt, P. J. (1993). Light-Scattering and the Absolute Characterization of Macromolecules. *Analytica Chimica Acta*, 272(1), 1-40. doi: Doi 10.1016/0003-2670(93)80373-S
- Yang, W., Zhang, L., Lu, Z. G., Tao, W., & Zhao, Z. H. (2001). A new method for protein coexpression in *Escherichia coli* using two incompatible plasmids. *Protein Expression and Purification*, 22(3), 472-478. doi: 10.1006/prep.2001.1453
- Yerushalmi, G., Zusman, T., & Segal, G. (2005). Additive effect on intracellular growth by *Legionella pneumophila* lcm/Dot proteins containing a lipobox motif. *Infect Immun*, 73(11), 7578-7587. doi: 10.1128/IAI.73.11.7578-7587.2005
- Zechner, E. L., Lang, S., & Schildbach, J. F. (2012). Assembly and mechanisms of bacterial type IV secretion machines. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 367(1592), 1073-1087. doi: 10.1098/rstb.2011.0207
- Zhang, D., & Aravind, L. (2010). Identification of novel families and classification of the C2 domain superfamily elucidate the origin and evolution of membrane targeting activities in eukaryotes. *Gene*, 469(1-2), 18-30. doi: 10.1016/j.gene.2010.08.006

- Zhao, M., Qiao, M., Oyajobi, B. O., Mundy, G. R., & Chen, D. (2003). E3 ubiquitin ligase Smurf1 mediates core-binding factor alpha 1/Runx2 degradation and plays a specific role in osteoblast differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(30), 27939-27944. doi: 10.1074/jbc.M304132200
- Zimm, B. H. (1948). The Scattering of Light and the Radial Distribution Function of High Polymer Solutions. *Journal of Chemical Physics*, 16(12), 1093-1099. doi: Doi 10.1063/1.1746738
- Zuckert, W. R. (2014). Secretion of Bacterial Lipoproteins: Through the Cytoplasmic Membrane, the Periplasm and Beyond. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1843(8), 1509-1516. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.04.022

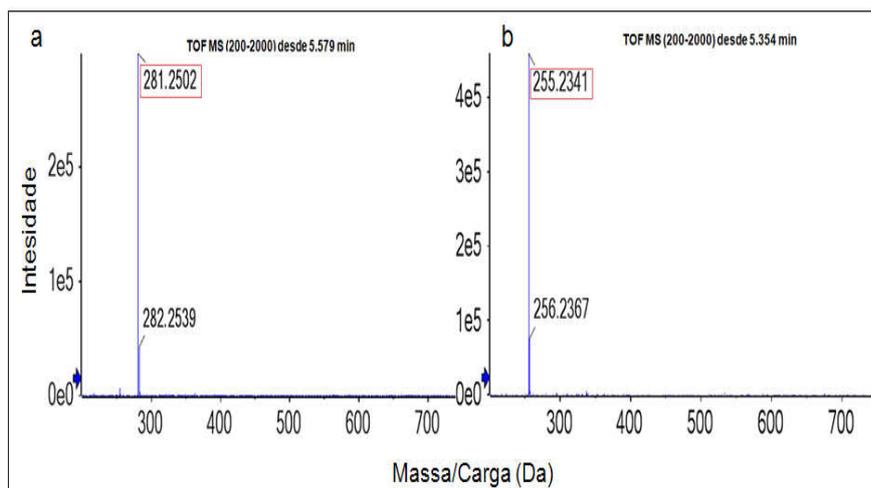
7. APÊNDICES

7.1 Espectro ESI-MS de ionização negativa do branco de reação com POPC-Acetato.

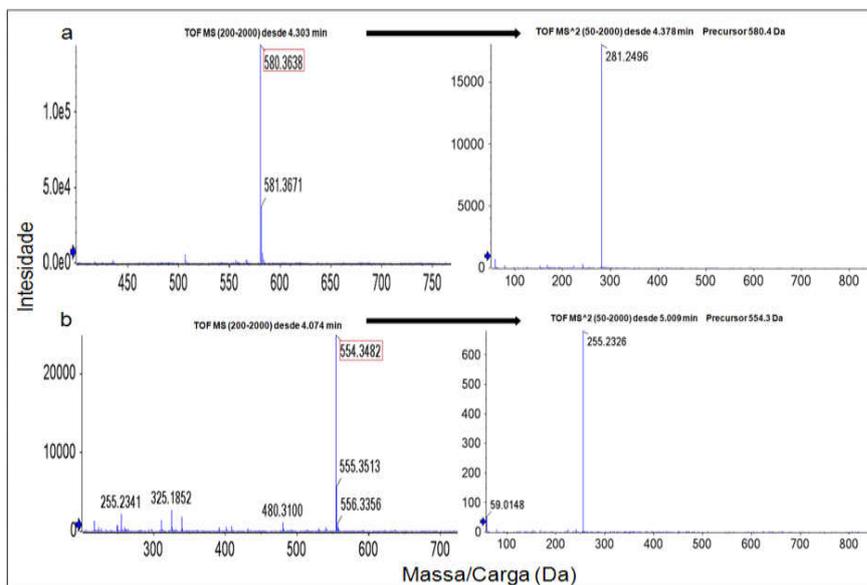
a) TOF MS do íon POPC-Acetato m/z 818,595 b) Fragmentação (TOF MS²) do pico m/z 818,595, gerando três compostos: um de m/z 744,554 correspondente à perda do metil acetato do fosfolipídio, o segundo de m/z 281,249 correspondente a ácido oleico (18:1) e o último de m/z 255,233 correspondente do ácido palmítico (16:0).



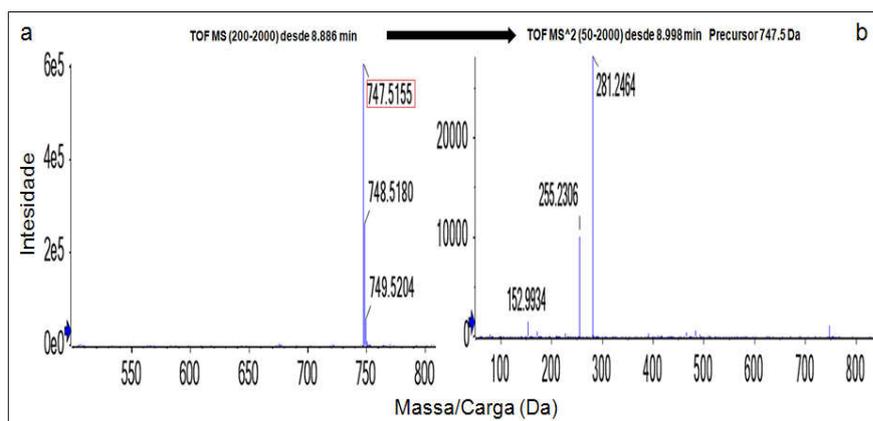
7.2 Espectro ESI-MS de ionização negativa do ácido oleico e o ácido palmítico. a) TOF MS do íon do ácido oleico (18:1) m/z 281,2502. b) TOF MS do íon do ácido palmítico (16:0) m/z 255,2341.



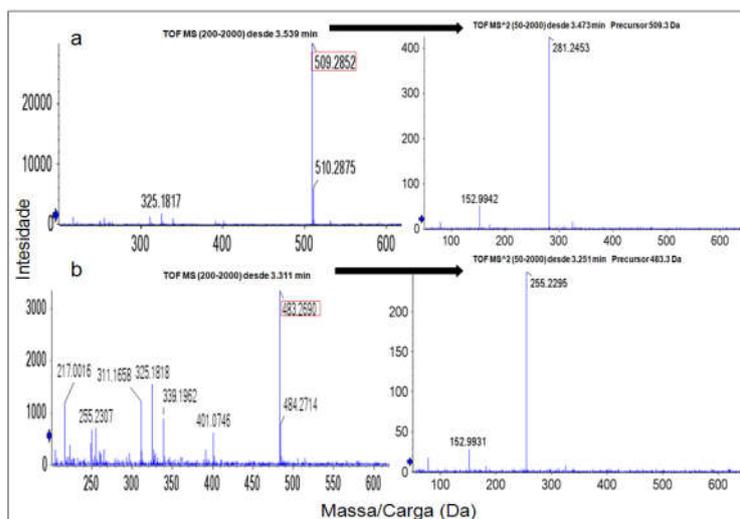
7.3 Espectro ESI-MS de ionização negativa de LPC 18:1 e LPC 16:0. a) TOF MS do íon LPC 18:1 m/z 580,3638 e a sua fragmentação (TOF MS²) gerando o pico m/z 281.2496 correspondente a ácido oleico (18:1). b) TOF MS do íon LPC 16:0 de m/z 554,3482 e a sua fragmentação (TOF MS²) gera o pico de m/z 255,233 correspondente do ácido palmítico (16:0).



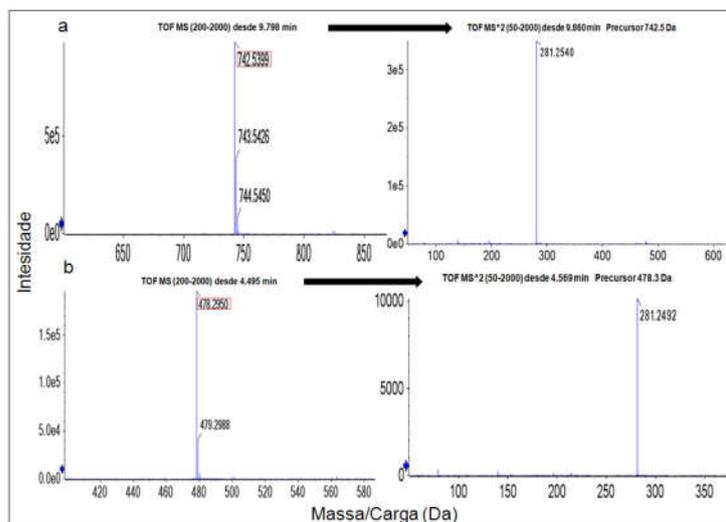
7.4 Espectro ESI-MS de ionização negativa do branco de reação com POPG. a) TOF MS do íon POPG de m/z 745,515. b) Fragmentação (TOF MS²) do pico m/z 745,515, gerando três fragmentos correspondente a ácido oleico (m/z 281,249), m/z 255,233 correspondente do ácido palmítico (16:0) e um m/z 152,993 do íon 2-hidroxi-3-fosfato propeno



7.5 Espectro ESI-MS de ionização negativa do LPG 18:1 e do LPG 16:0. a) TOF MS do íon LPG 18:1 com m/z 509,285 e a sua fragmentação (TOF MS²) gera dois picos, um correspondente ao ácido oleico (18:1) com m/z 281,245 e o outro pico é o 2-hidroxi-3-fosfato propeno que é a fragmentação da cabeça polar com m/z 152,994. b) TOF MS do íon LPG 16:0 com m/z 483,269 e a sua fragmentação (TOF MS²) cria dois picos, um de m/z 255,233 correspondente do ácido palmítico (16:0) e o outro pico é do 2-hidroxi-3-fosfato propeno com m/z 152,993.



7.6 Espectro ESI-MS de ionização negativa da DOPE e LPE 18:1. a) TOF MS do íon DOPE com m/z 742,539 e a sua fragmentação (TOF MS²) gera o pico com m/z 281,245 correspondente a ácido oleico (18:1). b) TOF MS do íon LPE 18:1 com m/z 478,295 e a sua fragmentação (TOF MS²) produz um pico de m/z 281,250 correspondente ao ácido oleico (18:1).



7.7 Espectro ESI-MS de ionização negativa da cardioplipina bovina (C18:2)₄. a) TOF MS do íon da cardioplipina bovina (C18:2)₄ com m/z 1447,959. b) Fragmentação (TOF MS²) do pico padrão 1447,959 liberando três moléculas com m/z: 695,461 correspondente ao diacilglicerolfosfato (C18:2)₂; m/z 415,221 do monoacilglicerol fosfato (18:2) e m/z 279,230 correspondente ao ácido linoleico (18:2). c) TOF MS do íon do ácido linoleico (18:2) com m/z 279,235

