MAIRA RODRIGUES DE CAMARGO NEVES

ESTUDO DE ATIVIDADES AMIDÁSICAS NA LINHAGEM MN7 DE *PHOTORHABDUS LUMINESCENS LUMINESCENS*, ISOLADA DA LINHAGEM LPP7 DE *HETERORHABDITIS BAUJARDI*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2014

MAIRA RODRIGUES DE CAMARGO NEVES

ESTUDO DE ATIVIDADES AMIDÁSICAS NA LINHAGEM MN7 DE *PHOTORHABDUS LUMINESCENS LUMINESCENS*, ISOLADA DA LINHAGEM LPP7 DE *HETERORHABDITIS BAUJARDI*

Dissertação apresentada ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Winter

Versão original

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Neves, Maira Rodrigues de Camargo.
Estudo de atividades amidásicas na linhagem MN7 de *Photorhabdus luminescens luminescens*, isolada da linhagem LPP7 de *Heterorhabditis baujardi* / Maira Rodrigues de Camargo Neves. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Winter.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Biologia molecular de nematóides.

Versão do título para o inglês: Study of amidasic activities present in *Photorhabdus luminescens luminescens* strain MN7, isolated from *Heterorhabditis baujardi* strain LPP7.

1. Bactérias 2. *Photorhabdus luminescens* 3. Proteases 4. Serralisina 5. Nematoide 6. Entomopatogênicos I. Winter, Prof. Dr. Carlos Eduardo II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0105/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Maira Rodrigues de Camargo Neves.

Título da Dissertação: Estudo de atividades amidásicas na linhagem MN7 de *Photorhabdus luminescens luminescens*, isolada da linhagem LPP7 de *Heterorhabditis baujardi*.

Orientador(a): Prof. Dr. Carlos Eduardo Winter.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **039** nas fls. **127** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Carlos Eduardo Winter**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa *"Inoculação de camundongos com antígenos proteicos para geração de antissoros monoespecíficos"* do qual participam o(s) **Maira Rodrigues de Camargo Neves, Carolina Rossi,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **18.04.2012, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 18 de abril de 2012.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

Aos meus pais, que insistiram que eu seguisse meus sonhos.

A Gilmar Recchia, Elaine Aparecida Bassan Castro e Miriam Pereira de Mello, que me ensinaram a sonhar com a Ciência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Carlos Eduardo Winter, por toda a confiança depositada em mim, desde quando eu apareci no laboratório, antes mesmo de começar as minhas aulas na faculdade, e de eu sequer ter ouvido falar em *Caenorhabditis elegans*. Obrigada pela atenção, pelos conselhos, pelas conversas, por tudo o que me ensinou e pela sua amizade.

Agradeço aos amigos de laboratório, Daniela Peres Almenara, Fernando Luiz Kamitani, Carolina Rossi, Camila Coelho, e Marco Arantes que fizeram e fazem o dia a dia no laboratório mais agradável. Obrigada por toda a ajuda, por todos os sorrisos, e todos os cafés da tarde.

Agradeço ao Manoel Aparecido Peres, que com a maior calma e paciência do mundo sempre nos ajudou e cuidou do LBMN. Sem você faríamos uma bagunça irreparável, Manoel!

Agradeço ao Prof. Arthur Gruber pelos conselhos, conversas, e pela ajuda indispensável com a montagem e anotação do genoma de *Photorhabdus luminescens* MN7.

Agradeço ao Dr. João Marcelo Pereira Alves, também pela ajuda com a montagem e anotação do genoma de MN7, e pelo site do genoma de MN7.

Agradeço à Prof. Silvia Uliana por ceder os equipamentos para os ensaios enzimáticos.

Agradeço ao Departamento de Parasitologia, pela infra-estrutura e pessoal indispensáveis para o desenvolvimento de qualquer projeto. Agradeço aos professores, alunos e funcionários pelo ambiente hospitaleiro, onde quando procurei ajuda, a encontrei.

Agradeço ao Prof. Luiz Juliano Neto, da UNIFESP, e suas colaboradoras Lilian Oliveira e Debora Okamoto, por cederem os substratos de sequência aleatorizada e me ajudarem com os protocolos para esses ensaios.

Agradeço a Mariana Lins, por toda a ajuda com planilhas infinitas do Excel, por me ajudar a economizar um pouquinho do meu tempo e aprender um pouco mais sobre fórmulas enlouquecidas do Excel. Obrigada pela sua amizade e por ser essa pessoa tão prestativa e agradável.

Agradeço aos membros da banca pelo aceite ao convite, e pela disposição à discussão.

Agradeço à FAPESP pelo apoio financeiro.

Agradeço aos meus professores do Instituto Coração de Jesus por tudo o que me ensinaram, na vida acadêmica e na vida pessoal. Agradeço por terem cuidado de mim como um membro da família estendida na escola. Agradeço em especial a Prof. Elaine Aparecida Bassan Castro, a Prof. Miriam Pereira de Mello, e ao Prof. Andrei Cornetta, por terem me incentivado a buscar uma carreira na pesquisa científica. Por isso sou eternamente grata.

Agradeço ao Gilmar Recchia, por ter modificado a maneira como eu vejo o mundo, e por ter me ensinado a pensar com senso crítico, e a questionar o que está à minha volta. Você me ensinou o que é o pensamento científico e inspirou as grandes decisões da minha vida. Espero que você saiba o quanto eu sinto a sua falta, onde quer que você esteja.

Agradeço à minha mãe, Silvia Aparecida Rodrigues. Não existe outra expressão para descrever o que fez por mim, senão “apoio incondicional”. Sempre encontrei em você um porto seguro, independente das dificuldades ao nosso redor. Agradeço por ter me oferecido um modelo a ser seguido.

Agradeço ao meu pai, Edson Marcos de Camargo Neves, que nunca deixa de acreditar em mim. Obrigada pela confiança, pela orientação que me oferece desde que eu consigo me lembrar, e pelos conselhos que me guiam a tomar decisões melhores sempre.

Agradeço aos meus irmãos. Pedro, você entende a vida muito melhor do que eu. Obrigada por dividir sua sabedoria comigo sempre. Leonardo e Lorenzo, obrigada pela convivência alegre e por me ensinarem o significado de ser irmão.

Agradeço a minha família, que me ouve nos momentos de empolgação e de frustração profissional sem se queixarem, e ainda assim me apoia e me incentiva.

Agradeço aos meus amigos, por fazerem do mundo um lugar mais tolerável, por sempre saberem como me fazer rir, e por sempre me ajudarem a enxergar o lado positivo das coisas.

Agradeço ao Fabricio Leotti por todos os nossos compartilhamentos: na diversão, no cotidiano profissional, nas nossas paixões pela Biologia, enfim, na nossa vida. Essa dissertação é um pouquinho sua também.

Agradeço às minhas meninas: Gabriela Camerotti, Kéroly Gritti, Micaela Molan, Nina Borges e Paula Ribeiro, por serem as irmãs que eu nunca tive. Espero um dia ser metade da pessoa que vocês dizem por aí que eu sou. Vocês me enchem de orgulho, e eu espero retribuir um pouquinho deste sentimento à vocês.

Agradeço ao meu noivo, Tiago Manuel Zanfra de Melo e Gouveia, meu companheiro e cúmplice, obrigada por toda a compreensão, paciência, e carinho intermináveis. Agradeço por você ter dado sentido a tudo isso.

“One of the phenomena which had peculiarly attracted my attention was the structure of the human frame, and, indeed, any animal endued with life. Whence, I often asked myself, did the principle of life proceed?”

“Um dos fenômenos que particularmente chamava minha atenção era a estrutura do corpo humano, e, de fato, qualquer animal dotado de vida. De onde, eu frequentemente me perguntava, o princípio da vida procedia?”

(Mary Shelley, em *Frankenstein: or the Modern Prometheus*)

RESUMO

NEVES, M. R. C. **Estudo de atividades amidásicas na linhagem MN7 de *Photorhabdus luminescens luminescens*, isolada da linhagem LPP7 de *Heterorhabditis baujardi*.** 2014. 77 f. Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Photorhabdus é um gênero de enterobactérias simbiontes de *Heterorhabditis*, um gênero de nematoides entomopatogênicos. Estes dois organismos associados são capazes de infectar uma vasta gama de artrópodes, desde insetos a isópodes e até mesmo carrapatos. O genoma de *Photorhabdus luminescens* TTO1 já foi completamente sequenciado, bem como o genoma das outras duas espécies do gênero, *P. asymbiotica* e *P. temperata*. É previsto que aproximadamente 6% do genoma de *P. luminescens* TTO1 sejam sequências de genes destinados à produção de metabólitos secundários, quase o dobro dos 3.8% encontrados para *Streptomyces*, modelo para o estudo desses metabólitos. Dentre as enzimas secretadas por *P. luminescens* TTO1, destaca-se PrtA, uma metaloprotease que pertence a subfamília das serralisinas. PrtS, uma protease capaz de induzir uma forte resposta de melanização no inseto, foi identificada em *P. temperata* Az29 mas não em *P. luminescens* TTO1. Neste trabalho foram detectadas e caracterizadas bioquimicamente algumas proteases secretadas *in vitro* pelo isolado MN7 de *Photorhabdus luminescens luminescens*. Essas proteases são secretadas pela bactéria em cultura por volta das 18 horas, ainda antes da fase estacionária desta cultura. É possível detectar por zimografia duas atividades mais proeminentes: uma de 50 kDa, e outra de 38 kDa. As proteínas do sobrenadante foram submetidas a cromatografia numa tentativa de separar as duas atividades peptidásicas detectadas em zimografia. Foram feitos ensaios com substratos sintéticos com sequências de aminoácidos aleatorizadas para determinação de resíduo preferencial para clivagem. Com o sequenciamento do genoma desta bactéria, pudemos confirmar a presença no genoma de genes codificando proteínas de alta identidade com as descritas PrtA e PrtS, de tamanhos similares aos detectados nas nossas zimografias. Foi possível desenhar substratos específicos para as duas atividades com base na literatura disponível sobre a clivagem preferencial destas proteases. Com a disponibilidade dos substratos para realização de ensaios enzimáticos mais sensíveis, foi feita uma curva de pH, além de ensaios para determinação do K_M e ensaios de inibição de atividade. As proteases são inibidas por 1-10-fenantrolina, mas não por PMSF, E64, ou pepstatina A, indicando a possibilidade de pertencerem ao grupo das metaloproteases. Curiosamente, apenas parte da atividade enzimática sobre o substrato natural caseína-FTC foi inibida por EDTA. Foi feito um fracionamento celular, separando proteínas do sobrenadante de cultura, do espaço periplasmático e da fração celular e de membrana. O perfil eletroforético destas frações foi determinado, estabelecendo que a atividade enzimática observada é majoritariamente secretada. *P. luminescens* MN7 apresenta secreção, portanto, de uma protease presente em nas três espécies, e de outra presente apenas em *P. temperata* Az29.

Palavras-chave: *Photorhabdus luminescens*. Amidases. Proteases. Entomopatogênicos. PrtA. PrtS. Metaloproteases. Serralisina.

ABSTRACT

NEVES, M. R. C. Study of amidasic activities present in *Photorhabdus luminescens luminescens* strain MN7, isolated from *Heterorhabditis baujardi* strain LPP7. 2014. 77 p. Dissertation (Masters in Biology of Host-Pathogen Interaction) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Photorhabdus is a genus of Enterobacteriaceae symbionts of *Heterorhabditis*, a genus of entomopathogenic nematodes . These two organisms are members capable of infecting a wide range of arthropods, from insects to isopods and even ticks. The genome of *Photorhabdus luminescens* TTO1 has been completely sequenced , and the genome of two other species of the genus , *P. asymbiotica* and *P. temperata*. It is anticipated that approximately 6 % of the genome of *P. luminescens* TTO1 are sequences of genes for the production of secondary metabolites, nearly double the 3.8 % found for Streptomyces, model for the study of these metabolites. Among the enzymes secreted by P. luminescens TTO1 stands out PrtA, a metalloprotease that belongs to the subfamily of serralysins. PrtS, a protease capable of inducing a strong melanotic response from the insect, was identified in *P. temperata* Az29 but not in *P. luminescens* TTO1. In this work were detected and characterized biochemically some proteases secreted *in vitro* by the strain MN7 of *Photorhabdus luminescens luminescens*. These proteases are secreted by the bacteria in culture at around 18 hours, prior to the stationary phase of culture. Two most prominent activities can be detected by zymography: one with 50 kDa and one with 38 kDa. The proteins of the supernatant were chromatographed in an attempt to separate the two peptidase activities detected in gelatin zymography. Assays with synthetic randomized amino acid sequences were performed to determine a preferred residue for cleavage substrates. With the sequencing of the genome of this bacterium, we could confirm the presence of genes in the genome encoding proteins with high identity to the PrtA and PrtS, with sizes similar to those detected in our zymographies. It was possible to design specific substrates for the two activities based on the available literature on the preferential cleavage of these proteases. With the availability of substrates for performing most sensitive enzyme assays, a pH curve was performed, as well as assays for determination of K_M and activity inhibition assays. The proteases are inhibited by 1 -10-phenanthroline, but not by PMSF, E64 or pepstatin A, indicating the possibility of these activities belonging to the group of metalloproteases. Interestingly, the enzymatic activity observed on FTC-casein was only partially inhibited by EDTA. A cellular fractionation was done by separating proteins from the culture supernatant, the cell periplasmic space fraction, and membrane and cytoplasmic fraction. The electrophoretic profile of these fractions was determined, establishing that the enzymatic activity observed is mainly secreted. *P. luminescens* MN7 secretion presents, therefore, a protease present in the three species, and otherwise present only in *P. temperata* Az29.

Keywords: *Photorhabdus luminescens*. Amidases. Proteases. Entomopathogenics. PrtA. PrtS. Metalloproteases. Serralysin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Filogenia das linhagens mais estudadas no gênero *Photorhabdus* 19

Figura 2 – Localização cromossômica do locus *mad* em *Photorhabdus luminescens* 19

Figura 3 – *Heterorhabditis* e *Photorhabdus* 20

Figura 4 – Ciclo de vida de *Heterorhabditis* 21

Figura 5 – Ciclo de transmissão de *Photorhabdus* em *Heterorhabditis* 22

Figura 6 – Interações de *Photorhabdus* com o sistema imune de insetos 25

Figura 7 – Análise filogenética do gênero *Photorhabdus*, com destaque para o clado de *Photorhabdus luminescens* 33

Figura 8 – Grupos ortólogos compartilhados e exclusivos de algumas linhagens relacionadas a *P. luminescens* MN7 34

Figura 9 – Operon de PrtA em *P. luminescens* MN7 comparado ao mesmo operon em TT01 34

Figura 10 – SDS-PAGE das amostras obtidas por fracionamento celular de *P. luminescens* MN7 49

Figura 11 – Zimografia das atividades proteásicas secretadas no meio de cultura de *P. luminescens* MN7 50

Figura 12 – Zimografia das atividades proteásicas secretadas no meio em diferentes tempos de crescimento na cultura de *P. luminescens* TT01 e *P. luminescens* MN7 51

Figura 13 – Determinação da especificidade da protease em função de um resíduo no substrato 52

Figura 14 – Curva de pH da atividade proteásica presente no sobrenadante de cultura de MN7 após precipitação com sulfato de amônio 90% 53

Figura 15 – Determinação do K_M da enzima para o substrato Abz-GXXMXXQ-EDDnp 54

Figura 16 – Atividade enzimática sobre Suc-EVY-AMC do sobrenadante de culturas de *P. luminescens* TTO1 e MN7 ao longo do tempo 56

Figura 17 – Inibição da atividade enzimática da amostra precipitada do sobrenadante de MN7 por inibidores específicos de metaloproteases 57

Figura 18 – Determinação do K_M da enzima para o substrato Suc-EVY-AMC 58

Figura 19 – Atividade enzimática sobre caseína-FTC do sobrenadante de culturas de *P. luminescens* TTO1 e MN7 ao longo do tempo 59

Figura 20 Inibição da atividade enzimática sobre caseína-FTCda amostra precipitada do sobrenadante de MN7 por EDTA 59

Figura 21 – Cromatografia de troca iônica e atividade das frações da amostra de sobrenadante de MN7 precipitada com sulfato de amônio 90% 60

Figura 22 – Zimografia das atividades proteásicas presentes nas diferentes frações cromatográficas 60

Figura 23 – Árvore filogenética das proteases PrtA de *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* 61

Figura 24 – Metaloproteases do clã MA, família das serralisinas: estrutura e sequência 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Peptidases putativas no genoma de *Photorhabdus luminescens* TT01 27
Tabela 2 – Sequências utilizadas na construção da árvore de PrtA 61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abz	*o*-aminobenzoil
AMC	7-amino-4-metilcumarina
AMP	Peptídeos antimicrobianos
BCA	Ácido bicinconínico
BTB	Azul de bromotimol
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDDnp	N-(2,4-Dinitrofenil)-etilenodiamina
FITC	Fluoresceína isotiocianato
FTC	Fluoresceína tiocarbamoil
JI	Juvenil infectante
AHL	N-acil homoserina-lactona
NBTA	Meio ágar nutriente – azul de bromotimol
PVC	Cassetes de virulência de *Photorhabdus*
ROS	Espécies reativas de oxigênio
Tc	Complexo de toxinas
TCA	Ácido tricloroacético
TLP	*Thermolysin-like proteases*
TTC	Cloreto de trifeniltetrazólio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17

1.1 O gênero de bactérias *Photorhabdus* 17

1.1.1 *A interação* Heterorhabditis-Photorhabdus *18*

1.1.2 *As três espécies do gênero* *24*

1.1.3 *Fatores de virulência em* Photorhabdus *25*

1.1.4 *Interesse econômico no estudo de* Photorhabdus *29*

1.2 Serralisinas como fatores de virulência 31

1.3 Linhagem MN7 33

2 OBJETIVOS 37

2.1 Objetivo geral 37

2.2 Objetivos específicos 37

3 MATERIAIS E MÉTODOS 39

3.1 Culturas 39

3.1.1 *P. luminescens* *39*

3.2 Purificação e análise de proteínas 39

3.2.1 *Precipitação de proteínas do sobrenadante de cultura de* P. luminescens *MN7* *39*

3.2.2 *Fracionamento celular* *40*

3.2.3 *Quantificação de proteínas pelo método do ácido bicinconínico (BCA)* *40*

3.2.4 *Zimografia e SDS-PAGE* *40*

3.2.5 *Ensaios enzimáticos com azocaseína e gelatina* *41*

3.2.6 *Cromatografias* *42*

3.2.7 *Ensaios enzimáticos com substratos sintéticos de "fluorescência apagada" (quenched fluorogenic substrates) com fluoróforo o-aminobenzoil* *42*

3.2.7.1 Determinação do resíduo preferencial para clivagem do substrato 43

3.2.7.2 Determinação do pH ótimo da protease 43

3.2.7.3 Curva da enzima e K_M da protease para o substrato Abz-GXXMXXQ-EDDnp 43

3.2.8 *Ensaios enzimáticos com substratos sintéticos de "fluorescência apagada" (quenched fluorogenic substrates) com fluoróforo 7-amino-4-metilcumarina* *44*

3.2.8.1 Ensaios com substratos de sequência específica para clivagem por PrtA ou por PrtS 44

3.2.8.2 Curva da enzima e K_M da protease para os substratos AMC 44

3.2.9 ***Ensaios enzimáticos com o substrato natural caseína-FTC*** *44*
3.2.10 ***Ensaios de inibição de proteases*** *45*
3.2.11 ***Análise de dados*** *46*
3.3 Sequências **46**
3.3.1 ***Busca por sequências homólogas a PrtA e PrtS no genoma de MN7*** *46*
3.3.2 ***Alinhamento e árvore de PrtA*** *47*
4 RESULTADOS **49**
4.1 Purificação e análise de proteínas **49**
4.1.1 ***Perfil eletroforético do fracionamento celular*** *49*
4.1.2 ***Atividade peptidásica do sobrenadante de cultura e do precipitado com sulfato de amônio*** *49*
4.1.2.1 Atividade peptidásica do sobrenadante de cultura em função do tempo *51*
4.1.3 ***Ensaios enzimáticos com azocaseína e gelatina*** *52*
4.1.4 ***Ensaios enzimáticos com substratos sintéticos de "fluorescência apagada" com o fluoróforo o-aminobenzoil*** *52*
4.1.4.1 Determinação da especificidade da enzima em função de um resíduo no substrato 52
4.1.4.2 Reações para determinação do pH ótimo da preparação de enzima *53*
4.1.4.3 Estabelecimento de parâmetros cinéticos da reação *53*
4.1.5 ***Ensaios enzimáticos com substratos sintéticos de "fluorescência apagada" com o fluoróforo 7-amino-4-metilcumarina*** *55*
4.1.5.1 Eleição das sequências de substratos para as proteases preditas PrtA e PrtS *55*
4.1.5.2 Ensaios com substratos de sequência específica para clivagem por PrtA ou por PrtS *56*
4.1.5.3 Ensaios de inibição *57*
4.1.5.4 Estabelecimento de parâmetros cinéticos da reação *57*
4.1.6 ***Ensaios enzimáticos com o substrato natural caseína-FTC*** *57*
4.1.7 ***Fracionamento das atividades proteolíticas por cromatografia*** *58*
4.2 Sequências **60**
4.2.1 ***Alinhamento das sequências de aminoácidos e construção do cladograma para as PrtAs*** *60*
5 DISCUSSÃO **63**
5.1 Purificação e análise de proteínas **63**
5.1.1 ***Fracionamento celular*** *63*

5.1.2 ***Precipitação das proteínas do sobrenadante de cultura de P. luminescens MN7*** *63*
5.1.3 ***Atividades enzimáticas observadas em zimograma nas linhagens P. luminescens TTO1 e MN7*** *64*
5.1.4 ***Ensaios enzimáticos*** *64*
5.1.5 ***Inibição das atividades enzimáticas*** *66*
5.1.6 ***Separação das atividades enzimáticas observadas*** *66*
5.2 Sequências **67**
5.2.1 ***PrtA*** *67*
6 CONCLUSÕES **69**
REFERÊNCIAS **71**

1 INTRODUÇÃO

1.1 O gênero de bactérias *Photorhabdus*

Photorhabdus é um gênero de bactérias com hábito de vida predominantemente entomopatogênico. São bactérias gram-negativas, anaeróbias facultativas, com formato de bastonete, apresentando motilidade e frequentemente, luminescência (FISCHER-LE SAUX et al., 1999). A maioria das linhagens deste gênero de bactérias apresenta bioluminescência na cor verde (BOEMARE; AKHURST; MOURANT, 1993).

Estas bactérias são encontradas exclusivamente em associação com nematoides do gênero *Heterorhabditis*, realizando infecções em artrópodes (BOEMARE; AKHURST; MOURANT, 1993). No entanto, é possível manter essas bactérias em laboratório, em cultura sem a presença de seu nematoide simbionte. Apesar de a maioria das espécies do gênero apresentar hábito exclusivamente entomopatogênico, a espécie *Photorhabdus asymbiotica* representa uma exceção, pois também pode ser encontrada em infecções em seres humanos (GERRARD et al., 2004).

Este gênero de bactérias está inserido no filo das proteobacterias, na classe γ-Proteobacteria, na ordem Enterobacteriales, família Enterobacteriaceae (THOMAS; POINAR, 1979). Dentre as Enterobacteriaceae estão outros gêneros de importância médica, como *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* e *Yersinia*, entre outros (HEERMANN; FUCHS, 2008). Por esse motivo, *Photorhabdus* é um interessante modelo de patogenicidade. Os genes Tc de *P. luminescens* TTO1[1], por exemplo, que são genes que codificam toxinas que contribuem para o sucesso da bactéria na infecção do inseto, apresentam grande similaridade com o correspondente em *Yersinia pestis*, agente causador da peste negra (RODOU; ANKRAH; STATHOPOULOS, 2010).

Anteriormente, o gênero *Photorhabdus* era classificado como uma única espécie de bactérias dentro do gênero *Xenorhabdus*, também de hábitos entomopatogênicos (THOMAS; POINAR, 1979). No entanto, evidências moleculares apontaram a monofilia de *Photorhabdus*, e o gênero foi então criado (BOEMARE; AKHURST; MOURANT, 1993; FISCHER-LE SAUX et al., 1999). O gênero *Photorhabdus* apresenta três espécies: *P. luminescens*, *P. temperata* e *P. asymbiotica* (WATERFIELD; CICHE; CLARKE, 2009) (**Figura 1**).

[1] A linhagem de *P. luminescens* TTO1 é frequentemente chamada de TT01, sendo mais comum a ocorrência da segunda nomenclatura na literatura. No entanto, os dados genômicos da linhagem foram depositados no GenBank sob o nome TTO1. Portanto, essa foi a nomenclatura adotada na tese.

Para seu ciclo de vida, é importante que *Photorhabdus* seja reconhecido por seu simbionte nematoide no ambiente, que seja capaz de matar o inseto hospedeiro, e que seja capaz de manter o cadáver do inseto livre de organismos competidores. Para a realização desses eventos, *Photorhabdus* produz uma vasta gama de metabólitos secundários. É previsto que aproximadamente 6% do genoma de *P. luminescens* TTO1 sejam sequências de genes destinados à produção de metabólitos secundários, quase o dobro dos 3.8% encontrados para *Streptomyces*, modelo para o estudo desses metabólitos (WATERFIELD; CICHE; CLARKE, 200). É suposto que o estudo de metabolismo secundário de *Photorhabdus* poderá revelar uma nova fonte de fármacos (BODE, 2009).

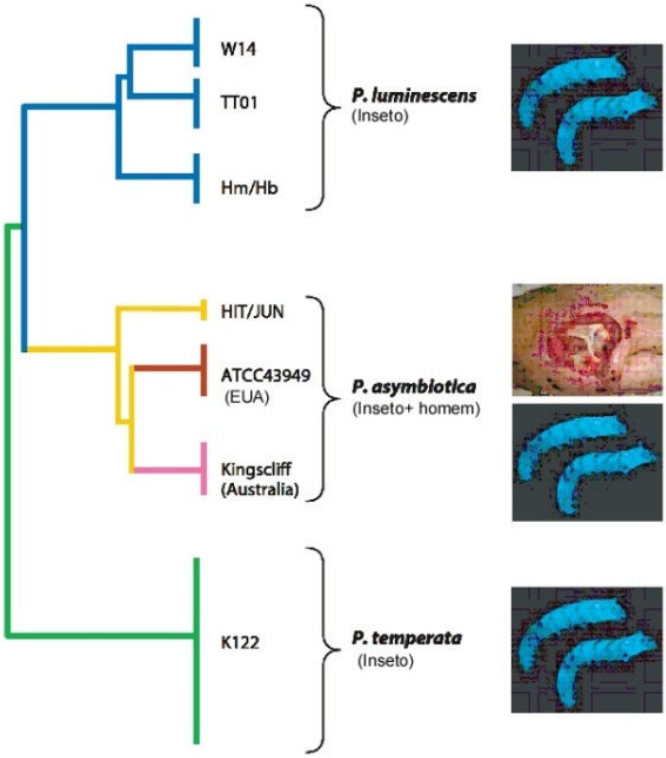
Photorhabdus apresenta um mecanismo muito peculiar para controle de expressão gênica. Durante seu ciclo de vida, a bactéria deve ser capaz de matar e colonizar o cadáver do inseto hospedeiro, mas em outro momento também deve ser capaz de sustentar o mutualismo com o nematoide. A forma patogênica, capaz de matar o inseto, apresenta células 17 vezes maiores do que a forma mutualista. A forma mutualística também apresenta crescimento mais lento do que a outra forma, além produzir menos metabólitos secundários, menos bioluminescência e ser avirulenta para o inseto. Durante essa alternância, *Photorhabdus* inverte um segmento de DNA que corresponde ao promotor do operon *mad*, que codifica proteínas integrantes de uma fímbria necessária para a adesão ao intestino da fêmea do nematoide (SOMVANSHI et al., 2012) (**Figura 2**).

O genoma de *P. luminescens* TTO1 (DUCHAUD et al., 2003) já foi completamente sequenciado, bem como o genoma de *P. asymbiotica* (WILKINSON et al., 2009; WILKINSON et al., 2010) e *P. temperata* (PARK et al., 2013), sendo que os genomas dentro do gênero apresentam tamanho entre 5 e 5,7 Mb (CLARKE, 2014). O sequenciamento do genoma de diferentes espécies do gênero permite a realização de estudos comparativos e evolutivos entre essas espécies, elucidando o mecanismo por trás das diferenças nas estratégias de infecção de cada uma delas.

1.1.1 *A interação* Heterorhabditis-Photorhabdus

As espécies do gênero *Photorhabdus* são normalmente encontradas em associação com nematoides do gênero *Heterorhabditis* (CICHE et al., 2006). A associação de *Heterorhabditis e Photorhabdus* lhes permite infectar uma vasta gama de artrópodes, principalmente insetos, mas até mesmo isópodes (SICARD et al., 2008) e carrapatos (DE OLIVEIRA VASCONCELOS et al., 2004; MONTEIRO et al., 2012).

Figura 1 – Filogenia das linhagens mais estudadas no gênero *Photorhabdus*

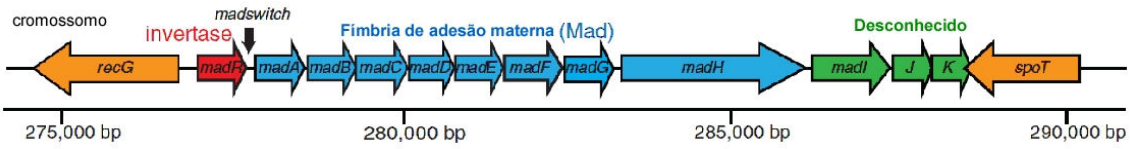


Esquema representativo da filogenia baseada em sequências de diversos locus do gênero *Photorhabdus*. Linhagens tipo de três diferentes espécies estão representados em diferentes clados. Modificado de Waterfield, Ciche e Clarke, 2009.

Heterorhabditis é um gênero de nematoides parasitoides, pertencente à ordem Rhabditida, inserida na classe Chromadorea do filo Nematoda. Essa ordem compreende a superfamília Rhabditoidea, que contém o gênero *Heterorhabditis*, além de superfamílias de importância médica. Entre elas está Strongylida, classe cujos representantes incluem os ancilostomídeos e os vermes filarióides (BLAXTER et al., 1998).

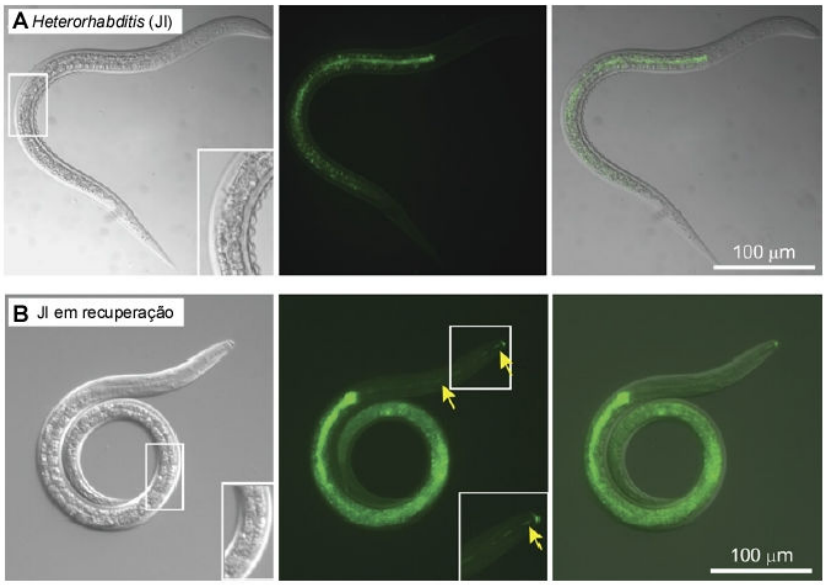
Heterorhabditis é encontrado no solo em apenas uma de suas fases de vida, a de juvenil infectante (JI), que corresponde à terceira fase larval do nematoide. As demais fases larvais e a fase adulta podem apenas ser encontradas no cadáver colonizado de insetos hospedeiros. O

Figura 2 – Localização cromossômica do locus *mad* em *Photorhabdus luminescens*



Mapa físico do locus *mad* em *P. luminescens*. A fímbria cofidicada por *mad* é necessária para o mutualismo com o nematoide. *madA* a *K* são expressas com a inversão do promotor *madswitch* localizado entre *madA* e *madR*. *madR* codifica uma invertase predita. Modificado de Somvanshi et al., 2012.

Figura 3 – *Heterorhabditis* e *Photorhabdus*

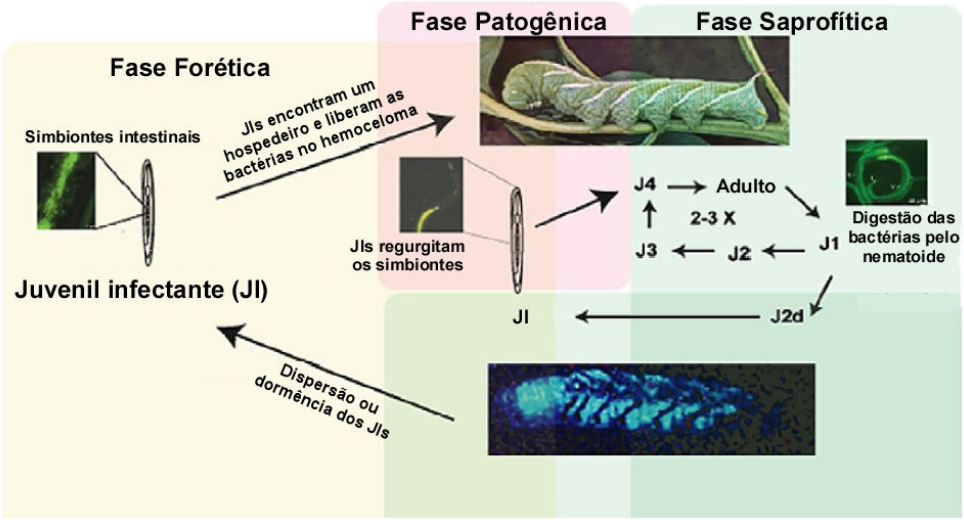


Juvenil infectante (JI) de *Heterorhabditis* e *Photorhabdus* expressando GFP em seu intestino. (A) JI de *Heterorhabditis* com células de *Photorhabdus* expressando GFP presentes na luz de seu intestino. À esquerda, microscopia Nomarski (quadrado branco indicando detalhe em aumento, sendo possível a visualização da cutícula dupla). Centro, imagem de epifluorescência. À direita, sobreposição. (B) JI de *Heterorhabditis* em recuperação. À esquerda, microscopia Nomarski (quadrado branco indicando detalhe em aumento, sendo possível visualizar a cutícula, não mais coberta pela cutícula da fase anterior). Centro, imagem de epifluorescência (quadrado branco indicando detalhe em aumento da boca, com dente autofluorescente, e setas amarelas indicando bactérias regurgitadas). À direita, sobreposição. Modificado de Hallem et al., 2007.

JI é uma fase larval de resistência, similar à fase de larva *dauer* de *Caenorhabditis elegans* (CICHE; EINSIGN, 2003). O JI apresenta células de *Photorhabdus* aderidas à porção anterior de seu intestino, e apresenta duas cutículas: a cutícula interna e a cutícula externa, retida desde a fase larval anterior (**Figura 3A**).

O JI penetra no corpo do inseto por orifícios como o ânus, a boca, espiráculos, ou mesmo realizando perfurações na cutícula dos insetos com seu aparelho bucal especializado (CICHE; EINSIGN, 2003). Após a invasão, o JI perde sua cutícula externa, e regurgita as bactérias *Photorhabdus*, presentes em seu intestino, na hemolinfa do inseto (**Figura 3B**), e essas são responsáveis por efetuar a evasão do sistema imune do inseto e a patogenicidade da infecção (HALLEM et al., 2007). A perda da cutícula externa e a regurgitação das bactérias após a entrada no corpo do inseto caracterizam o processo chamado de recuperação do JI. *Photorhabdus* causa septicemia no inseto entre dois e três dias após a infecção. Com a proliferação de *Photorhabdus*, os JIs retomam o seu desenvolvimento alimentando-se das bactérias, e finalmente, tornando-se uma fêmea hermafrodita adulta (BLAXTER; BIRD,

Figura 4 – Ciclo de vida de *Heterorhabditis*



O ciclo de vida de *Heterorhabditis* e seu simbionte *Photorhabdus* pode ser dividido em três fases: a fase forética, na qual o nematoide transporta a bactéria até o inseto hospedeiro; a fase patogênica, na qual a bactéria mata o inseto, e a fase saprofítica, na qual o nematoide se alimenta da bactéria e do cadáver do inseto bioconvertido por ela. Modificado de Ciche et al., 2006.

1997).

Heterorhabditis alimenta-se de *Photorhabdus* e do cadáver do inseto, bioconvertido por *Photorhabdus* para disponibilização da matéria orgânica. A bioconversão é efetuada por uma vasta gama de enzimas hidrolíticas, dentre elas proteases, lipases, e quitinases (ELEFTHERIANOS et al., 2010).

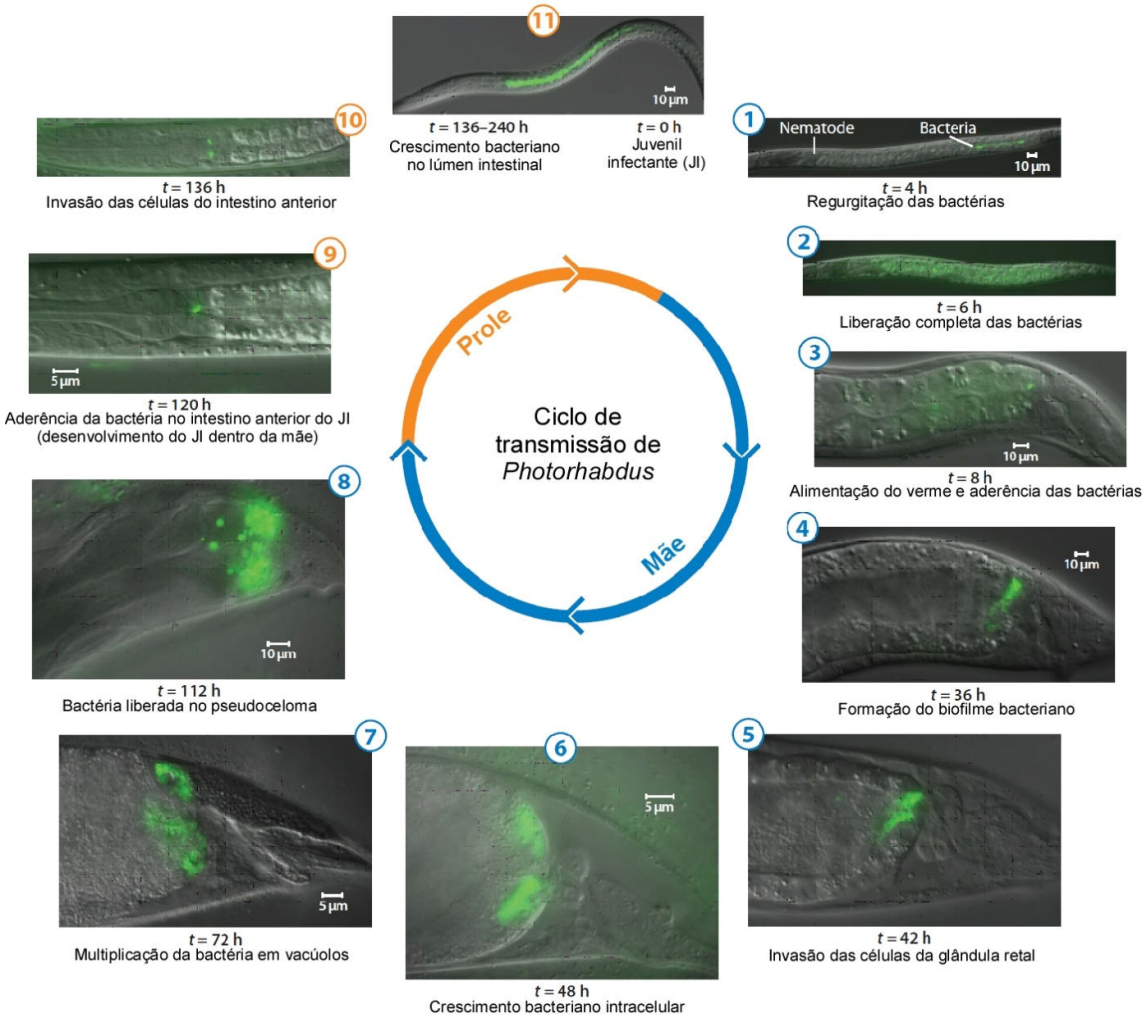
Enquanto existe uma quantidade de bactérias e matéria orgânica no cadáver do inseto suficiente para manter a população de nematoides, os nematoides proliferam, continuando seu desenvolvimento pelas fases larvais, sem entrar na fase de resistência JI. Isso normalmente ocorre por duas a três gerações, quando a população de adultos é composta por machos e fêmeas (CICHE et al., 2006). Com a diminuição da proporção de bactérias por nematoide, os vermes na primeira fase larval entram em uma via alternativa de desenvolvimento, estacionando o desenvolvimento na fase de JI até a invasão de um novo hospedeiro (CICHE et al., 2008) (**Figura 4**).

Um fato interessante sobre a colonização do cadáver do inseto por *Photorhabdus* e *Heterorhabditis* é que outros organismos não costumam ser encontrados no cadáver, indicando que o par *Photorhabdus* e *Heterorhabditis* possuem maneiras de combater organismos oportunistas que tentem invadir o cadáver. Foram detectados 23 *clusters* de genes no genoma de *Photorhabdus luminescens* relacionados à biossíntese de metabólitos secundários. Estes incluem dois *clusters* envolvidos na produção de sideróforos, e um que

inclui uma ácido graxo sintase pouco conhecida. Uma diversidade semelhante de *clusters* foi observada no genoma de *P. asymbiotica* (BODE, 2009).

Foi demonstrada a produção em *Photorhabdus* de um sideróforo chamado fotobactina (CICHE et al., 2003), de uma policetídeo sintase (BRACHMANN et al., 2007), de um estilbeno, sendo a primeira vez que esta classe de moléculas foi descrita fora do reino vegetal (JOYCE et al., 2008). Este estilbeno pode estar relacionado à simbiose com o nematoide, sendo necessária a presença desta molécula para o desenvolvimento normal do nematoide

Figura 5 – Ciclo de transmissão de *Photorhabdus* em *Heterorhabditis*



O ciclo de transmissão de *Photorhabdus* em *Heterorhabditis* ao longo do tempo. *t* = horas após início da recuperação do JI. (1) Vermes regurgitam bactérias (nenhuma bactéria sobra no intestino (2); a fluorescência observada é autofluorescência do intestino, pois a exposição é dez vezes maior do que nas outras micrografias.), e com a ingestão das bactérias durante a alimentação, algumas se aderem ao intestino posterior (3). (4) Crescimento do biofilme, e (5) invasão das células da glândula retal. (6) e (7) Crescimento bacteriano intracelular intravacuolar. (8) Lise da porção apical das células invadidas, libertando as bactérias para o pseudoceloma. (9) Aderência bacteriana às células da faringe e do intestino anterior. (10) Invasão dessas células e (11) crescimento bacteriano no lúmen intestinal. Modificado de Waterfield, Ciche e Clarke, 2009.

(JOYCE et al., 2008), mas também existem trabalhos que apontam para suas propriedades antibacterianas (HU; LI; WEBSTER, 1997; HU; WEBSTER, 2000; WILLIAMS; THOMAS; CLARKE, 2005), ou até mesmo para um papel na evasão do sistema imune do inseto. O estilbeno é capaz de inibir a enzima fenoloxidase, importante no processo de melanização desencadeado pela resposta imune inata do inseto (ELEFTHERIANOS et al., 2007). Além do estilbeno, outras moléculas podem ser necessárias para o estabelecimento da simbiose de *Heterorhabditis* e *Photorhabdus*, como por exemplo a fímbria codificada pelo gene *mad* citada anteriormente (SOMVANSHI et al., 2012).

Outros antibióticos devem ser produzidos também por *Photorhabdus*. Entre eles estão os carbapenemos, alguns pentapeptídeos citotóxicos preditos, e derivados de yersiniabactins (BODE, 2009). Além destes compostos, *Photorhabdus* produz diversos pigmentos, como antraquinonas e indigoidina, ainda de funções desconhecidas no ciclo da bactéria (BODE, 2009).

Heterorhabditis apresenta um mecanismo muito peculiar em seu ciclo de vida que garante que *Photorhabdus* esteja presente em todos seus descendentes, provavelmente devido ao fato de que a bactéria é essencial para o sucesso da infecção no hospedeiro. Este mecanismo envolve a endotoquia matricida durante a reprodução do nematoide (CICHE et al., 2008).

Esse mecanismo de transmissão vertical das bactérias começa com *Photorhabdus* invadindo as células epiteliais da porção posterior do intestino da mãe, nas glândulas retais do intestino. A bactéria multiplica-se nessa fase dentro de vacúolos celulares, garantindo a exclusividade da colonização por *Photorhabdus* nessas células. Uma lise da porção basal das células epiteliais intestinais ocorre, permitindo a liberação das bactérias para o pseudoceloma materno (CICHE et al., 2008).

A endotoquia matricida em *Heterorhabditis* consiste na eclosão dos ovos de nematoide ainda dentro da mãe. As larvas recém-emergidas se alimentam dos tecidos da mãe, ocasionando sua morte numa fase chamada de *bag of worms*. Durante a fase *bag of worms*, as larvas entram em contato com as células de *Photorhabdus* enquanto se alimentam no pseudoceloma materno, garantindo assim a associação entre a prole do nematoide e a linhagem de bactéria simbionte (CICHE et al., 2008) (**Figur**a **5**).

É interessante destacar que a simbiose de *Photorhabdus* e *Heterorhabditis* é bastante peculiar. Enquanto na fase de vida do nematoide JI, o par comporta-se como numa relação mutualística típica, já nas demais fases de vida do nematoide, enquanto vive no cadáver do inseto, o nematoide se alimenta das bactérias desenvolvidas no cadáver (CLARKE, 2014).

Dados na literatura sugerem que *Photorhabdus* deve controlar essas mudanças no comportamento do simbionte através de mediadores químicos como o estilbeno (JOYCE et al., 2008). Dados moleculares indicam também uma modulação da simbiose realizada pela bactéria, já que genes nos genomas sequenciados até o momento, com exceção de genes envolvidos na produção de estilbeno e de LPS, são na maioria das vezes exclusivamente expressos na fase mutualística ou na fase patogênica (CLARKE, 2014).

1.1.2 *As três espécies do gênero*

Desde 1999, *Photorhabdus* é um gênero de bactérias que contém três espécies (FISCHER-LE SAUX et al., 1999). Essa classificação foi confirmada recentemente por dados moleculares, entre eles o sequenciamento de genomas de espécies do gênero (DUCHAUD et al., 2003; WILKINSON et al., 2009; PARK et al., 2013).

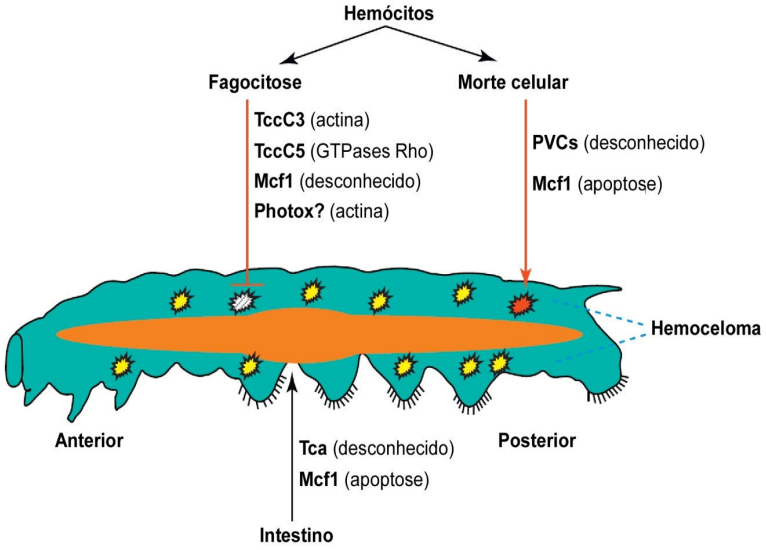
A espécie *P. luminescens* foi a primeira espécie a ser descrita, ainda como *Xenorhabdus luminescens* (THOMAS; POINAR, 1979). A linhagem TTO1, da espécie *P. luminescens*, foi a primeira a ser sequenciada no gênero *Photorhabdus* (DUCHAUD et al., 2003). Por este motivo, TTO1 tem sido adotada como uma linhagem de referência para este gênero (CLARKE, 2014).

P. temperata, assim como *P. luminescens*, é uma espécie encontrada exclusivamente em associação com o nematoide, e também já teve seu genoma sequenciado e anotado (PARK et al., 2013). No genoma destas duas espécies foram descritos diversos genes para fímbrias com expressão exclusiva na fase mutualística com o nematoide, indicando uma forte regulação da simbiose entre nematoide e bactéria (CLARKE, 2014). Nenhuma destas espécies parece estar adaptada para a vida sem a associação com o nematoide, diferentemente de *P. asymbiotica* (WATERFIELD; CICHE; CLARKE, 2009).

Photorhabdus asymbiotica foi inicialmente encontrada em feridas de seres humanos associadas a picadas de aranha (PEEL et al., 1999). Esta espécie recebeu este nome já que não havia sido encontrada em associação com um nematoide, embora mais tarde tenha sido encontrada em associação com um nematoide (GERRARD et al., 2006), e este nematoide fora identificado como uma nova espécie (PLICHTA et al., 2009).

O mecanismo da infecção em humanos usado por *P. asymbiotica* ainda não foi descrito, especialmente se a bactéria é capaz de iniciar a infecção sozinha ou se a bactéria requer a participação de um vetor (COSTA et al., 2010), mas a espécie mantém sua capacidade de infecção em insetos em associação com o nematoide (WATERFIELD; CICHE; CLARKE,

Figura 6 – Interações de *Photorhabdus* com o sistema imune de insetos



Photorhabdus é capaz de interagir com o sistema imune de insetos em diferentes pontos. Toxinas como as Tcc e Mcf1 são capazes de inibir a fagocitose dos hemócitos, permitindo que a bactéria escape desta etapa da defesa imune. Alguns PVCs e a Mcf1 são capazes de induzir morte celular. Já Tca e também a mesma Mcf1 são capazes de causar apoptose do epitélio do intestino do inseto. Modificado de Eleftherianos et al., 2010.

2009). Estudos recentes foram realizados para tentar elucidar as aquisições evolutivas necessárias para que esta espécie fosse capaz de conquistar um novo nicho em humanos (COSTA et al., 2009; WILKINSON et al., 2009).

O genoma desta espécie já foi sequenciado na linhagem ATCC43949, e por enquanto é o único genoma no gênero que apresenta um elemento extracromossômico (plasmídeo) (WILKINSON et al., 2009).

1.1.3 *Fatores de virulência em* Photorhabdus

Após invadido, o inseto hospedeiro arma uma série de defesas contra o patógeno invasor. A primeira linha de defesa é composta por peptídeos antimicrobianos (AMPs) e espécies reativas de oxigênio (ROS), principais agentes do sistema imune humoral dos insetos (ELEFTHERIANOS et al., 2010). Depois, o braço celular do sistema imune dos insetos utiliza a fagocitose para se livrar de patógenos, além da formação de agregados de hemócitos, encapsulando o invasor. *Photorhabdus* apresenta a capacidade de evadir estes mecanismos através de moléculas chamadas de fatores de virulência, que desmontam a resposta imune do inseto com diferentes alvos, e que podem também levar à morte do inseto (WATERFIELD; CICHE; CLARKE, 2009) (**Figura 6**). Estes fatores de virulência incluem proteínas, que podem ser classificadas como toxinas e enzimas hidrolíticas secretadas (FELFÖLDI, 2010).

Toxinas como as Mcf (*makes caterpillars floppy*) (DABOM et al., 2002), Pir (*Photorhabdus* insect related), entre outras codificadas por PVCs (*Photorhabdus* virulence cassettes) são conhecidas por seu importante papel na morte do inseto (FELFÖLDI, 2010). Devido ao alto número e diversidade de PVCs em cada linhagem de *Photorhabdus*, acredita-se que estes podem ser responsáveis pela capacidade de infecção de diferentes grupos de artrópodes pelo mesmo patógeno (ELEFTHERIANOS et al., 2010). Mais recentemente, têm sido estudados os complexos de toxinas (Tcs), codificados em uma das quatro ilhas de patogenicidade encontradas no genoma de *P. luminescens* TTO1, PAI I. Três dessas ilhas de patogenicidade contém genes para toxinas, e uma contém genes para um sistema de secreção de tipo III (RODOU; ANKRAH; STATHOPOULOS, 2010).

Um dos complexos de toxinas (Tc), composto pelas proteínas TcA, TcB, e TcC, foi recentemente estudado. Este complexo de toxinas do tipo ABC apresenta TcA e TcB funcionando como um mecanismo de injeção para a exportação de TcC para a célula alvo a ser atacada. TcC é a toxina efetora, uma ADP-ribosiltransferase capaz de causar problemas na polimerização de actina, problemas na fagocitose e até morte celular (LANG et al., 2010). TcA forma um poro intermembrana em *P. luminescens*, e com a participação de TcB, é capaz de transportar TcC de seu citoplasma diretamente ao citoplasma de célula alvo (GATSOGIANNIS et al., 2013).

A toxina Mcf1 de *Photorhabdus* foi descrita como sendo capaz de promover o fenótipo "*floppy*" em lagartas infectadas, caracterizado pela perda do turgor corporal nas lagartas. Esse fenótipo típico da infecção por *Photorhabdus* também foi observado quando células de *Escherichia coli* transformadas com um plasmídeo contendo o gene que codifica a toxina Mcf1 foram injetadas em lagartas (DABOM et al., 2002). Normalmente, células de *E. coli* seriam combatidas e eliminadas pelo sistema imune do inseto. Foi observado que Mcf causa danos no tecido epitelial do intestino de insetos, além de causar *blebbing* de hemócitos, que são formações bolhosas anormais na membrana plasmática da célula, que podem indicar o início de um processo apoptótico (DOWLING et al., 2004). Mais tarde foi demonstrado que em células de cultura de mamífero, a toxina Mcf1 é capaz de induzir a apoptose pela via mitocondrial devido à presença de um sítio BH3-like em sua sequência (DOWLING et al., 2007).

As proteínas do tipo Pir de *Photorhabdus* apresentam uma atividade citotóxica e inseticida proeminente, especialmente observada na fusão das proteínas PirA e PirB (LI et al., 2014). É possível que a atividade inseticida observada seja devido a similaridade das toxinas Pir com uma proteína expressa diferencialmente ao longo do desenvolvimento de insetos.

Essa proteína apresenta atividade de esterase de hormônio juvenil nos insetos, mas não as toxinas Pir. É possível que as toxinas Pir mimetizem a proteína naturalmente expressa no inseto, interrompendo o desenvolvimento do inseto (WATERFIELD et al., 2005).

Além das funções já apontadas anteriormente para o estilbeno produzido por *Photorhabdus*, é possível que esta mesma molécula também tenha a função de inibir a fenoloxidase, enzima responsável pela melanização (ELEFTHERIANOS et al., 2010). A melanização consiste na formação de nódulos melanóticos ao redor de patógenos atacados pelo sistema imune. A inibição da cascata de melanização diminui a resistência do inseto ao patógeno (ELEFTHERIANOS et al., 2010).

Diversas enzimas secretadas podem ser consideradas fatores de virulência, como as enzimas CDTa de *Clostridium difficile* (DAVIES et al., 2011), a adenilato ciclase de *Bordetella pertussis* (CARBONETTI, 2010), e diversas proteínas no grupo das serralisinas, por exemplo, a toxina ZapA de *Proteus mirabilis* (WALKER et al., 1999) As enzimas com função de toxina são normalmente secretadas para fora da bactéria por sistemas de secreção conhecidos, como o sistema de tipo I (RODOU; ANKRAH; STATHOPOULOS, 2010), ou até mesmo injetadas dentro da célula do hospedeiro como citado anteriormente (GATSOGIANNIS et al., 2013).

Tabela 1 – Peptidases putativas no genoma de *Photorhabdus luminescens* TTO1

Tipo catalítico	Quantidade
Asparagino-peptidases	2
Aspártico-peptidases	4
Cisteíno-peptidases	15
Metalopeptidases	34
Mistas	22
Serino-peptidases	51
Não definidas	3

Peptidases putativas no genoma de *Photorhabdus luminescens* TTO1 organizadas de acordo com seu tipo catalítico predito. Dados disponíveis no banco MEROPS (RAWLINGS et al., 2014)

De acordo com a anotação do genoma de *Photorhabdus luminescens* TTO1, as lipases representam uma classe importante das proteínas secretadas. TTO1 codifica pelo menos dez triacilglicerol lipases, além de fosfolipases A e D. Também são preditos genes que codificam quitinases no genoma de *P. luminescens* TTO1 (DUCHAUD et al., 2003). Essas enzimas

podem estar relacionadas à bioconversão do cadáver do inseto, ou relacionadas ao desligamento do sistema imune do inseto.

Diversas proteases putativas foram identificadas no genoma de TTO1. De acordo com o MEROPS (RAWLINGS et al., 2014) o genoma de *Photorhabdus luminescens* possui 131 genes que codificam peptidases putativas (http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/speccards?sp=sp002263;type=peptidase). Muitos desses genes podem nem ser transcritos, ser pouco expressos, ou expressos sob controle de operadores induzíveis. Muitas das proteases de *Photorhabdus* devem ser intracelulares, podendo ocupar o periplasma ou o citoplasma da célula. Essas peptidases estão distribuídas nos diversos clãs (**Tabela 1**).

Dentre as proteases secretadas por *Photorhabdus*, destacam-se por sua abundância as metaloproteases *repeats-in-toxin* (RTX), pertencentes ao clã das metzincinas (dependentes de zinco) e similares a outras proteases RTX produzidas por bactérias como *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Serratia*, e *Yersinia* (BOWEN et al., 2003). Uma dessas metaloproteases RTX é PrtA, que será discutida mais a frente.

Outra protease secretada em grande quantidade por *Photorhabdus* é PrtS. PrtS é uma metaloprotease de 38 kDa, com atividade similar a de PrtA em ensaios enzimáticos com substratos sintéticos e ensaios funcionais. No entanto, anticorpos policlonais contra PrtA não reconhecem PrtS, indicando que as duas enzimas são diferentes e não apenas isoformas da mesma proteína. Além disso, PrtS não é inibida por EDTA como PrtA (CABRAL et al., 2004).

Dados obtidos com a sequência de PrtS indicam que esta protease pertence ao clã MA de metaloproteases, na subfamília M4 (HELD et al., 2007). As metaloproteases do clã M4, assim como outras metalopeptidases, possuem um motivo HEXXH em seu sítio catalítico. A protease tipo desta família é a termolisina de *Bacillus thermoproteolyticus* (RAWLINGS; BARRET, 1993).

A termolisina de *B. thermoproteolyticus* é usada frequentemente como uma protease não específica. Sua atividade apresenta uma curva normal de pH ao redor do pH ótimo de 7 (VAN DEN BURG; EIJSINK, 2013). A adição de íons Ca^{2+} aumenta a estabilidade da protease, evitando a autólise. Assim como outras metaloproteases, a termolisina é inibida reversivelmente por 1,10-fenantrolina, mas irreversivelmente por EDTA, já que este último quela os íons de Ca^{2+}, promovendo a autólise da protease (VAN DEN BURG; EIJSINK, 2013). Enquanto a termolisina é uma protease bastante estudada, as proteases similares a termolisina (thermolysin-like proteases, TLP) são muito menos conhecidas (VAN DEN BURG; EIJSINK, 2013).

PrtS é capaz de induzir uma forte resposta de melanização no inseto (HELD et al., 2007), e é capaz de clivar peptídeos da hemolinfa de *Galleria mellonella* (CABRAL et al., 2004), indicando que esta protease pode estar envolvida na evasão do sistema imune realizada por *Photorhabdus*. No entanto, essa protease foi menos estudada, e sua função na infecção ainda não foi elucidada.

Os fatores de virulência devem ser secretados pela bactéria no hemoceloma do inseto. O principal sistema utilizado na secreção de lipases e proteases em *P. luminescens* TTO1 parece ser do tipo I (DUCHAUD et al., 2003). O sistema de secreção de tipo I está presente em bactérias gram-negativas e realiza a secreção através de um complexo exportador capaz de abrir espaço na membrana interna e externa utilizando energia oriunda da hidrólise de ATP (ANGKAWIDJAJA; KANAYA, 2006). Alguns fatores de virulência para o inseto parecem ser exportados para o meio pelo sistema TPS ("Two Partner Secretion") (DUCHAUD et al., 2003). Entretanto, toxinas como PVC devem ser secretadas livremente (WATERFIELD; CICHE; CLARKE, 2009). O sistema de secreção de tipo III também está presente em *Photorhabdus*. O sistema de tipo III apresenta a capacidade de exportar produtos celulares diretamente para o citosol da célula alvo, formando uma estrutura como uma agulha. Análises filogenéticas revelam a proximidade do sistema de secreção de tipo III de *Photorhabdus* com o sistema de *Yersinia*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bordetella* e *Desulfovibrio* (RODOU; ANKRAH; STATHOPOULOS, 2010). Os sistemas de secreção de tipo IV e VI também estão presentes, entre outros (DUCHAUD et al., 2003).

1.1.4 *Interesse econômico no estudo de* Photorhabdus

Photorhabdus representa um interessante modelo para o estudo de patogenicidade por fazer parte de uma classe de bactérias de grande importância médica como é a família das Enterobacteriaceae (THOMAS; POINAR, 1979). Diferentes genes relacionados à fatores de virulência em *Photorhabdus* apresentam grande identidade com genes de outras espécies de bactérias patogênicas, como por exemplo *Yersinia pestis* (RODOU; ANKRAH; STATHOPOULOS, 2010).

Além do parentesco com espécies de bactérias de grande importância médica, o gênero *Photorhabdus* também pode ser um modelo pertinente para o estudo de patogenia devido ao patógeno humano emergente *P. asymbiotica* (PEEL et al., 1999). *P. asymbiotica* foi isolada de ferimentos humanos, onde aparentemente não era apenas um agente oportunista, mas sim causador da patogenia (GERRARD et al., 2004). Catorze casos foram registrados, todos

localizados na Austrália ou no Texas, EUA (WATERFIELD; CICHE; CLARKE, 2009). É possível que este padrão geográfico de ocorrências seja explicado por *P. asymbiotica* não ser incluído nos testes padrão em hospitais e laboratórios. Entretanto, os locais onde casos foram registrados já estão familiarizados com a identificação desta bactéria. Portanto, acredita-se que a estimativa de infecções em humanos com este patógeno esteja subestimada (COSTA et al., 2010).

O estudo do genoma de *P. asymbiotica* revelou que esta adquiriu um plasmídeo semelhante a pMT1 de *Y. pestis* (WILKINSON et al., 2009). Entretanto, *P. asymbiotica* apresenta um genoma menor que *P. luminescens*, além de uma menor diversidade de fatores inseticidas como Mcf, Tcs e PVCs (ELEFTHERIANOS et al., 2010). A existência de um nematoide entomopatogênico (*Heterorhabditis indica*) (GERRARD et al., 2006) associado a esta bactéria indica que *P. asymbiotica* pode ser um patógeno humano emergente, fazendo da espécie um modelo interessante do estudo de patógenos (GERRARD; WATERFIELD; SANCHEZ-CONTREERAS, 2011).

Photorhabdus também se destaca por sua impressionante quantidade de metabólitos secundários secretados, especialmente pela quantidade de genes dedicados à produção de metabólitos secundários. 6% do genoma de *P. luminescens* TTO1 é composto por genes envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários, sendo que o modelo atual para produção destes compostos, *Streptomyces*, apresenta apenas 3,8% (WATERFIELD; CICHE; CLARKE, 2009). Esses metabólitos secundários podem estar relacionados não apenas ao controle da resposta imune do inseto, mas também à produção de compostos que garantem a exclusividade da colonização do cadáver do inseto e a disponibilização da biomassa do inseto para o nematoide, como antibióticos, antifúngicos, bacteriocinas, proteases, lipases e lipopolissacarídeos (BODE, 2009).

Um sideróforo foi identificado em *Photorhabdus* e batizado de fotobactina A produção de fotobactina pela bactéria é necessária para manutenção da simbiose com o nematoide, mas também parece ser importante na manutenção da antibiose do cadáver, já que apresenta propriedades antibióticas (CICHE et al., 2003). Foi também identificado em *Photorhabdus* uma fotopirona, que pode controlar o fenômeno de *quórum sensing*. O controle desse fenômeno por uma molécula como essa é pouco usual. Normalmente, o *quórum sensing* é controlado em enterobactérias por moléculas como as N-acil homoserina-lactonas (AHLs). É possível que *Photorhabdus* adote essa outra molécula para bactérias competidoras não se beneficiem de seus sinais químicos para o *quórum sensing* no cadáver do inseto (BRACHMANN et al., 2013).

A grande variedade de moléculas que atuam no ataque ao inseto também permite que esta bactéria seja fonte de alternativas às toxinas *Bt* de *Bacillus thuringiensis* utilizadas atualmente em produtos agrícolas transgênicos, já que diversos insetos atualmente apresentam resistência a essas toxinas. As toxinas Pir são propostas como candidatos para inseticidas (RODOU; ANKRAH; STATHOPOULOS, 2010), inclusive sua atividade larvicida já foi demonstrada em *Aedes aegypti* e *A. albopictus* (AHANTARIG et al., 2009).

Alguns metabólitos secundários podem ser usados no combate a importantes doenças em seres humanos. Foi demonstrado que um epóxido identificado na infecção de *Photorhabdus* em *Galleria mellonella* é citotóxico para algumas linhagens de cânceres humanos, mas menos tóxico em células normais (HU et al., 2006). Também uma glidobactina isolada de *P. asymbiotica* apresenta atividade citotóxica contra células pancreáticas humanas (THEODORE et al., 2012). Mesmo o estilbeno produzido por *Photorhabdus* apresenta atividade fungicida contra espécies de importância médica como *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus* e *Candida tropicales* (LI et al., 1995).

O sistema imune inato é bastante conservado entre os grupos de animais. Entender melhor os mecanismos de infecção por *Photorhabdus* em insetos, e estudar melhor as defesas empregadas pelo sistema imune inato destes insetos pode ainda nos ajudar a entender melhor o sistema imune inato de humanos (ELEFTHERIANOS et al., 2010).

1.2 Serralisinas como fatores de virulência

As serralisinas são proteases pertencentes ao clã MA de metalopeptidases, as metzincinas. Elas estão na subfamília M10B de metaloproteases de matriz, a subfamília contendo enzimas de origem procariótica (RAWLINGS et al., 2014). A serralisina de *Serratia marcescens* é a enzima tipo deste grupo, tendo sido primeiro descrita em meios de cultura dessa bactéria. Outras bactérias gram-negativas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Erwinia chrysantemi*, *Ps. Fluorescens* e *Photorhabdus* spp. secretam proteases relacionadas à serralisina. Seu posicionamento dentro do clã MA juntamente com outras metaloproteases foi possível devido à elucidação da sua estrutura terciária (BAUMANN, 2012).

Serralisinas apresentam clivagem preferencial por resíduos de tamanho médio e hidrofóbicos na posição P1'. Resíduos hidrofóbicos na posição P2 e P2' podem contribuir positivamente para a clivagem do substrato. Tipicamente, o pH ótimo dessas proteínas é próximo de 8, mas a curva de pH pode apresentar pHs favoráveis à reação desde pH 6 até pH 10. São inibidas por EDTA e 1,10-fenantrolina, mas recuperam sua atividade com a adição de

íons de Co^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+} entre outros (BAUMANN, 2012).

A serralisina é uma protease de 55 kDa e pI entre 4,5 e 5,5. O Zn^{2+} catalítico é ligado a 3 histidinas no motivo HEXXHXXGXXH. O ácido glutâmico é o resíduo catalítico que ativa a molécula de água ligada ao zinco para realizar o ataque nucleofílico à ligação peptídica (VOLLMER et al., 1996).

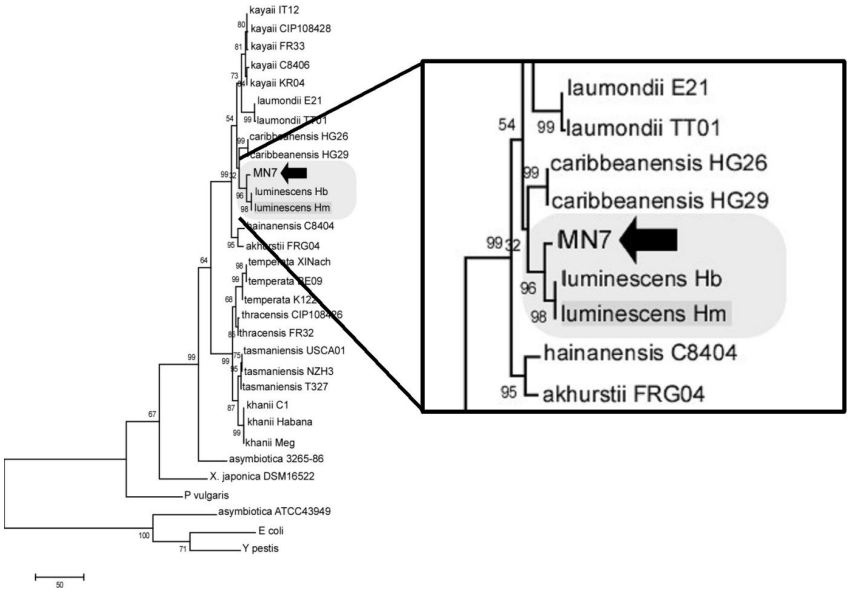
Proteínas desta subfamília são também caracterizadas pela presença do motivo RTX, *repeats-in-toxin*, apresentando um sinal de secreção C-terminal, mas não um peptídeo sinal N-terminal (BAUMANN, 2012).

Apesar de a função destas proteases ainda não estar completamente elucidada, diversas serralisinas são utilizadas como fatores de virulência, e são produzidas durante a infecção pelas bactérias. A aeruginolisina é secretada durante a infecção por *Ps. aeruginosa*, e aumenta a adesão da bactéria em epitélio das córneas de camundongos (GUPTA et al., 1996). A própria serralisina de *S. marcescens* apresenta um papel importante na infecção por este organismo, aumentando a liberação de citocinas (VOLLMER et al., 1996), e ZapA, de *Proteus mirabilis* é capaz de aumentar a sobrevivência da bactéria durante infecções (WALKER et al., 1999).

Photorhabdus secreta uma serralisina chamada PrtA. PrtA é uma metaloprotease que possui 56 kDa e é secretada pela bactéria (CABRAL et al., 2004). PrtA pertence a subfamília das serralisinas, a subfamília M10B (FELFÖLDI, 2010), como classificada no banco MEROPS (RAWLINGS et al., 2014). Em ensaios prévios, PrtA foi inibida por EDTA e 1,10-fenantrolina (CABRAL et al., 2004), e este dado é condizente com sua classificação como uma metaloprotease. PrtA é codificada por um operon já sequenciado em diversas linhagens de *P. luminescens*, e neste operon estão contidos o gene que codifica a PrtA (*prtA*), o gene de seu inibidor putativo *inh*, e de mais três proteínas (*prtB*, *prtC* e *prtD*) que são membros de um transportador de membrana de tipo I, capaz de secretar PrtA (BOWEN et al., 2003).

De acordo com Felföldi (2010), PrtA é um fator de virulência que deve ser capaz de efetuar parte do desligamento do sistema imune inato do inseto. Foi demonstrado que PrtA é capaz de clivar diversos peptídeos da hemolinfa de insetos relacionados a diferentes etapas da resposta imune. No lepidóptero *Manduca sexta*, foram identificados 16 peptídeos clivados por PrtA. Essas proteínas alvo de PrtA incluem proteínas relacionadas ao reconhecimento de patógenos, sinalização de vias de sistema imune, e mesmo peptídeos antimicrobianos como as escolexinas A e B (FELFOLDI et al., 2009). Foi demonstrado que PrtA, bem como outra protease similar, a PrtS, é capaz de reduzir a atividade antimicrobiana da hemolinfa de *Galleria mellonella*, e das cecropinas A e B (CABRAL et al., 2004). Durante a infecção no

Figura 7 – Análise filogenética do gênero *Photorhabdus*, com destaque para o clado de *Photorhabdus luminescens*



Árvore do gênero *Photorhabdus* montada por máxima parcimônia. Foram utilizadas as sequências dos genes *recA* de cada linhagem depositados no GenBank. O clado de MN7 apresentado nesta árvore foi confirmado por árvores baseadas nas sequências de *gyrB*, *glnA* e 16S. As árvores foram geradas com o programa MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007) e os alinhamentos foram feitos com o programa Clustal X 2.0 (Larkin *et al.*, 2007) Modificado de (Almenara *et al.*, 2012).

inseto, PrtA foi encontrada inicialmente no intestino, depois no corpo gorduroso, músculos e traquéias associadas (SILVA et al., 2002). Os dados funcionais sobre essa protease estão entre os primeiros estudos que atribuem funções biológicas para as serralisinas (FELFÖLDI et al., 2009).

Os alvos da catálise por metaloproteases deste grupo ainda são pouco conhecidos. ZapA de *Pt. mirabilis* catalisa a degradação de anticorpos IgA, e é possível que este seja o motivo pelo qual ZapA aumenta a eficiência da infecção por *Pt. mirabilis* (WALKER et al., 1999). No entanto, estudos mais extensos sobre os alvos desse grupo de metaloproteases ainda não foram realizados.

1.3 Linhagem MN7

A linhagem LPP7 de *Heterorhabditis baujardi* foi isolada de amostras de solo da cidade de Monte Negro, RO, pelo laboratório da Profa. Dra. Cláudia Dolinski. (DOLINSKI et al., 2008). Larvas de *G. mellonella* foram colocadas sobre as amostras de solo, fazendo com que JIs presentes no solo pudessem infectar as larvas. Larvas mortas com sinais de infecção pelo nematoide (coloração roxo avermelhado) foram colocadas em *White traps*, que permitem que os JIs resultantes da infecção sejam coletados em meio aquoso (WHITE, 1927). Os JIs

Figura 8 – Grupos ortólogos compartilhados e exclusivos de algumas linhagens relacionadas a *P. luminescens* MN7

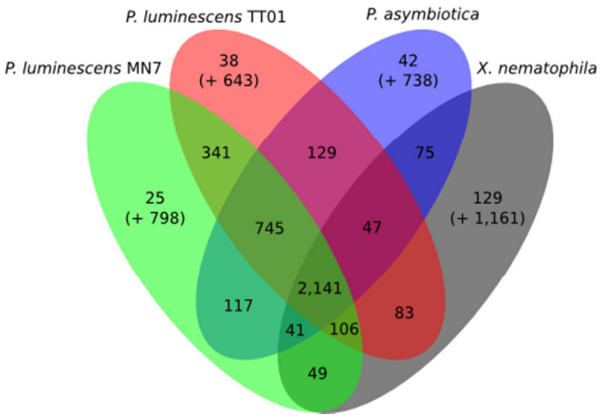
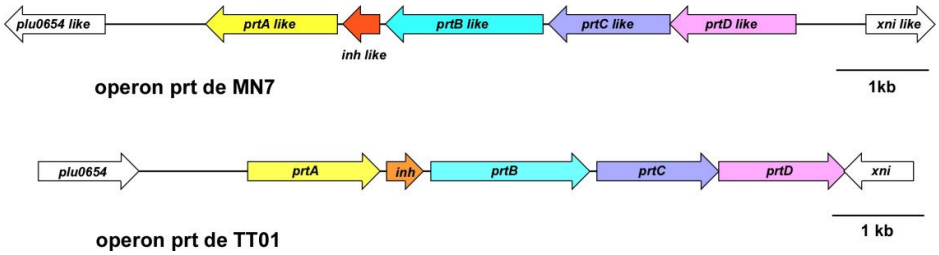


Diagrama de Venn apresentando a quantidade de ortólogos preditos pelo programa OrthoMCL (Li, Stoeckert e Roos, 2003) e compartilhados por diferentes cepas de bactérias simbiontes de nematoides entomopatogênicos. Os números entre parênteses representam os *singletons*, ou seja, genes que não foram classificados em nenhum grupo ortólogo com nenhum outro gene, de nenhum dos quatro genomas. Winter, dados não publicados.

coletados foram colocados sobre uma placa de meio LB após lavagens com hipoclorito de sódio 1,5% (v/v), esterilizando o nematoide, e forçando a recuperação do JI por remoção da cutícula externa (FORST et al., 1997). Com isso, o nematoide regurgita a bactéria, e após a identificação por sequenciamento do gene do SSU-rRNA confirmando a linhagem bacteriana, a linhagem MN7 foi estabelecida (KAMITANI, 2010) e posicionada dentro da filogenia do gênero (ALMENARA et al., 2012) (**Figura 7**).

O genoma da linhagem MN7 de *Photorhabdus luminescens* foi totalmente sequenciado, montado e anotado pelo projeto desenvolvido em nosso laboratório (WINTER, proc. FAPESP 10/51973-0)[2], em colaboração com o Prof. Dr. Arthur Gruber. O genoma foi sequenciado por pirosequenciamento na plataforma Roche 454. A montagem final do genoma resultou num

Figura 9 – Operon de PrtA em *P. luminescens* MN7 comparado ao mesmo operon em TTO1



Orientação dos genes *prtA*, *prtB*, *prtC*, *prtD* e *inh* nas linhagens de *P luminescens* TTO1 e MN7. Winter, dados não publicados.

[2] Processo sob supervisão do Prof. Dr. Carlos Eduardo Winter, dados não publicados.

total de 5,38 Mb, com um conteúdo GC de 42,57% (WINTER, dados não publicados).

Grupos ortólogos foram identificados entre o genoma de MN7, *P. asymbiotica*, *P. luminescens* TTO1, e *Xenorhabdus nematophila* (**Figura 8**). MN7 apresenta 798 grupos ortólogos exclusivos, chamados de *singletons*, pois não foi identificada identidade destes grupos com nenhum outro gene presente nas outras linhagens (WINTER, dados não publicados).

Dentre os genes anotados no genoma de *P. luminescens* MN7, encontram-se 83 sequências correspondentes a proteases putativas. Esses genes foram preditos por identidade com sequências de outras linhagens de *Photorhabdus* depositadas no banco.

PrtA é codificada, em *P luminescens* TTO1, dentro de um operon que contém a protease, PrtB, PrtC e PrtD, que provavelmente compõem o poro para exportação de PrtA (DUCHAUD et al., 2003), e *ihn*, gene que codifica um inibidor endógeno para PrtA (**Figura 9**). Todos esses genes foram identificados em *P luminescens* MN7, assim como o gene para PrtS (WINTER, dados não publicados).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Descrever as atividades peptidásicas mais abundantes de *Photorhabdus luminescens* MN7, tendo em vista a importância do funcionamento destas enzimas para o hábito de vida entomopatogênico desta bactéria.

2.2 Objetivos específicos

Este projeto tem como objetivos específicos:

- ajustar protocolos de ensaios enzimáticos para peptidases de *P. luminescens* MN7.
- realizar um isolamento bioquímico por cromatografia das atividades hidrolíticas mais proeminentes detectadas nos ensaios enzimáticos.
- realizar a caracterização mecanística das principais atividades peptidásicas.
- analisar as atividades peptidásicas ao longo da curva de crescimento de *P. luminescens* MN7.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Culturas

3.1.1 *P. luminescens*

As culturas de *P. luminescens* MN7 foram crescidas a 28 °C sob agitação (180 RPM em shaker orbital) por 24 horas em meio LB líquido, ou a 28 °C por 48 horas em meio LB-ágar contendo piruvato de sódio 0,1% (p/v). As placas foram armazenadas a 4 ºC por até 20 dias.

Para armazenamento por longos períodos as culturas líquidas foram congeladas, como se segue. Após crescimento em meio de cultura, dimetil sulfóxido (DMSO) foi adicionado ao meio de cultura para concentração final de 10% (v/v) e o material foi armazenado em alíquotas de 500 µL por volta de -200 ºC em nitrogênio líquido.

A bactéria foi crescida em placas de meio de cultura diferenciais, como meio Difco™ MacConkey Ágar (Becton, Dickinson and Company, Sparks, Maryland, Estados Unidos da América) e meio NBTA (1 L de ágar nutriente, 0,04 g de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC), 0,025 g de Azul de Bromotimol (BTB)), para confirmação da fase da bactéria.

3.2 Purificação e análise de proteínas

3.2.1 *Precipitação de proteínas do sobrenadante de cultura de* P. luminescens *MN7*

Uma cultura de 100 mL de *P. luminescens* MN7 foi crescida como descrito acima. As bactérias foram precipitadas por centrifugação (6000 *g* a 4 °C por 15 minutos), e o sobrenadante submetido ao processo de *salting out*.

O *salting out* foi realizado com sulfato de amônio (For biochemistry; Merck, Darmstadt, Alemanha). Foi feita uma solução de sulfato de amônio, saturada a 4 ºC, cujo pH foi acertado para 7,0 com amônia 3,0 N. Essa solução de sulfato de amônio foi adicionada lentamente, sob agitação, ao sobrenadante de cultura, a 4 ºC, até uma concentração final de 90% da saturação.

Após 24 horas, o precipitado foi separado por centrifugação (8000 *g* a 4 °C por 45 minutos), e ressuspendido em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8.

A solução das proteínas precipitadas foi submetida a diálise em um cassete para diálise Slide-A-Lyzer® 10K Dialysis Cassette (Pierce, Rockford, Illinois, Estados Unidos da América). A diálise foi realizada em 100 volumes de tampão Tris-HCl 10 mM pH 8, a 4 °C

com agitação. O tampão da diálise era trocado após pelo menos 6 horas, até que não houvesse mais sulfato de amônio detectável em teste com cloreto de bário (1 mL de uma solução de $BaCl_2$ 1% (p/v) foi adicionado a 10 mL do tampão de diálise, e se não houvesse precipitação visível de sulfato de bário, a amostra era considerada livre de sulfato de amônio).

3.2.2 *Fracionamento celular*

Para separação de uma fração de conteúdo periplasmático, e uma fração de conteúdo citoplasmático e associado a membrana, as células de *P. luminescens* foram submetidas à um protocolo de choque osmótico. Para obtenção das células, alíquotas de 2 mL de uma cultura líquida em meio LB foi centrifugada e o sobrenadante de cultura foi removido. Uma amostra deste sobrenadante foi guardada. As células foram ressuspendidas em 150 µL de sacarose 20% em Tris-HCl 10 mM pH 7,5. Foram adicionados 5 µL de EDTA 500 mM pH 8, e as amostras foram incubadas a 4 °C por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas a 4 °C, 31500 *g*, por 5 minutos. O sobrenadante coletado foi chamado de fração periplasmática, e o pellet foi ressuspendido em 100 µL de água e considerado correspondente a fração celular e de membrana. As amostras foram submetidas a 100 °C por 2,5 minutos em tampão de amostra antes do fracionamento por SDS-PAGE (KOSHLAND; BOTSTEIN, 1980).

3.2.3 *Quantificação de proteínas pelo método do ácido bicinconínico (BCA)*

Proteínas totais nas amostras foram quantificadas pelo método do ácido bicinconínico (BCA). Foi utilizado o kit "BCA Protein Assay kit" (Pierce). De acordo com as instruções do fabricante, 25 µL de amostra foram incubados em 200 µL de working reagent WR (50 partes de reagente A, 1 parte de reagente B). Após incubação a 37 °C por 30 minutos, as amostras foram colocadas novamente em temperatura ambiente, e a leitura da absorbância foi feita para um comprimento de onda de 562 nm. Para construção da curva padrão, foi utilizada uma solução de albumina bovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos da América), cuja concentração foi determinada por absorbância a 280 nm, levando em conta o coeficiente de extinção dessa proteína (TANFORD, 1961).

3.2.4 *Zimografia e SDS-PAGE*

Um volume de solução das proteínas foi misturado à temperatura ambiente com um volume de tampão de amostra 2X [Tris 62,5 mM pH 6,8, glicerol 12,6% (m/v); azul de

bromofenol 0,015% (v/v)], sem aquecimento e na ausência de agentes redutores. As proteínas dissolvidas foram fracionadas em SDS-PAGE (T=10%). O gel de corrida com T=10%, continha gelatina para concentração final de 500 μg/ml.

A corrida foi realizada a 4 °C com corrente constante de 5mA em uma cuba SE250 Mighty Small (Hoefer Inc., Holliston, Massachusetts, Estados Unidos da América). Finalizada a eletroforese, o gel foi incubado com agitação a 4 °C por 2x 30 minutos em Tris-HCl 100 mM pH 8 e Triton X-100 2,5% (v/v), para remoção do SDS presente no gel. Mais uma incubação de 30 minutos foi realizada da mesma maneira que as demais, mas desta vez em tampão Tris-HCl 100 mM pH 8. Após a remoção deste tampão, a amostra foi incubada por 18 horas sem agitação a 4 °C em Tris-HCl 100 mM pH 8.

Após a incubação, o gel foi fixado com TCA 10% por 1 hora à temperatura ambiente, lavado com água destilada e então corado em Coomassie Blue R-350 (PhastGel Blue; GE LifeSciences, Piscataway, New Jersey, Estados Unidos da América) 0,025% (m/v) dissolvido em metanol:ácido acético:água (5:1:4 v/v/v) contendo $CuSO_4$ 0,1% (m/v), como descrito pelo fabricante. O gel foi então descorado com ácido acético 7% (v/v). Todos os géis foram corridos com padrão de massa molecular PageRuler Unstained Protein Ladder (Fermentas, Vilnius, Lithuania).

Para ensaios de SDS-PAGE, não foi adicionada gelatina ao gel de poliacrilamida, e a corrida foi realizada com ddp constante em 120V. Após a corrida, o gel foi fixado com TCA 10% por 1 hora, corado com Coomassie Blue e descorado como descrito anteriormente.

3.2.5 *Ensaios enzimáticos com azocaseína e gelatina*

O ensaio enzimático com azocaseína foi feito em tampão fosfato 100 mM pH 7 a 28 °C. Diferentes quantidades de proteína do precipitado de sulfato de amônio 90% e do sobrenadante de cultura foram incubadas com 1,25% (p/v) de azocaseína por até 1 hora. As reações foram paradas com TCA para concentração final de 7,5% (v/v). As amostras foram então centrifugadas (8000 *g* por 5 minutos) e o sobrenadante foi coletado. NaOH foi adicionado para concentração final de 500 mM e a absorbância a 440 nm foi lida para cada uma das amostras.

Foi realizado também um ensaio enzimático com gelatina. O ensaio foi feito em tampão fosfato 100 mM pH 7 a 28 °C. Diferentes quantidades do precipitado com sulfato de amônio e do sobrenadante de cultura foram incubados com 1 mg/mL de gelatina por até 1 hora. As reações foram paradas com TCA para concentração final de 16,5% (v/v). As amostras foram

então centrifugadas (8000 *g* por 5 minutos) e o sobrenadante foi coletado. Os peptídeos solúveis em TCA, presentes no sobrenadante foram quantificados pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951) modificado para neutralizar o ácido presente na solução. A solução C foi feita na hora misturando 50 partes de solução A (Na_2CO_3 2% (p/v), NaOH 1,6% (p/v), tartarato 0,02% (v/v)) e 1 parte de solução B ($CuSO_4$ 0,5% (p/v)). Foram coletados 200 µL do sobrenadante e 1 mL de solução C foi adicionado. Depois de 5 minutos, foram adicionados 100 µL de reagente de Folin não diluído. Após 30 minutos, a absorbância a 750 nm foi lida para cada uma das amostras.

3.2.6 *Cromatografias*

As cromatografias foram realizadas utilizando o sistema ÄKTA Prime Plus (GE Healthcare Lifesciences, Uppsala, Suécia).

Para a coluna de trocador aniônico HiTrap™ Q FF 1 mL (GE Healthcare Lifesciences), foi utilizado um gradiente de zero até 1 M de NaCl, em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8, ou eluição em steps, de 0, 0,15, 0,2, 0,3, 0,6, 0,8 e 1 M de NaCl. O gradiente de eluição correspondia a 20 ou 40 volumes da coluna. Frações de 0,5 ou 1 mL foram coletadas ao longo do processo. O *flow-through* também foi integralmente coletado. Demais parâmetros da corrida foram adotados como recomendado pelo fabricante.

3.2.7 *Ensaios enzimáticos com substratos sintéticos de "fluorescência apagada" (quenched fluorogenic substrates) com fluoróforo o-aminobenzoil*

Substratos sintéticos de fórmula geral Abz-GXXXXXQ-EDDnp foram gentilmente cedidos pelo Prof. Luiz Juliano Neto (Depto. de Biofísica, UNIFESP). O ensaio foi realizado como descrito por (HIRATA et al., 1995). Um aumento na fluorescência pode ser observado após a clivagem do substrato, quando o grupo supressor (N-(2,4-Dinitrofenil)-etilenodiamina, EDDnp) é liberado, permitindo que o grupo o-aminobenzoil (Abz) emita fluorescência em 420 nm após excitação no comprimento de onda de 320 nm.

Após confirmação da atividade peptidásica presente no sobrenadante de cultura, foram feitos ensaios utilizando também a amostra precipitada com sulfato de amônio. Foram utilizados substratos com todas as posições de aminoácidos aleatorizados, e também substratos que apresentavam apenas o aminoácido na posição P1 fixo. De acordo com a disponibilidade destes, foram testados os substratos com os seguintes aminoácidos fixos na posição P1: metionina, asparagina, leucina, fenilalanina, arginina, serina e glicina. Todas as

reações foram feitas em triplicata.

3.2.7.1 Determinação do resíduo preferencial para clivagem do substrato

As reações foram realizadas a 28 °C, nos pHs 4, 7 e 9. Os substratos contendo metionina, asparagina, leucina, fenilalanina, arginina, serina, glicina, ou um resíduo aleatório na posição Z na fórmula Abz-GXXZXXQ-EDDnp foram utilizados numa concentração final de 10 µM. Foram utilizados 50 µL de sobrenadante de cultura ou de amostra precipitada com sulfato de amônio. As reações realizadas em pH 4 foram feitas em tampão acetato 20 mM, e as reações em pH 7 e 9, em tampão Tris-HCl 20 mM. Leituras foram realizadas a cada 20 segundos por 2 horas no fluorímetro de placa Spectramax M2e (Molecular Devices, Sunnyvale, California, Estados Unidos da América).

3.2.7.2 Determinação do pH ótimo da protease

Reações para determinação do pH ótimo da enzima foram realizadas a 28 °C em tampão universal (MES 25 mM, Tris-HCl 75 mM, ácido acético 25 mM e glicina 25 mM). O substrato escolhido foi Abz-GXXMXXQ-EDDnp (metionina fixa em P1), por apresentar a maior fluorescência após digestão com esta amostra. O substrato foi utilizado numa concentração final de 10 mM. Leituras foram realizadas a cada 20 segundos por 2 horas no fluorímetro de placa Spectramax M2e.

3.2.7.3 Curva da enzima e K_M da protease para o substrato Abz-GXXMXXQ-EDDnp

As reações para determinação do K_M da protease foram feitas a 28 °C em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8, utilizando o substrato que propiciou a maior atividade da enzima (metionina fixa em P1) em concentrações variáveis. Quantidades variáveis de precipitado com sulfato de amônio e das frações cromatográficas selecionadas foram utilizadas e estão indicadas nos resultados. Devido à disponibilidade de equipamentos, nestes ensaios foi utilizado um fluorímetro de placa PolarStar Omega (BMG Labtech, Ortenberg, Alemanha), e filtros: excitação 355 nm e emissão 460 nm. Aumentos proporcionais na fluorescência deste substrato continuaram a ser observados, assim como nos experimentos realizados com os parâmetros do equipamento anterior. Leituras foram feitas a cada 1,5 minuto por 90 minutos.

3.2.8 *Ensaios enzimáticos com substratos sintéticos de "fluorescência apagada" (quenched fluorogenic substrates) com fluoróforo 7-amino-4-metilcumarina*

Sintetizados pela primeira vez por Zimmerman, Yurewicz e Patel (1976), substratos para proteases com o fluoróforo 7-amino-4-metilcumarina (AMC) são muito utilizados por sua alta sensibilidade. O fluoróforo AMC, após sua liberação do peptídeo, apresenta uma fluorescência até 700 vezes maior do que quando ligado ao peptídeo. Apresentam máxima fluorescência em comprimentos de onda de excitação de 380 nm, emitindo em 460 nm. Substratos com as sequências peptídicas de interesse foram sintetizados sob encomenda pelos laboratórios Merck Millipore (Merck).

3.2.8.1 Ensaios com substratos de sequência específica para clivagem por PrtA ou por PrtS

As reações foram realizadas a 28 °C, em tampão fosfato 20 mM pH8, utilizando entre 5 a 40 μM de substrato. Foram utilizados entre 10 a 25 μL de sobrenadante de cultura, de amostra precipitada com sulfato de amônio, fração cromatográfica ou fração celular. Leituras foram realizadas a cada 1,5 minuto por 90 minutos no fluorímetro de placa PolarStar Omega (BMG Labtech), usando filtros: excitação 355 nm e emissão 460 nm. A fluorescência observada nas reações foi correlacionada à fluorescência do fluoróforo AMC livre em solução no mesmo tampão para inferência da quantidade de produto formado.

3.2.8.2 Curva da enzima e K_M da protease para os substratos AMC

As reações para determinação do K_M da protease foram feitas a 28 °C em tampão fosfato 20 mM pH 8, utilizando os substratos em concentrações variáveis. Quantidades variáveis de precipitado com sulfato de amônio e das frações cromatográficas selecionadas foram utilizadas e estão indicadas nos resultados. Para estes ensaios também foi utilizado um fluorímetro de placa PolarStar Omega (BMG Labtech), e filtros: excitação 355 nm e emissão 460 nm. Leituras foram feitas a cada 1,5 minuto por 90 minutos. A fluorescência observada nas reações foi correlacionada à fluorescência do fluoróforo AMC da mesma maneira descrita acima.

3.2.9 *Ensaios enzimáticos com o substrato natural caseína-FTC*

Um ensaio de fluorescência apagada necessita de dois fluoróforos: um funcionando

como o doador de energia, e o outro como o aceptor de energia. Com essa interação, a fluorescência é observada em níveis mais baixos quando os fluoróforos estão próximos, na mesma molécula, do que quando os fluoróforos se encontram em produtos diferentes da digestão.

O substrato caseína-FTC (Pierce) consiste na caseína nativa marcada com FITC em excesso. O fluoróforo FTC, quando na molécula de caseína-FTC, é capaz de suprimir sua própria fluorescência. Ou seja, na molécula de caseína-FTC, os fluoróforos FTC agem como doadores e aceptores de energia, um fenômeno conhecido como autossupressão (*auto-quenching*). Após a digestão da caseína, os peptídeos menores marcados com FTC resultantes da digestão apresentam maiores níveis de fluorescência do que a proteína íntegra. O pico de fluorescência de caseína-FTC pode ser observado com excitação no comprimento de onda de 485 nm, e emissão de 538 nm.

Os ensaios foram realizados em tampão fosfato 20 mM pH 8 e concentração final de caseína-FTC de 5 μg/mL na reação, ou concentrações variáveis. Quantidades variáveis de enzima foram utilizadas nas reações. Foi construída uma curva padrão de digestão com Proteinase K para determinação da linearidade de fluorescência em função da quantidade de produto formado.

As reações foram lidas em fluorímetro de placa PolarStar Omega (BMG Labtech) com filtros excitação 460 nm ou 485 nm, e emissão 520 nm devido a disponibilidade de equipamentos.

3.2.10 *Ensaios de inibição de proteases*

Foram realizados ensaios de inibição com o substrato caseína-FTC e com os substratos de fluorescência apagada com o fluoróforo AMC. Foram utilizados os inibidores EDTA e 1,10-fenantrolina para metaloproteases, E64 para cisteíno-proteases, pepstatina para aspártico-proteases, e PMSF para serino-proteases. As concentrações utilizadas foram escolhidas de acordo com dados da literatura (CABRAL et al., 2004; BARRETT; RAWLINGS; WOESSNER, 2012), e estão indicadas nos resultados. As enzimas foram incubadas à temperatura ambiente em tampão fosfato 20 mM pH 8 por 30 minutos antes do início das reações para ensaios de inibição. O controle foi mantido à temperatura ambiente em tampão fosfato 20 mM pH 8 por 30 minutos.

3.2.11 *Análise de dados*

As velocidades iniciais das reações enzimáticas foram calculadas utilizando os primeiros pontos obtidos nas reações que ainda apresentassem um aumento linear na fluorescência com o tempo.

No caso dos ensaios com o substrato de fluorescência apagada Abz, a reta de regressão linear foi calculada, e o coeficiente angular de sua equação foi adotado como velocidade da reação (unidades arbitrárias de fluorescência/segundo, AFU/s). Já que as unidades de fluorescência fornecidas pelo equipamento eram ajustadas em função do ganho da amostra de maior emissão de fluorescência presente no experimento, apenas velocidades obtidas na mesma leitura de placa foram comparadas. O mesmo foi feito para os ensaios com o substrato natural caseína-Fitc.

Para os substratos sintéticos com o fluoróforo AMC foi possível calcular a quantidade de produto formada nas reações à partir de uma curva padrão de fluorescência de AMC livre em função da concentração.

Os K_Ms foram calculados a partir do plot de Lineweaver-Burk, dado por ${}^{1}/_{vel} \times {}^{1}/_{[S]}$ (LINEWEAVER; BURK, 1934). As retas de regressão linear foram calculadas, e o negativo do valor inverso de x para $y = 0$ foi assumido como o K_M da amostra para um determinado substrato. O inverso do valor de y para $x = 0$ foi assumido como a V_{max} da reação.

Os K_Ms também foram calculados pelos plots de Hanes-Woolf e Eadie-Hofstee.

O plot de Hanes-Woolf é dado por $[S]$ no eixo das abscissas, e por ${}^{[S]}/_{v}$ no eixo das ordenadas. Tem-se então que $\frac{[S]}{v} = \frac{[S]}{V_{max}} + \frac{K_M}{V_{max}}$ (HANES, 1932), e com isso é possível calcular o K_M da amostra para um determinado substrato.

O plot de Eadie-Hofstee é dado por $v \times {}^{v}/_{[S]}$, sendo o K_M o negativo da inclinação da reta de regressão linear dos dados, e a V_{max} sendo o intercepto do eixo y (HOFSTEE, 1959).

Os programas utilizados na análise dos dados e construção dos gráficos foram Excel (Microsoft, v. 2010) e Origin (Microcal, v. 4.1).

3.3 Sequências

3.3.1 *Busca por sequências homólogas a PrtA e PrtS no genoma de MN7*

Sequências homólogas a PrtA e PrtS de *P. luminescens* TTO1 e *P. temperata* Az29,

respectivamente, foram encontradas no genoma de MN7 utilizando a ferramenta de busca desenvolvida durante o projeto genoma de MN7 (WINTER; GRUBER, 2013).

3.3.2 *Alinhamento e árvore de PrtA*

As sequências de PrtA de *P. luminescens* e da serralisina de *Serratia marcescens*, depositadas no MEROPS, e aquela de PrtA obtida do genoma de MN7 foram alinhadas no programa Clustal X v. 2.0.10. (LARKIN et al., 2007). A partir do alinhamento com sequências de PrtAs de outras espécies e que incluiu também o gênero *Xenorhabdus*, foi construído um cladograma utilizando o programa MEGA4, versão 4 (TAMURA et al., 2007).

A comparação da estrutura 3D de serralisinas com as PrtAs foi feita utilizando o programa Raswin (v. 2.7.1; http://www.bernstein-plus-sons.com/).

4 RESULTADOS

4.1 Purificação e análise de proteínas

4.1.1 *Perfil eletroforético do fracionamento celular*

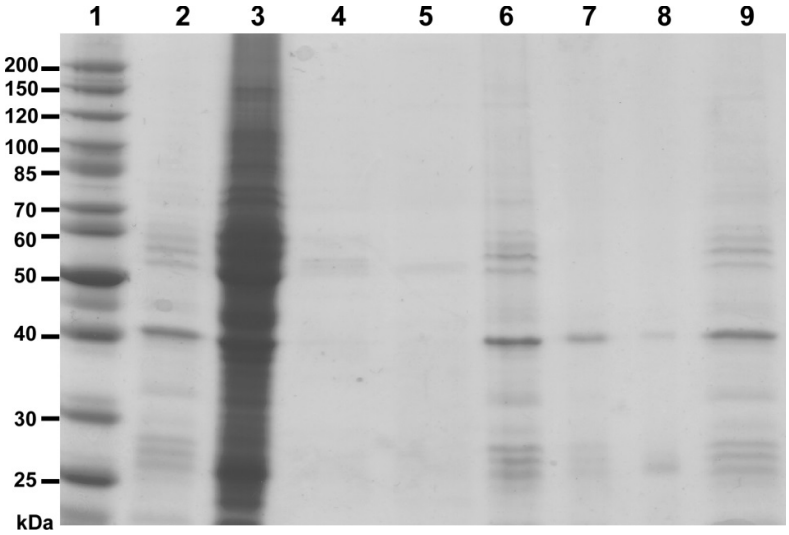
Foi realizado um SDS-PAGE das frações obtidas pelo fracionamento celular. É possível observar uma grande quantidade de proteínas na fração citoplasmática e de membrana, e uma quantidade intermediária na fração periplasmática. Uma quantidade menor de proteínas pode ser observada na fração de sobrenadante de cultura. É possível observar uma banda majoritária de aproximadamente 40 kDa nas duas últimas frações citadas (**Figura 10**).

A amostra 8 na **Figura 10** apresenta um padrão de proteínas bastante distinto àquele da amostra 3, sendo que ambas são amostras da mesma preparação. Isso provavelmente se deve à ausência de SDS no tampão de amostra da amostra 8.

4.1.2 *Atividade peptidásica do sobrenadante de cultura e do precipitado com sulfato de amônio*

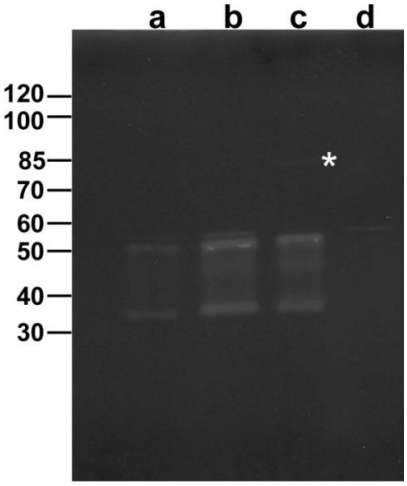
O sobrenadante de cultura foi submetido à zimografia como descrito em Materiais e

Figura 10 – SDS-PAGE das amostras obtidas por fracionamento celular de *P. luminescens* MN7



SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10%. (1) Padrão; (2, 6, 7, 9) Fração celular periplasmática; (3, 8) Fração celular de membrana e citoplasmática; (4, 5) Sobrenadante de cultura. As amostras 2, 3, 4 e 5 foram dissolvidas em tampão de amostra 2X contendo EDTA 0,5 mM, enquanto as amostras 6, 7, 8 e 9 foram dissolvidas em tampão de amostra 2X como descrito em Materiais e Métodos. Apenas as amostras 2, 3, 4, 7 e 8 foram submetidas a incubação a 100 °C por 10 minutos.

Figura 11 – Zimografia das atividades proteásicas secretadas no meio de cultura de *P. luminescens* MN7



Zimograma em gel de gelatina. (a) 5 µL de sobrenadante de cultura estacionária (24h) após armazenamento a -20 ºC por 3 meses; (b) atividade presente em 10 µg de proteína do precipitado, do meio de cultura 24h, em 90% de saturação de sulfato de amônio; (c) 5 µL de sobrenadante de cultura estacionária (24h) diluído 10x sem armazenamento; (d) 5 µL de sobrenadante de cultura estacionária (24h) diluído 100x sem armazenamento. À esquerda da figura estão mostradas as posições dos padrões de massa molecular em kDa. O asterisco na figura indica uma banda de fraca atividade na amostra (c). Essa atividade não foi observada em outras amostras.

Métodos, e foi possível detectar duas bandas majoritárias que apresentaram atividade peptidásica em zimografia em gel de gelatina. As bandas apresentaram massas aproximadas de 50 e 38 kDa (**Figura 11**).

A precipitação do meio de cultura com sulfato de amônio foi realizada para concentrar as proteínas da amostra e evitar a presença dos componentes do meio de cultura e de diferentes metabólitos secundários e carboidratos secretados que poderiam interferir com os ensaios subsequentes. *P. luminescens* secreta diferentes compostos coloridos, como a antraquinona (LI et al., 1995; BODE, 2009). Além disso, esta bactéria forma um biofilme, e mesmo na cultura líquida crescida em agitação a bactéria provavelmente secreta polissacarídeos presentes neste biofilme (AMOS et al., 2011). Isso também é percebido pela viscosidade mais elevada do meio originado de culturas em fase estacionária (dados não apresentados).

O precipitado de sulfato de amônio redissolvido não apresentava mais o aspecto viscoso inicial, mas a amostra ainda apresentava uma coloração levemente amarelada, provavelmente devida a traços da antraquinona que é secretada por *P. luminescens* MN7 (ALMENARA et al., 2012). No entanto, esta coloração não interferiu nos ensaios colorimétricos realizados subsequentemente. Este mesmo precipitado manteve as atividades de protease observadas por

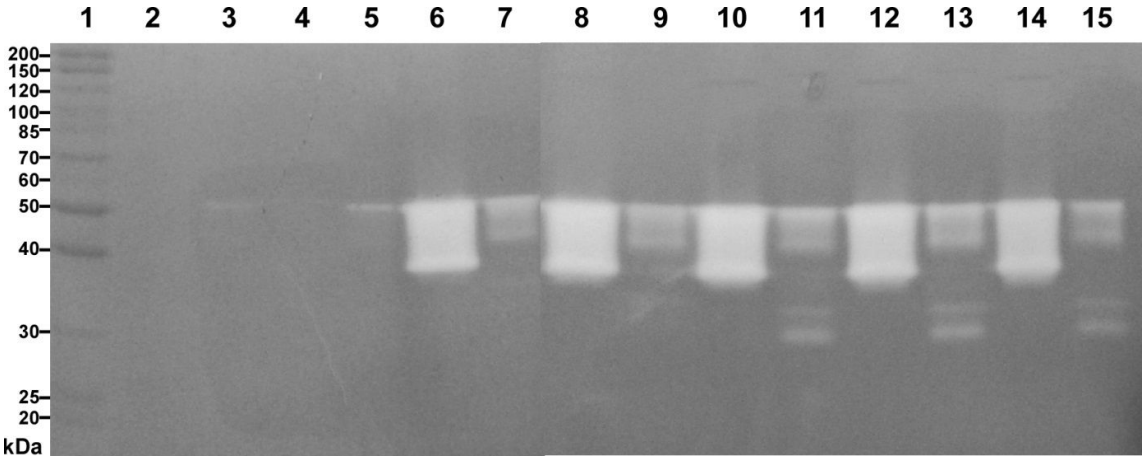
zimografia no sobrenadante de cultura (**Figura 11**).

4.1.2.1 Atividade peptidásica do sobrenadante de cultura em função do tempo

Foi possível observar por zimografia em amostras do sobrenadante de cultura um aumento na atividade peptidásica sobre gelatina a partir das 18 horas de cultura de MN7 (**Figura 12**, amostra 6). As atividades detectadas por este método correspondem às atividades peptidásicas de massa 50 e 38 kDa observadas na zimografia da precipitação com sulfato de amônio, e são persistentes mesmo até as 96 horas de crescimento da cultura (**Figura 12**, amostra 14).

Já para *Photorhabdus luminescens* TTO1, é possível observar uma fraca atividade peptidásica de massa próxima de 50 kDa desde as 6 horas de cultura (**Figura 12**, amostra 3), aumentando sua quantidade à partir das 18 horas de cultura (**Figura 12**, amostra 7). Outra banda pode ser observada a partir deste tempo de massa de aproximadamente 40 kDa. É possível observar duas bandas adicionais correspondentes a atividades proteásicas de massas de aproximadamente 28 e 32 kDa, à partir das 48 horas de cultura, possivelmente correspondentes à autoproteólise das atividades de maior massa molecular (**Figura 12**, amostra 11).

Figura 12 – Zimografia das atividades proteásicas secretadas no meio em diferentes tempos de crescimento na cultura de *P. luminescens* TT01 e *P. luminescens* MN7



Zimografia em gel de gelatina. (1) Padrão; (2) Sobrenadante de cultura de MN7 após 6 horas de crescimento; (3) Sobrenadante de cultura de TTO1 após 6 horas de crescimento; (4) Sobrenadante de MN7, 12 horas; (5) Sobrenadante de TTO1, 12 horas; (6) Sobrenadante de MN7, 18 horas; (7) Sobrenadante de TTO1, 18 horas; (8) Sobrenadante de MN7, 24 horas; (9) Sobrenadante de TTO1, 24 horas; (10) Sobrenadante de MN7, 48 horas; (11) Sobrenadante de TTO1, 48 horas; (12) Sobrenadante de MN7, 72 horas; (13) Sobrenadante de TTO1, 72 horas; (14) Sobrenadante de MN7, 96 horas; (15) Sobrenadante de TTO1, 96 horas. Foram utilizados 10 µL de cada amostra.

4.1.3 *Ensaios enzimáticos com azocaseína e gelatina*

Inicialmente, a amostra foi incubada com azocaseína como descrito em Materiais e Métodos. Não foi possível observar nenhuma atividade peptidásica, mesmo depois de ajustar quantidades de substrato e de proteína na preparação de enzima.

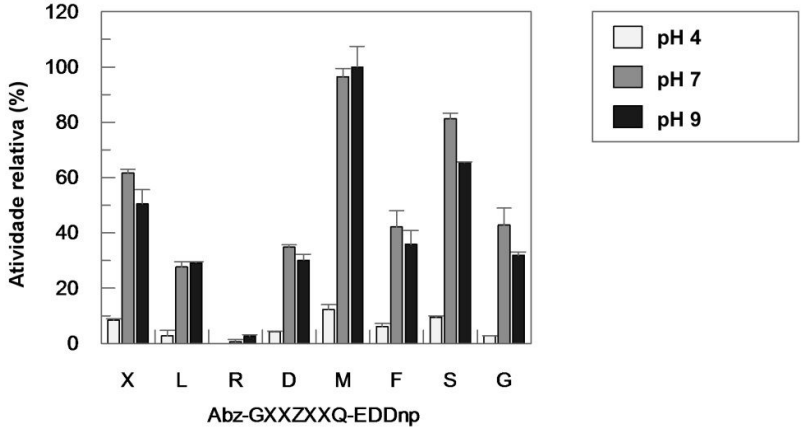
Foram então realizados ensaios com gelatina solúvel como descrito em Materiais e Métodos. No entanto, as reações incubadas com a amostra de sobrenadante e com o precipitado não apresentaram sinal acima dos brancos, mesmo apesar de as zimografias que revelaram a atividade enzimática terem sido feitas com gelatina incluída nos géis de eletroforese. Foram feitas diversas tentativas, variando pH e tampões, mas não conseguimos encontrar uma condição em que fosse possível detectar atividade em solução sobre gelatina da preparação de protease (dados não apresentados).

4.1.4 *Ensaios enzimáticos com substratos sintéticos de "fluorescência apagada" com o fluoróforo o-aminobenzoil*

4.1.4.1 Determinação da especificidade da enzima em função de um resíduo no substrato

Após o estabelecimento do protocolo como descrito em Materiais e Métodos com o substrato aleatorizado (Abz-GXXXXXQ-EDDnp), foram feitos ensaios para determinação da especificidade em P1 com os substratos sintéticos disponíveis, em diferentes pHs. Dentre

Figura 13 – Determinação da especificidade da protease em função de um resíduo no substrato



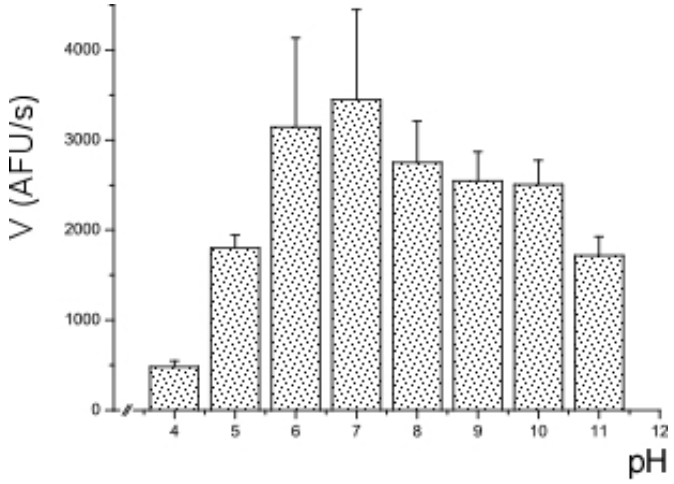
Ensaio enzimático com substrato de fluorescência apagada. Determinação do aminoácido favorável à clivagem em três pHs diferentes, como mostrado acima. A letra Z representa a posição a qual o resíduo conhecido ocupa no substrato. A atividade enzimática sobre o substrato com Met fixa em Z foi considerada 100%. As reações foram feitas utilizando a amostra após precipitação com sulfato de amônio 90% como descrito em Materiais e Métodos.

todos os pHs testados, o substrato que rendeu a maior atividade na reação foi o substrato que apresentava metionina em P1. Esse substrato foi eleito para os demais ensaios preliminares apresentados neste relatório. Além disso, a atividade enzimática é mais pronunciada nas amostras onde as proteínas foram precipitadas com sulfato de amônio do que nas amostras de sobrenadante (**Figura 13**).

4.1.4.2 Reações para determinação do pH ótimo da preparação de enzima

Foram testados pHs entre 4 e 11. A atividade proteolítica presente no precipitado de sulfato de amônio 90% apresenta uma faixa extensa de atividades relativamente elevadas entre pHs 6 e 10 (**Figura 14**). De posse deste resultado, o pH 8 foi eleito para as demais reações enzimáticas realizadas com esta amostra.

Figura 14 – Curva de pH da atividade proteásica presente no sobrenadante de cultura de MN7 após precipitação com sulfato de amônio 90%

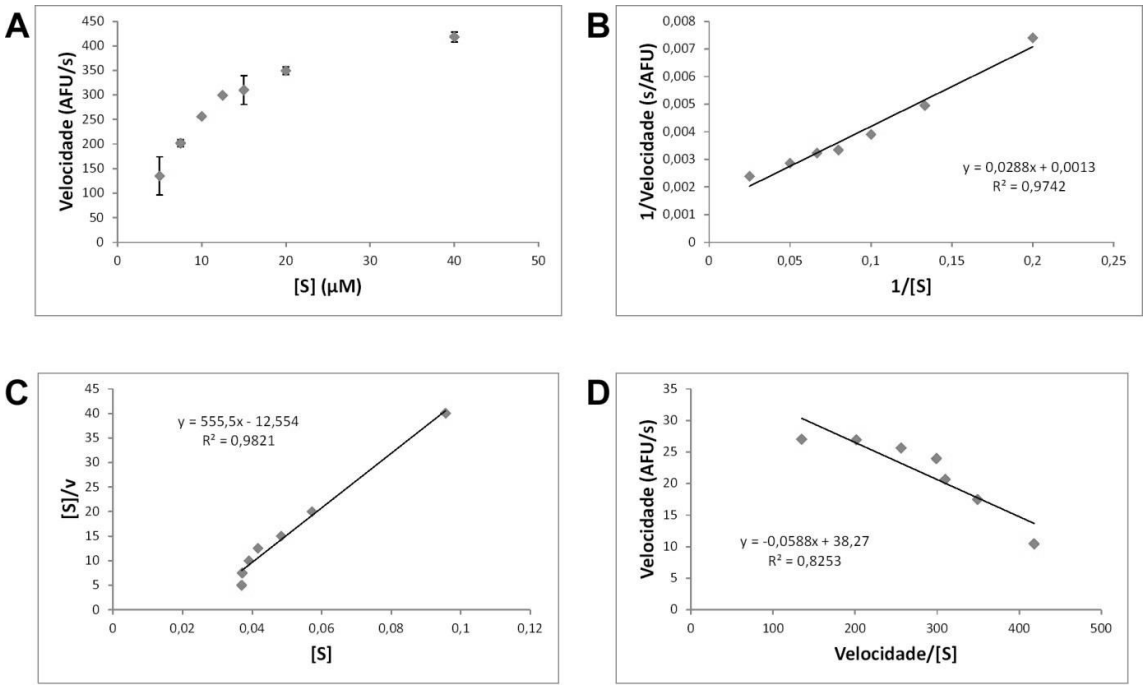


Ensaio enzimático com substrato de fluorescência apagada. Curva de pH da atividade enzimática presente na fração de sulfato de amônio 90% do meio de cultura. O ensaio foi realizado como descrito em Material e Métodos utilizando o substrato Abz-GXXMXXQ-EDDnp. As barras de erro correspondem aos valores de desvio padrão observados nas triplicatas de um ensaio.

4.1.4.3 Estabelecimento de parâmetros cinéticos da reação

Para a curva de enzima, foram feitas reações utilizando o substrato Abz-GXXMXXQ-EDDnp e diferentes concentrações de amostra precipitada com sulfato de amônio, como descrito em Materiais e Métodos. Para cálculo da velocidade da enzima em cada reação, foram considerados os primeiros pontos, até onde a linearidade da reação era mantida. As

Figura 15 – Determinação do K_M da enzima para o substrato Abz-GXXMXXQ-EDDnp



Ensaio enzimático com substrato de fluorescência apagada. Determinação do K_M da atividade enzimática presente na fração de sulfato de amônio 90% do meio de cultura. O ensaio foi realizado como descrito em Material e Métodos utilizando o substrato Abz-GXXMXXQ-EDDnp. As equações correspondem à equação da reta de regressão linear dos dados, e seu respectivo valor de R^2. (A) Curva de substrato; (B) Plot de Lineweaver-Burk; (C) Plot de Hanes-Woolf; (D) Plot de Eadie-Hofstee.

reações foram monitoradas por 90 minutos, mas a velocidade da reação decaía a partir dos 25 minutos para as maiores concentrações de enzima. Esse valor foi então adotado para os demais cálculos de velocidade da reação (dados não apresentados).

Para cálculos de K_M da enzima, foram realizadas reações com diferentes concentrações de substrato. A velocidade de cada uma das reações foi calculada da maneira já descrita anteriormente, e os valores obtidos foram plotados em função da concentração de substrato (**Figura 15**). O valor de K_M calculado a partir do plot dos inversos (Lineweaver-Burk) foi de 22,2 µM, e a V_{max}, 769,23 AFU/s.

No entanto, como discutido anteriormente, o K_M calculado pelo plot de Lineweaver-Burk não é o mais adequado, devido ao peso diferencialmente atribuído a cada um dos pontos na curva.

O K_M da enzima foi calculado também pelo plot de Hanes-Woolf, retornando um valor de K_M de -0,0226 µM e uma V_{max} de 0,0018 AFU/s; pelo plot de Eadie-Hofstee, retornando um valor de K_M de 0,0588 µM e uma V_{max} de 650,85 AFU/s.

4.1.5 *Ensaios enzimáticos com substratos sintéticos de "fluorescência apagada" com o fluoróforo 7-amino-4-metilcumarina*

Foram realizados ensaios com substratos sintéticos com sequências conhecidas, determinadas com base em dados da literatura para clivagem específica por PrtA ou por PrtS.

4.1.5.1 Eleição das sequências de substratos para as proteases preditas PrtA e PrtS

Na literatura, havia sido realizado um trabalho minucioso de análise do sítio de clivagem de PrtA de *P. luminescens laumondii* linhagem Brecon, elegendo como substrato sintético um peptídeo de sequência Dabcil-EVYAVES-Edans de fluorescência apagada (MAROKHAZI et al., 2007). O estudo de clivagem do peptídeo revelou a clivagem preferencial entre os resíduos Tyr e Ala, sendo as posições P3, P2 e P1 ocupadas por resíduos de Glu, Val e Tyr, respectivamente, e as posições P1', P2' e P3' ocupadas por resíduos de Ala, Val e Glu respectivamente. De acordo com os autores, os resíduos que apresentam maior papel no aumento da eficiência da hidrólise do substrato são P1', P2 e P2', nessa ordem.

Dada essa informação, para síntese de um substrato AMC eficiente era importante que o resíduo em P2 fosse Val. No entanto, para o funcionamento de substratos onde AMC é o fluoróforo, é necessário que a clivagem enzimática ocorra entre o resíduo C-terminal do peptídeo e o grupo AMC. Foi então selecionada a sequência Glu-Val-Tyr para síntese do substrato sintético para PrtA, Suc-EVY-AMC.

Já PrtS é uma protease menos estudada. Por este motivo, os dados sobre clivagem preferencial desta proteína são menos extensos. Como mencionado anteriormente, PrtS é relacionada à termolisina. Estudos sobre a especificidade do sítio catalítico e a importância dos resíduos no substrato foram estudados para a termolisina (DE KREIJ et al., 2001), porém ainda não há estudos deste tipo disponíveis para as demais TLP (thermolysin-like proteases).

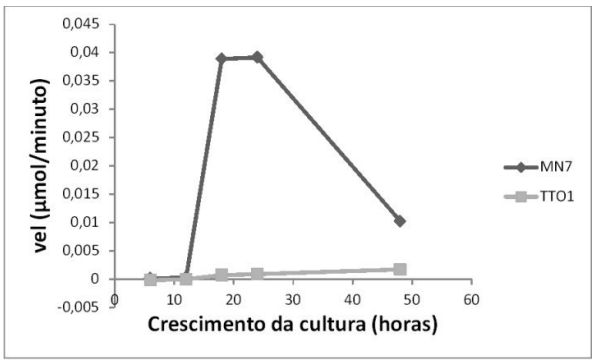
Para eleição da sequência de substrato para clivagem preferencial por PrtS, foram utilizados dados de clivagem por termolisina, disponíveis no banco MEROPS. De acordo com esses dados, o resíduo P1' seria o mais importante para a clivagem do substrato, no entanto essa posição deve ser ocupada pelo fluoróforo AMC para que o substrato reporte a ação enzimática. O segundo resíduo que mais contribui para o favorecimento da clivagem do substrato é o resíduo P1, e de acordo com dados na literatura, o resíduo Gly seria o mais favorável (DE KREIJ et al., 2001). Seguindo a sequência de resíduos mais favoráveis à catálise do substratos, chegamos à sequencia Ala-Val-Lys-Gly, e o substrato Suc-AVKG-AMC foi sintetizado.

4.1.5.2 Ensaios com substratos de sequência específica para clivagem por PrtA ou por PrtS

O substrato de sequência específica para a protease PrtS, Suc-AVKG-AMC não foi clivado pelas amostras testadas. Foram testados o sobrenadante de cultura de *P. luminescens* MN7 em diferentes tempos de 6 a 96 horas, o sobrenadante de cultura de *P. luminescens* MN7 após precipitação com sulfato de amônio 90%, as diferentes frações cromatográficas obtidas, e mesmo amostras de sobrenadante de cultura de *P. luminescens* TTO1 (dados não apresentados).

Já o substrato de sequência específica para PrtA, Suc-EVY-AMC indicou atividade proteolítica em diferentes amostras testadas. Essa atividade foi detectada em amostras do sobrenadante de cultura de *P. luminescens* MN7 e TTO1 em diferentes tempos, como apresentado na **Figura 16**.

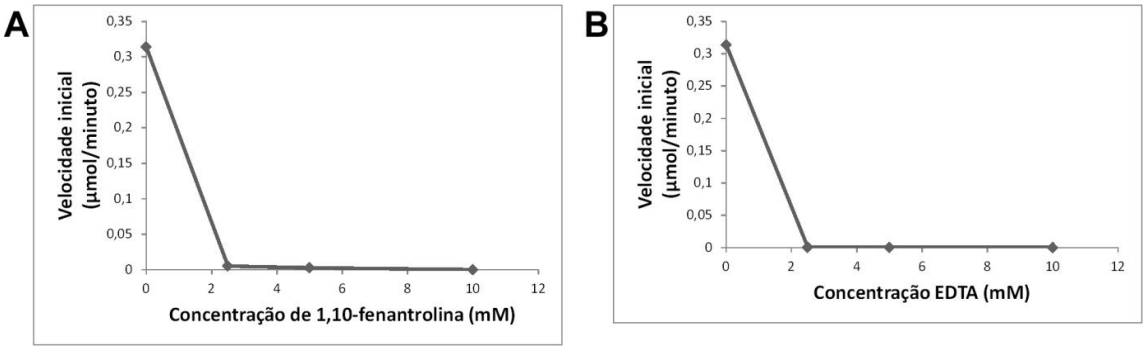
Figura 16 – Atividade enzimática sobre Suc-EVY-AMC do sobrenadante de culturas de *P. luminescens* TTO1 e MN7 ao longo do tempo



Ensaio enzimático com substrato de fluorescência apagada, 10 µM de substrato. Velocidade da reação enzimática de amostras do sobrenadante de cultura em diferentes tempos sobre o substrato específico para PrtA, Suc-EVY-AMC. Os pontos correspondentes às 6 e 12 horas para ambas as curvas tiveram suas velocidades calculadas à partir de uma curva de regressão linear com R^2<0,975.

Foi possível observar um aumento de quase 10 vezes na velocidade inicial de reações com o sobrenadante de cultura, e em reações com a amostra precipitada com sulfato de amônio 90%. A amostra de sobrenadante de cultura fresco apresentou uma velocidade inicial de 39,14 nmol/minuto. Já a amostra após a precipitação apresentou um valor de velocidade inicial da reação de 314 nmol/minuto.

Figura 17 – Inibição da atividade enzimática da amostra precipitada do sobrenadante de MN7 por inibidores específicos de metaloproteases



Ensaio enzimático com substrato de fluorescência apagada, 10 µM de Suc-EVY-AMC. Velocidade inicial da reação enzimática de amostra precipitada do sobrenadante de cultura de *P luminescens* MN7 inibido por diferentes concentrações de (A) 1,10-fenantrolina, ou (B) EDTA sobre o substrato específico para PrtA, Suc-EVY-AMC.

4.1.5.3 Ensaios de inibição

Não foi possível observar inibição da atividade proteásica sobre o substrato Suc-EVY-AMC quando a proteína foi incubada com os inibidores PMSF, E64 ou pepstatina. As velocidades iniciais da reação se mantiveram em torno dos 310 nM de produto/minuto.

No entanto, com os inibidores EDTA e 1,10-fenantrolina, foi possível observar uma inibição proeminente (**Figura 17**).

4.1.5.4 Estabelecimento de parâmetros cinéticos da reação

O K_M da amostra precipitada com 90% de sulfato de amônio para o substrato específico para PrtA, Suc-EVY-AMC foi calculado. Foram utilizados os plots de Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf e Eadie-Hofstee (**Figura 18**).

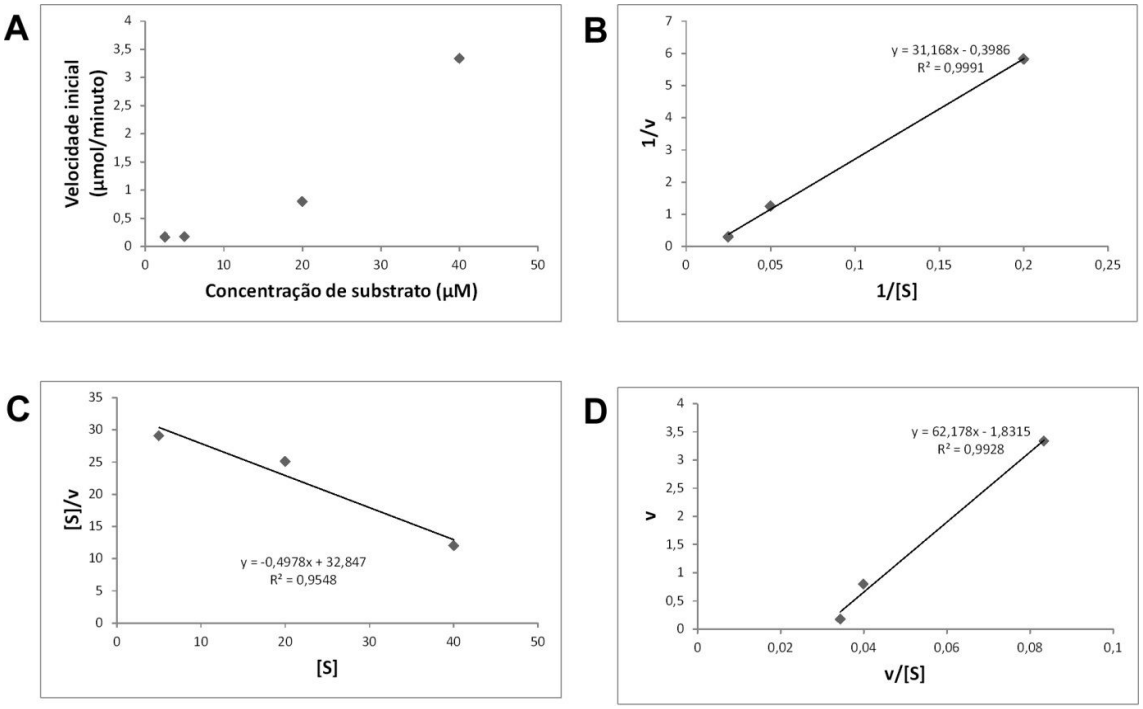
Pelo plot de Lineweaver-Burk, o K_M obtido foi de -78,17 µM, e a V_{max} obtida foi de 2,508 µM de produto/minuto.

Já pelos plots de Hanes-Woolf e Eadie-Hofstee, os K_Ms obtidos foram, respectivamente, de -32,847 µM e -62,178 µM. As V_{max}s obtidas, de 2 µM de produto/minuto, e -1,8315 µM de produto/minuto, respectivamente.

4.1.6 *Ensaios enzimáticos com o substrato natural caseína-FTC*

Foram realizados ensaios enzimáticos com o substrato natural caseína-FTC (Pierce) para confirmação da presença da atividade proteásica observada.

Figura 18 – Determinação do K_M da enzima para o substrato Suc-EVY-AMC



Ensaio enzimático com substrato de fluorescência apagada. Determinação do K_M da atividade enzimática presente na fração de sulfato de amônio 90% do meio de cultura. O ensaio foi realizado como descrito em Material e Métodos utilizando o substrato Suc-EVY-AMC. As equações correspondem à equação da reta de regressão linear dos dados, e seu respectivo valor de R^2. (A) Curva de substrato; (B) Plot de Lineweaver-Burk; (C) Plot de Hanes-Woolf; (D) Plot de Eadie-Hofstee.

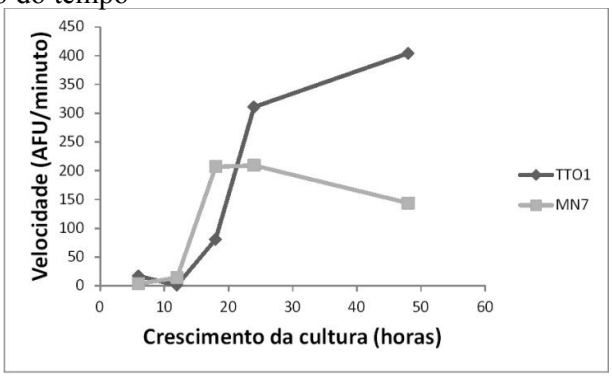
A atividade enzimática do sobrenadante de cultura de P. luminescens TTO1 e MN7 foi comparada, apontando que TTO1 apresenta valores de velocidade inicial da reação crescentes até as 48 horas de crescimento, enquanto MN7 apresenta um pico de velocidade inicial da reação entre as 18 e 24 horas de crescimento da cultura (**Figura 19**).As diferentes frações celulares (meio condicionado, fração periplasmática e fração de membrana e citoplasmática) foram submetidas a ensaios enzimáticos com o substrato caseína-FTC. A maior velocidade inicial da reação foi observada na fração do sobrenadante, que apresentou uma velocidade de 165,68 AFU/minuto, seguida pela fração periplasmática, com 62,01 AFU/minuto, e por último a fração citoplasmática e de membrana, com 41,811 AFU/minuto.

Ensaios de inibição da atividade da enzima sobre a caseína-FTC indicaram uma atividade remanescente, de aproximadamente 38%, após o tratamento com EDTA em diferentes concentrações (**Figura 20**).

4.1.7 *Fracionamento das atividades proteolíticas por cromatografia*

2,5 mL de amostra (precipitada com sulfato de amônio e dialisada) (150,5 µg de

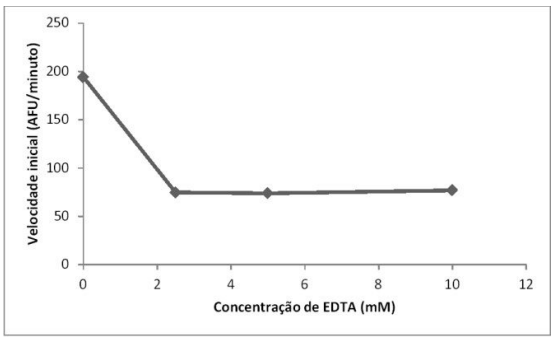
Figura 19 – Atividade enzimática sobre caseína-FTC do sobrenadante de culturas de *P. luminescens* TTO1 e MN7 ao longo do tempo



Ensaio enzimático com caseína-FTC. Velocidade da reação enzimática de amostras do sobrenadante de cultura em diferentes tempos sobre o substrato natural caseína-FTC. Os pontos correspondentes às 6 e 12 horas para ambas as curvas tiveram suas velocidades calculadas à partir de uma curva de regressão linear com R^2<0,975.

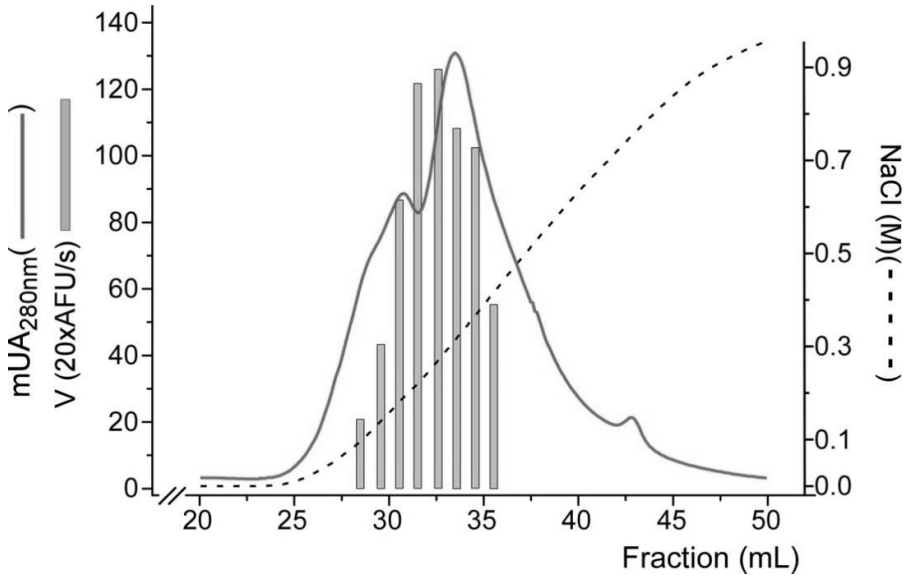
proteína) foram submetidos a cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap Q FF (GE Healthcare Lifesciences) como descrito em material e métodos. Os resultados estão mostrados na **Figura 21**. As frações 4 mL, 24 até 41 mL foram analisadas quanto à atividade peptidásica por zimografia e/ou reação enzimática com substrato sintético de fluorescência apagada. Foi possível identificar atividade em zimografia apenas nas frações 30 mL até 36 mL (**Figura 22**). Em ensaios enzimáticos com substrato sintético de fluorescência apagada, as frações 28 mL até 35 mL apresentaram atividade peptidásica (**Figura 21**). A cromatografia de troca iônica foi repetida com diferentes gradientes de força iônica na tentativa de resolver melhor os picos de enzima e separar as atividades enzimáticas. No entanto, o mesmo padrão zimográfico continuou sendo observado nas novas frações obtidas, sem aumento na atividade (dados não

Figura 20 – Inibição da atividade enzimática sobre caseína-FTC da amostra precipitada do sobrenadante de MN7 por EDTA



Ensaio enzimático com caseína-FTC, 10 µg/mL de substrato. Velocidade inicial da reação enzimática de amostra precipitada do sobrenadante de cultura de *P luminescens* MN7 inibido por diferentes concentrações de EDTA

Figura 21 – Cromatografia de troca iônica e atividade das frações da amostra de sobrenadante de MN7 precipitada com sulfato de amônio 90%



A cromatografia foi realizada como descrito em Material e Métodos em uma coluna aniônica HiTrap Q FF. No gráfico estão apresentados o perfil de absorbância das frações, o gradiente de cloreto de sódio e a atividade das frações sobre o substrato Abz-GXXMXXQ-EDDnp (estão mostradas todas as frações que apresentaram atividade mensurável).

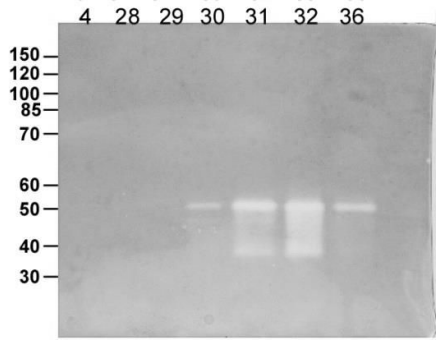
mostrados).

4.2 Sequências

4.2.1 *Alinhamento das sequências de aminoácidos e construção do cladograma para as PrtAs*

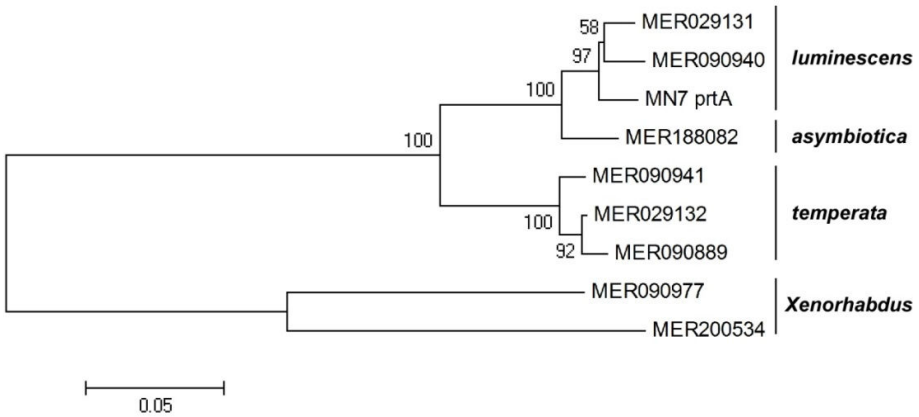
O sequenciamento do genoma de MN7 permitiu obter a sequência de aminoácidos

Figura 22 – Zimografia das atividades proteásicas presentes nas diferentes frações cromatográficas



Zimografia em gel de gelatina. Os números acima da fotografia indicam a posição de eluição (em mL) de cada uma das frações. À esquerda da figura estão mostradas as posições dos padrões de massa molecular em kDa.

Figura 23 – Árvore filogenética das proteases PrtA de *Photorhabdus* e *Xenorhabdus*



Árvore filogenética pelo método de Neighbor Joining (NJ) das proteases PrtA de *Photorhabdus* e *Xenorhabdus*. As sequências obtidas do banco MEROPS (**Tabela 2**) foram alinhadas como descrito em Material e Métodos e analisadas no programa MEGA4. Os valores d**Figura 23 –** Árvore filogenética das proteases PrtA de *Photorhabdus* e *Xenorhabdus*e bootstrap foram obtidos a partir de 1000 réplicas. A escala abaixo da árvore mostra a distância em número de mudanças de aminoácidos.

completa de sua PrtA. Essa sequência foi alinhada com a sequência de PrtA de TTO1 e da serralisina de Serratia marcescens. Os dados estão mostrados na **Figura 24**, onde também localizamos os resíduos catalíticos e aqueles envolvidos na ligação dos 6 átomos de cálcio das proteases do clã MA. O cladograma obtido através do programa MEGA com um alinhamento semelhante, mas com um número maior de sequências (**Figura 23**), mostra que a PrtA de

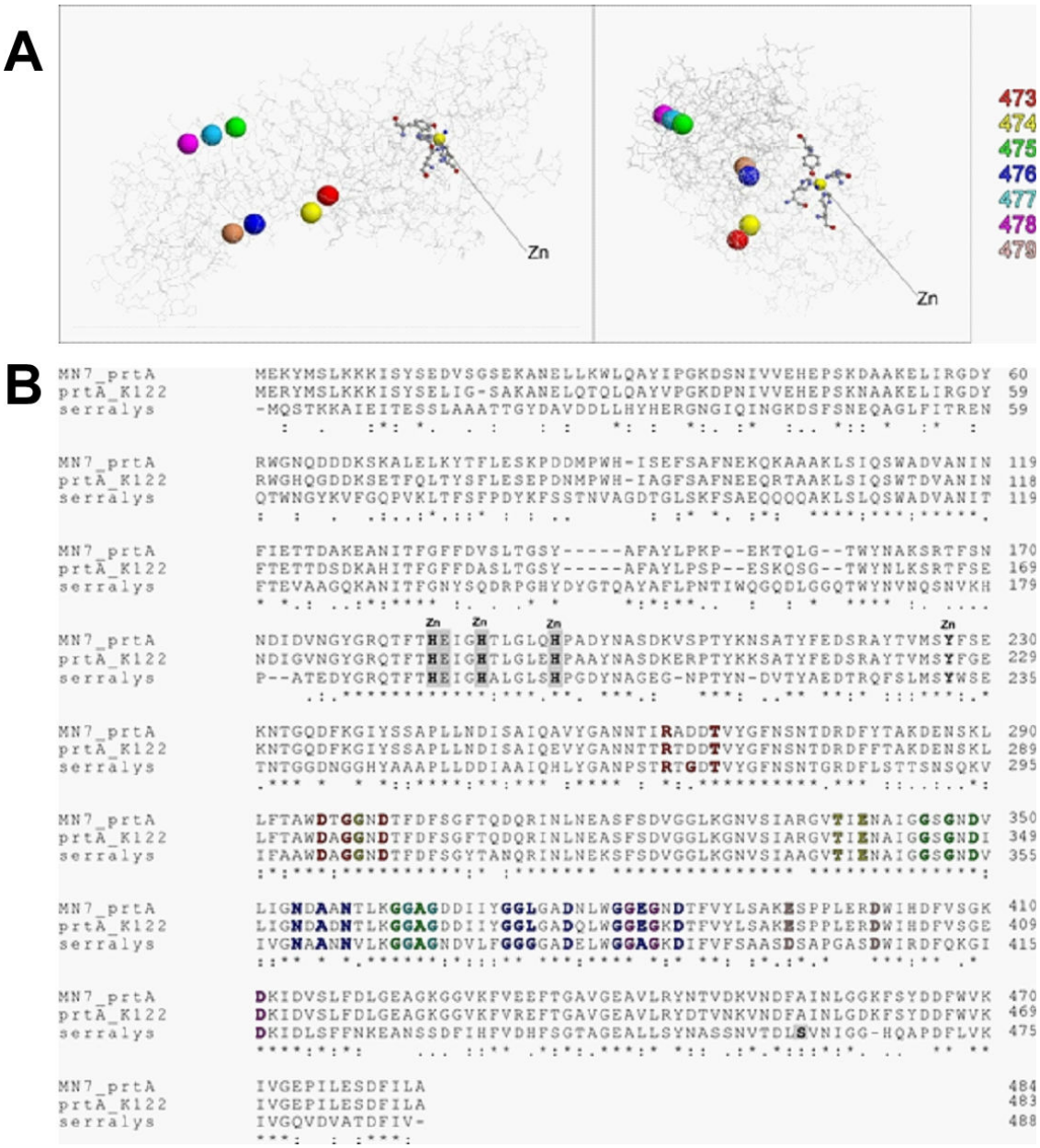
MN7 fica no mesmo clado que as PrtA de TTO1 e outro isolado de *P. luminescens*, mas em ramo diferente delas, concordando com dados obtidos anteriormente por (ALMENARA et al., 2012) com sequências de outros genes de MN7.

Tabela 2 – Sequências utilizadas na construção da árvore de PrtA

Posição MEROPS	GenBank ou UNIPROT	Espécie
MER029131	GenBank AA039138	*Photorabdus luminescens*
MER090940	GenBank NP_928000	*Photorhabdus luminescens* TTO1
MER188082	GenBank YP_003039442	*P. asymbiotica*
MER090941	UNIPROT Q49GQ9	*P. temperata*
MER029132	GENBANK AA039136	*P. luminescens*
MER090889	UNIPROT P282115	*Photorhabdus* sp. Az29
MER090977	UNIPROT Q5D1B7	*Xenorhabdus nematophila*
MER200534	GENBANK CBJ79640	*X. bovienii*

Sequências utilizadas para a construção da árvore de PrtA, obtidas do banco MEROPS.

Figura 24 – Metaloproteases do clã MA, família das serralisinas: estrutura e sequência



(A) posição dos átomos de Ca e do átomo de Zn na estrutura da serralisina de *Serratia marcescens* (PDB 1SAT) em vista lateral (esq.) e frontal (dir.); à direita estão indicadas as numeração dos átomos de Ca de acordo com as coordenadas do PDB. (B) Alinhamento das metaloproteases (prtA) de *Photorhabdus luminescens* K122 (MEROPS M10.063), *P. luminescens* MN7 e da serralisina (serralys) de *Serratia marcescens*. Os resíduos catalíticos estão sombreados. Os resíduos coloridos são aqueles que têm contato com os átomos de Ca; as cores dos resíduos correspondem aos átomos de Ca da figura (**A**).

5 DISCUSSÃO

5.1 Purificação e análise de proteínas

5.1.1 *Fracionamento celular*

As amostras obtidas pelo fracionamento celular apresentam padrões eletroforéticos distintos, indicando um fracionamento satisfatório dos diferentes compartimentos celulares.

As maiores atividades enzimáticas são observadas na fração de sobrenadante de cultura, indicando o destino celular da protease estudada, em concordância com a literatura (BOWEN et al., 2003). A maior atividade do sobrenadante pode ser considerada subestimada, já que esta fração é a mais diluída dentre as três, considerando o crescimento da bactéria em 100 mL de LB líquido.

5.1.2 *Precipitação das proteínas do sobrenadante de cultura de P. luminescens MN7*

Foi decidido realizar uma precipitação de proteínas com sulfato de amônio numa tentativa de livrar a amostra de antraquinonas presentes no sobrenadante de cultura, e ao mesmo tempo concentrar as atividades proteolíticas num volume menor. As antraquinonas foram caracterizadas em culturas de *P. luminescens* anteriormente e parecem estar relacionados à via de produção de certos antibióticos (LI et al., 1995). Foi demonstrado que uma antraquinona, um estilbeno, e a emissão de bioluminescência em *P. luminescens* está relacionada à expressão de um gene *mdh*, que codifica a enzima malato desidrogenase, importante no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (LANGO; CLARKE, 2010).

Além disso, a bactéria produz um biofilme rico em polissacarídeos, mesmo quando crescida em cultura líquida (AMOS et al., 2011). A presença do biofilme deve estar relacionada com a colonização do tubo digestivo do inseto, após a infecção (SILVA et al., 2002). No entanto, evidências apontam que o biofilme pode não ser essencial para o estabelecimento da simbiose da bactéria com o nematoide. Um estudo com uma linhagem mutante para uma enzima importante na biossíntese das moléculas do biofilme mostrou que estes mutantes apresentaram deficiências importantes na formação do biofilme em placa, na motilidade, na patogenicidade no inseto, mas não apresentaram redução na capacidade de simbiose com o nematoide (AMOS et al., 2011).

A realização desta precipitação de proteínas com sulfato de amônio reduziu a viscosidade da amostra, mas não a livrou totalmente do pigmento amarelo, provavelmente a

antraquinona. No entanto, mesmo com a presença deste pigmento foi possível quantificar as quantidades proteicas e as atividades peptidásicas sem interferências causadas pela cor da preparação.

Além disso, as atividades peptidásicas presentes na zimografia foram mantidas mesmo após a precipitação das proteínas com sulfato de amônio, indicando que o método de precipitação de proteínas empregado foi eficiente, possibilitando a precipitação das atividades proteásicas estudadas. Com a precipitação das enzimas, a atividade enzimática detectada em ensaios com substratos de fluorescência apagada apresentou um aumento de 10 vezes em relação às amostras de sobrenadante de cultura. Isso se deve à concentração das proteínas em um menor volume, e não necessariamente reflete um aumento de atividade causado por remoção de inibidores, ou de interações regulatórias com outras proteínas.

5.1.3 *Atividades enzimáticas observadas em zimograma nas linhagens P. luminescens TTO1 e MN7*

As atividades enzimáticas do sobrenadante de cultura das linhagens de *P. luminescens* TTO1 e MN7 apresentam diversas diferenças ao longo do tempo. A expressão de proteases em MN7 inicia-se mais tardiamente em relação a TTO1, e apresenta um padrão diferente dela. Em MN7, é possível observar duas atividades, provavelmente correspondentes à PrtA e PrtS descritas na literatura (CABRAL et al., 2004). No entanto, TTO1 apresenta uma banda de massa correspondente apenas à maior massa, a de PrtA. PrtS parece estar ausente em TTO1. A sequência disponível no GenBank correspondente a PrtS apenas está disponível da linhagem de *P. temperata* Az29, e de linhagens de *Xenorhabdus*, o gênero relacionado a *Photorhabdus*. Nenhuma sequência correspondente à PrtS foi descrita no genoma de TTO1 (DUCHAUD et al., 2003), apesar de análises por BLAST mostrarem a presença de uma ORF semelhante à PrtS de outras linhagens, embora a ORF não esteja anotada como PrtS (dados não apresentados).

5.1.4 *Ensaios enzimáticos*

O primeiro ensaio enzimático foi realizado utilizando azocaseína como substrato. Nenhuma atividade foi observada, mesmo após modificações no protocolo inicial. Esse dado difere da literatura, pois em outro trabalho (CABRAL et al., 2004), os autores foram capazes de realizar ensaios enzimáticos com este substrato. Já que a amostra apresentava atividade proteolítica sobre a gelatina, a amostra foi testada contra este substrato de acordo com o

protocolo estabelecido anteriormente (LEMOS; TERRA, 1991). No entanto, mesmo as amostras controle, sem atividade proteolítica, já apresentavam uma quantidade muito grande de peptídeos no sobrenadante após precipitação com TCA. Isso provavelmente foi devido à degradação da gelatina utilizada.

Apesar de o sobrenadante de cultura de MN7 apresentar uma atividade proteolítica sobre a gelatina observada em zimografias, essa atividade é observada após 18 horas de incubação da enzima com o substrato em condições favoráveis à reação. É possível que métodos colorimétricos que utilizam a detecção dos produtos de hidrólise da azocaseína e da gelatina corada pelo método de Lowry (como descrito em Materiais e Métodos), não tenham sensibilidade suficiente para a detecção da atividade das proteases observadas em ensaios com 2 horas de duração.

Com a disponibilidade de substratos sintéticos de fluorescência apagada, os testes foram então conduzidos utilizando estes substratos.

De acordo com o banco MEROPS, a clivagem preferencial ocorre com a tirosina na posição P1. Devido à disponibilidade dos substratos sintéticos, não foi possível realizar ensaios com o substrato que apresenta tirosina fixo (Abz-GXXYXXQ-EDDnp). No entanto, dentre os substratos testados, o substrato com metionina fixa foi o que evidenciou maior atividade da enzima.

A clivagem mais rápida do substrato Abz-GXXMXXQ-EDDnp é condizente com dados da literatura referentes à serralisinas, subfamília a qual pertence PrtA. Sabe-se que a presença de resíduos de cadeia lateral hidrofóbica média em substratos para serralisinas favorecem a clivagem da ligação peptídica, mesmo que estes resíduos estejam localizados nas posições P2 ou P2' (BAUMANN, 2012).

De acordo com a literatura, PrtA tem a sua clivagem determinada principalmente pelos resíduos presentes nas posições P1' e P2 do substrato (MAROKHAZI et al., 2007). A similaridade das características químicas entre a valina (determinada como resíduo ótimo para a posição P2) e a metionina (observada em nossos ensaios como resíduo que favorece a clivagem do substrato) podem justificar os resultados observados neste trabalho com MN7.

Para comparações com dados da literatura, iremos utilizar o K_M gerado pelo plot de Lineweaver-Burk, já que este foi o plot utilizados para cálculos de K_M de outros trabalhos. O K_M obtido por este plot é condizente com o observado na literatura. O K_M para a PrtA recombinante obtido em Marokházi et al. foi de 11x10-5 M para o substrato Dabcil-EVYAVES-Edans, e para outras isoformas de PrtA com o mesmo substrato, todos os K_M observados também foram da ordem de 10-5 M. O K_M observado para o substrato Abz-

GXXMXXQ-EDDnp é um pouco maior do que o anteriormente observado, já que o substrato com o qual estes ensaios foram realizados não deve ser o mais adequado.

Os valores obtidos para o K_M para o substrato Suc-EVY-AMC são negativos, indicando possíveis problemas experimentais, como erros de pipetagem ou poucos pontos experimentais na curva de substrato. Já que valores negativos também foram obtidos nas réplicas do experimento, isso pode ser explicado pela enzima apresentar um valor baixo de K_M para este substrato, ou pela baixa amostragem de concentrações de substrato.

5.1.5 *Inibição das atividades enzimáticas*

A inibição das atividades enzimáticas realizada apenas por 1,10-fenantrolina e por EDTA, mas não por PMSF, pepstatina ou E64 confirma a natureza de metaloprotease das enzimas observadas. Essa inibição observada ocorre também em PrtA como descrito na literatura (CABRAL et al., 2004).

PrtS, no entanto, não é inibida por EDTA (CABRAL et al., 2004). Uma atividade remanescente de aproximadamente 38% sobre a caseína-FTC pode ser observada nas amostras de enzimas incubadas com EDTA, provavelmente refletindo a atividade de PrtS, mas não de PrtA, já que a última é totalmente inibida por EDTA como observado nos experimentos com o substrato sintético de clivagem preferencial por PrtA.

A inibição total da atividade enzimática observada sobre o substrato Suc-EVY-AMC apoia a hipótese de que o substrato Suc-Evy-AMC é um substrato específico para PrtA.

5.1.6 *Separação das atividades enzimáticas observadas*

As cromatografias de troca iônica realizadas não foram capazes de separar as duas atividades enzimáticas distintas observadas em zimografia. Apesar das alterações no protocolo de eluição da coluna, que foram capazes de resolver os picos que eluíam próximos, os picos com atividade enzimática detectável ainda apresentavam o mesmo padrão de duas bandas na zimografia.

A impossibilidade de detectar atividades enzimáticas em substratos sintéticos de fluorescência apagada com sequências específicas para PrtA e PrtS pode indicar que a atividade de menor massa molecular observada na zimografia pode ser gerada por degradação. Porém, já que alguma atividade remanescente é observada sobre caseína-FCT mesmo após a incubação com EDTA, que inibe PrtA, é provável que PrtS esteja de fato

presente na amostra, e apenas o substrato Suc-AVKG-AMC é que não seja clivado por essa protease.

5.2 Sequências

5.2.1 *PrtA*

O alinhamento mostrado na **Figura 23** evidencia as similaridades entre a PrtA de *P. luminescens* TTO1 e MN7 e a serralisina, especialmente em relação aos resíduos envolvidos na interação com o átomo de Zn do sítio catalítico. No entanto, o resíduo catalítico de Ser na posição 461 presente na serralisina não é conservado nas PrtAs.

Um alinhamento com um número maior de sequências permitiu construir uma árvore pelo método de NJ para as PrtAs de bactérias do gênero *Photorhabdus* e *Xenorhabdus*. Esta análise coloca a PrtA de MN7 no mesmo clado que aquelas de outros membros do grupo *luminescens* com um valor alto de bootstrap (97%), mas não no mesmo ramo. Esses dados corroboram aqueles obtidos por Almenara et al. (2012) com as sequências dos genes de outras proteínas de MN7 que colocam o nosso isolado num grupo separado daquele formado por TTO1 e outros isolados semelhantes.

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como alvo o estudo de atividades enzimáticas amidásicas presentes no sobrenadante de cultura de *Photorhabdus luminescens* MN7.

Foram detectadas duas atividades no sobrenadante de cultura, de massas moleculares de 38 e 50 kDa, e estas massas são condizentes com as proteases PrtA e PrtS. Dados genômicos corroboram a hipótese de que as proteases observadas sejam homólogas às PrtA e PrtS já descritas. Ambas atividades apresentam padrões de inibição condizentes com metaloproteases.

Foi possível sintetizar um substrato específico para a atividade de PrtA, de sequência conhecida.

Photorhabdus luminescens TTO1 não apresenta uma atividade proteolítica correspondente à atividade de massa 38 kDa observada em MN7. MN7 apresenta menos bandas com atividade proteolítica em zimografia. O sobrenadante de cultura de MN7 apresenta atividade proteolítica mais proeminente entre 18 e 24 horas de crescimento da cultura, enquanto em TTO1, os valores de atividade proteolítica são crescentes até depois das 48 horas de crescimento da cultura.

REFERÊNCIAS[3]

AHANTARIG, A. et al. PirAB toxin from *Photorhabdus asymbiotica* as a larvicide against dengue vectors. **Appl. Environ. Microbiol.,** v. 75, n. 13, p. 4627-4629, Jul 2009.

ALMENARA, D. P. et al. **Characterization of a bacterial symbiont from the Amazonian entomopathogenicnematode *Heterorhabditis baujardi***. Evolution of *Caenorhabditis* & Other Nematodes. Cold Spring Harbor Laboratories 2012.

AMOS, M. R. et al. Influence of the *Photorhabdus luminescens* phosphomannose isomerase gene, manA, on mannose *util*ization, exopolysaccharide structure, and biofilm formation. **Appl. Environ. Microbiol.,** v. 77, n. 3, p. 776-785, Feb 2011.

ANGKAWIDJAJA, C.; KANAYA, S. Family I.3 lipase: bacterial lipases secreted by the type I secretion system. **Cell. Mol. Life Sci.,** v. 63, n. 23, p. 2804-2817, Dec 2006.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F. **Handbook of Proteolytic Enzymes**. Elsevier Science, 2012.

BAUMANN, U. Serralysin and related enzymes. In: BARRETT, A. J.;RAWLINGS, N. D*., et al* (Ed.). **Handbook of Proteolytic Enzymes**. 3: Elsevier Science, v.1, 2012. cap. 180, p.4.

BLAXTER, M.; BIRD, D. **30 Parasitic Nematodes**. 1997. Disponível em: < http://cshmonographs.org/index.php/monographs/article/view/5065 >.

BLAXTER, M. L. et al. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. **Nature,** v. 392, n. 6671, p. 71-75, Mar 5 1998.

BODE, H. B. Entomopathogenic bacteria as a source of secondary metabolites. **Curr Opin Chem. Biol.,** v. 13, n. 2, p. 224-230, Apr 2009.

BOEMARE, N. E.; AKHURST, R. J.; MOURANT, R. G. DNA Relatedness between *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae), Symbiotic Bacteria of Entomopathogenic Nematodes, and a Proposal To Transfer *Xenorhabdus luminescens* to a New Genus, *Photorhabdus* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology,** v. 43, n. 2, p. 249-255, April 1, 1993.

BOWEN, D. J. et al. Genetic and biochemical characterization of PrtA, an RTX-like metalloprotease from *Photorhabdus*. **Microbiology,** v. 149, n. Pt 6, p. 1581-1591, Jun 2003.

BRACHMANN, A. O. et al. Pyrones as bacterial signaling molecules. **Nat. Chem. Biol.**, p. 573-578, Jul 14 2013.

_____. A type II polyketide synthase is responsible for anthraquinone biosynthesis in Photorhabdus luminescens. **Chembiochem,** v. 8, n. 14, p. 1721-1728, Sep 24 2007.

CABRAL, C. M. et al. Purification and characterization of two distinct metalloproteases

[3] De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

secreted by the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus* sp. strain Az29. **Appl. Environ. Microbiol.,** v. 70, n. 7, p. 3831-3838, Jul 2004.

CARBONETTI, N. H. Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin: key virulence factors of Bordetella pertussis and cell biology tools. **Future Microbiol.,** v. 5, n. 3, p. 455-469, Mar 2010.

CICHE, T. A. et al. Photobactin: a catechol siderophore produced by *Photorhabdus luminescens*, an entomopathogen mutually associated with *Heterorhabditis bacteriophora* NC1 nematodes. **Appl. Environ. Microbiol.,** v. 69, n. 8, p. 4706-4713, Aug 2003.

_____. Dangerous liaisons: The symbiosis of entomopathogenic nematodes and bacteria. **Biological Control,** v. 38, n. 1, p. 22-46, 2006.

CICHE, T. A.; ENSIGN, J. C. For the insect pathogen Photorhabdus luminescens, which end of a nematode is out? **Appl. Environ. Microbiol.,** v. 69, n. 4, p. 1890-1897, Apr 2003.

CICHE, T. A. et al. Cell Invasion and Matricide during *Photorhabdus luminescens* Transmission by *Heterorhabditis bacteriophora* Nematodes. **Appl. Environ. Microbiol.,** v. 74, n. 8, p. 2275-2287, Apr 2008.

CLARKE, D. J. The genetic basis of the symbiosis between photorhabdus and its invertebrate hosts. **Adv. Appl. Microbiol.,** v. 88, p. 1-29, 2014.

COSTA, S. C. et al. Recent insight into the pathogenicity mechanisms of the emergent pathogen Photorhabdus asymbiotica. **Microbes Infect.,** v. 12, n. 3, p. 182-189, Mar 2010.

_____. The emerging human pathogen Photorhabdus asymbiotica is a facultative intracellular bacterium and induces apoptosis of macrophage-like cells. **Infect. Immun.,** v. 77, n. 3, p. 1022-1030, Mar 2009.

DABORN, P. J. et al. A single *Photorhabdus* gene, makes caterpillars floppy (*mcf*), allows Escherichia coli to persist within and kill insects. **PNAS,** v. 99, n. 16, p. 10742-10747, Aug 6 2002.

DAVIES, A. H. et al. Super toxins from a super bug: structure and function of Clostridium difficile toxins. **Biochem. J.,** v. 436, n. 3, p. 517-526, Jun 15 2011.

DE KREIJ, A. et al. The effect of changing the hydrophobic S1' subsite of thermolysin-like proteases on substrate specificity. **Eur. J. Biochem.,** v. 268, n. 18, p. 4985-4991, Sep 2001.

DE OLIVEIRA VASCONCELOS, V. et al. *Steinernema glaseri* Santa Rosa strain (Rhabditida: Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora* CCA Strain (Rhabditida: Heterorhabditidae) as biological control agents of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitol. Res.,** v. 94, n. 3, p. 201-206, Oct 2004.

DOLINSKI, C. et al. Molecular and morphological characterization of heterorhabditid entomopathogenic nematodes from the tropical rainforest in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz,** v. 103, n. 2, p. 150-159, Mar 2008.

DOWLING, A. J. et al. The insecticidal toxin Makes caterpillars floppy (Mcf) promotes apoptosis in mammalian cells. **Cell Microbiol.,** v. 6, n. 4, p. 345-353, Apr 2004.

_____. The Mcf1 toxin induces apoptosis via the mitochondrial pathway and apoptosis is attenuated by mutation of the BH3-like domain. **Cell Microbiol.,** v. 9, n. 10, p. 2470-2484, Oct 2007.

DUCHAUD, E. et al. The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. **Nat. Biotechnol.,** v. 21, n. 11, p. 1307-1313, Nov 2003.

ELEFTHERIANOS, I. et al. An antibiotic produced by an insect-pathogenic bacterium suppresses host defenses through phenoloxidase inhibition. **PNAS,** v. 104, n. 7, p. 2419-2424, Feb 13 2007.

_____. Dissecting the immune response to the entomopathogen *Photorhabdus*. **Trends Microbiol.,** v. 18, n. 12, p. 552-560, Dec 2010.

FELFOLDI, G. et al. Identification of natural target proteins indicates functions of a serralysin-type metalloprotease, PrtA, in anti-immune mechanisms. **Appl. Environ. Microbiol.,** v. 75, n. 10, p. 3120-3126, May 2009.

FELFÖLDI, G. **The role of a serralysin PrtA system in the infection mechanism of an enromopathogen, *Photorhabdus***. 2010. 84 p. (PhD). Department of Biochemistry, Eötvös Loránd University

FISCHER-LE SAUX, M. et al. Polyphasic classification of the genus *Photorhabdus* and proposal of new taxa: *P. luminescens* subsp. *luminescens* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *akhurstii* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *laumondii* subsp. nov., *P. temperata* sp. nov., *P. temperata* subsp. *temperata* subsp. nov. and *P. asymbiotica* sp. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.,** v. 49 Pt 4, p. 1645-1656, Oct 1999.

FORST, S. et al. Xenorhabdus and Photorhabdus spp.: bugs that kill bugs. **Annu. Rev. Microbiol.,** v. 51, p. 47-72, 1997.

GATSOGIANNIS, C. et al. A syringe-like injection mechanism in *Photorhabdus luminescens* toxins. **Nature,** v. 495, n. 7442, p. 520-523, Mar 28 2013.

GERRARD, J. et al. Human infection with *Photorhabdus asymbiotica*: an emerging bacterial pathogen. **Microbes and Infection,** v. 6, n. 2, p. 229-237, 2004.

GERRARD, J. G. et al. Nematode symbiont for Photorhabdus asymbiotica. **Emerg. Infect. Dis.,** v. 12, n. 10, p. 1562-1564, Oct 2006.

GERRARD, J. G.; WATERFIELD, N. R.; SANCHEZ-CONTREERAS, M. Photorhabdus asymbiotica: Shedding Light on a Human Pathogenic Bioluminescent Bacterium. **Clinical Microbiology Newsletter,** v. 33, n. 14, p. 103-109, 2011.

GUPTA, S. K. et al. Bacterial proteases and adherence of Pseudomonas aeruginosa to mouse cornea. **Exp. Eye Res.,** v. 62, n. 6, p. 641-650, Jun 1996.

HALLEM, E. A. et al. Nematodes, bacteria, and flies: a tripartite model for nematode parasitism. **Curr. Biol.,** v. 17, n. 10, p. 898-904, May 15 2007.

HANES, C. S. Studies on plant amylases: The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley. **Biochem. J.,** v. 26, n. 5, p. 1406-1421, 1932.

HEERMANN, R.; FUCHS, T. M. Comparative analysis of the *Photorhabdus luminescens* and the *Yersinia enterocolitica* genomes: uncovering candidate genes involved in insect pathogenicity. **BMC Genomics,** v. 9, p. 40, 2008.

HELD, K. G. et al. A metalloprotease secreted by the insect pathogen *Photorhabdus luminescens* induces melanization. **Appl. Environ. Microbiol.,** v. 73, n. 23, p. 7622-7628, Dec 2007.

HIRATA, I. et al. Internally quenched fluorogenic protease substrates: Solid-phase synthesis and fluorescence spectroscopy of peptides containing ortho-aminobenzoyl/dinitrophenyl groups as donor-acceptor pairs. **Letters in Peptide Science,** v. 1, n. 6, p. 299-308, 1995.

HOFSTEE, B. H. Non-inverted versus inverted plots in enzyme kinetics. **Nature,** v. 184, p. 1296-1298, Oct 24 1959.

HU, K. et al. A novel antimicrobial epoxide isolated from larval Galleria mellonella infected by the nematode symbiont, Photorhabdus luminescens (Enterobacteriaceae). **Bioorg. Med. Chem.,** v. 14, n. 13, p. 4677-4681, Jul 1 2006.

HU, K.; LI, J.; WEBSTER, J. M. Quantitative analysis of a bacteria-derived antibiotic in nematode-infected insects using HPLC-UV and TLC-UV methods. **J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.,** v. 703, n. 1-2, p. 177-183, Dec 5 1997.

HU, K.; WEBSTER, J. M. Antibiotic production in relation to bacterial growth and nematode development in *Photorhabdus--Heterorhabditis* infected *Galleria mellonella* larvae. **FEMS Microbiol. Lett.,** v. 189, n. 2, p. 219-223, Aug 15 2000.

JOYCE, S. A. et al. Bacterial biosynthesis of a multipotent stilbene. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.,** v. 47, n. 10, p. 1942-1945, 2008.

KAMITANI, F. **Caracterização molecular de isolados de nematoides entomopatogênicos, *Heterorhabditis* spp. e seus simbiontes, *Photorhabdus* spp., provenientes de Monte Negro, RO**. 2010. 97 p. (PhD). Parasitologia/ICB, Universidade de São Paulo, São Paulo.

KOSHLAND, D.; BOTSTEIN, D. Secretion of beta-lactamase requires the carboxy end of the protein. **Cell,** v. 20, n. 3, p. 749-760, Jul 1980.

LANG, A. E. et al. Photorhabdus luminescens toxins ADP-ribosylate actin and RhoA to force actin clustering. **Science,** v. 327, n. 5969, p. 1139-1142, Feb 26 2010.

LANGO, L.; CLARKE, D. J. A metabolic switch is involved in lifestyle decisions in *Photorhabdus luminescens*. **Mol. Microbiol.,** v. 77, n. 6, p. 1394-1405, Sep 2010.

LARKIN, M. A. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics,** v. 23, n. 21, p. 2947-2948, Nov 1 2007.

LEMOS, F. J. A.; TERRA, W. R. Properties and intracellular distribution of a cathepsin D-like proteinase active at the acid region of *Musca domestica* midgut. **Insect Biochemistry,** v. 21, n. 5, p. 457-465, 1991.

LI, J. et al. Identification of two pigments and a hydroxystilbene antibiotic from *Photorhabdus luminescens*. **Appl. Environ. Microbiol.,** v. 61, n. 12, p. 4329-4333, Dec 1995.

LI, L.; STOECKERT, C. J., JR.; ROOS, D. S. OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. **Genome Res.,** v. 13, n. 9, p. 2178-2189, Sep 2003.

LI, Y. et al. Photorhabdus luminescens PirAB-fusion protein exhibits both cytotoxicity and insecticidal activity. **FEMS Microbiol. Lett.**, May 19 2014.

LINEWEAVER, H.; BURK, D. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. **Journal of the American Chemical Society,** v. 56, n. 3, p. 658-666, 1934.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.,** v. 193, n. 1, p. 265-275, Nov 1951.

MAROKHAZI, J. et al. Cleavage site analysis of a serralysin-like protease, PrtA, from an insect pathogen *Photorhabdus luminescens* and development of a highly sensitive and specific substrate. **FEBS,** v. 274, n. 8, p. 1946-1956, Apr 2007.

MONTEIRO, C. M. et al. Heterorhabditis bacteriophora (Rhabditida: Heterorhabditidae) HP88 for biological control of Rhipicephalus microplus (Acari: Ixodidae): the effect of different exposure times of engorged females to the nematodes. **Vet. Parasitol.,** v. 185, n. 2-4, p. 364-367, Apr 30 2012.

PARK, G. S. et al. Draft Genome Sequence of Entomopathogenic Bacterium *Photorhabdus temperata* Strain M1021, Isolated from Nematodes. **Genome Announc.,** v. 1, n. 5, 2013.

PEEL, M. M. et al. Isolation, identification, and molecular characterization of strains of Photorhabdus luminescens from infected humans in Australia. **J. Clin. Microbiol.,** v. 37, n. 11, p. 3647-3653, Nov 1999.

PLICHTA, K. L. et al. Heterorhabditis gerrardi n. sp. (Nematoda: Heterorhabditidae): the hidden host of Photorhabdus asymbiotica (Enterobacteriaceae: gamma-Proteobacteria). **J. Helminthol.,** v. 83, n. 4, p. 309-320, Dec 2009.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of peptidases. **Biochem. J.,** v. 290 (Pt 1), p. 205-218, Feb 15 1993.

RAWLINGS, N. D. et al. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Res.,** v. 42, n. Database issue, p. D503-509, Jan 2014.

RODOU, A.; ANKRAH, D. O.; STATHOPOULOS, C. Toxins and secretion systems of

Photorhabdus luminescens. **Toxins (Basel),** v. 2, n. 6, p. 1250-1264, Jun 2010.

SICARD, M. et al. Pathogenic effect of entomopathogenic nematode-bacterium complexes on terrestrial isopods. **J. Invertebr. Pathol.,** v. 99, n. 1, p. 20-27, Sep 2008.

SILVA, C. P. et al. Bacterial infection of a model insect: *Photorhabdus luminescens* and *Manduca sexta*. **Cell Microbiol.,** v. 4, n. 6, p. 329-339, Jun 2002.

SOMVANSHI, V. S. et al. A single promoter inversion switches *Photorhabdus* between pathogenic and mutualistic states. **Science,** v. 337, n. 6090, p. 88-93, Jul 6 2012.

TAMURA, K. et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol. Biol. Evol.,** v. 24, n. 8, p. 1596-1599, Aug 2007.

TANFORD, C. **Physical chemistry of macromolecules**. Wiley, 1961. 710 p.

THEODORE, C. M. et al. Production of cytotoxic glidobactins/luminmycins by Photorhabdus asymbiotica in liquid media and live crickets. **J. Nat. Prod.,** v. 75, n. 11, p. 2007-2011, 2012.

THOMAS, G. M.; POINAR, G. O. *Xenorhabdus* gen. nov., a Genus of Entomopathogenic, Nematophilic Bacteria of the Family Enterobacteriaceae. **International Journal of Systematic Bacteriology,** v. 29, n. 4, p. 352-360, 1979.

VAN DEN BURG, B.; EIJSINK, V. Thermolysin and Related *Bacillus* Metallopeptidases. In: RAWLINGS, N. D. e SALVESEN, G. (Ed.). **Handbook of Proteolytic Enzymes**. 3: Academic Press, 2013. cap. 111, p.540-553.

VOLLMER, P. et al. Novel pathogenic mechanism of microbial metalloproteinases: liberation of membrane-anchored molecules in biologically active form exemplified by studies with the human interleukin-6 receptor. **Infect. Immun.,** v. 64, n. 9, p. 3646-3651, Sep 1996.

WALKER, K. E. et al. ZapA, the IgA-degrading metalloprotease of *Proteus mirabilis*, is a virulence factor expressed specifically in swarmer cells. **Mol. Microbiol.,** v. 32, n. 4, p. 825-836, May 1999.

WATERFIELD, N. et al. The *Photorhabdus* Pir toxins are similar to a developmentally regulated insect protein but show no juvenile hormone esterase activity. **FEMS Microbiol. Lett.,** v. 245, n. 1, p. 47-52, Apr 1 2005.

WATERFIELD, N. R.; CICHE, T.; CLARKE, D. *Photorhabdus* and a host of hosts. **Annu. Rev. Microbiol.,** v. 63, p. 557-574, 2009.

WHITE, G. F. A METHOD FOR OBTAINING INFECTIVE NEMATODE LARVAE FROM CULTURES. **Science,** v. 66, n. 1709, p. 302-303, 1927.

WILKINSON, P. et al. New plasmids and putative virulence factors from the draft genome of an Australian clinical isolate of *Photorhabdus asymbiotica*. **FEMS Microbiol. Lett.,** v. 309, n. 2, p. 136-143, 2010.

_____. Comparative genomics of the emerging human pathogen *Photorhabdus asymbiotica* with the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*. **BMC Genomics,** v. 10, p. 302, 2009.

WILLIAMS, J. S.; THOMAS, M.; CLARKE, D. J. The gene stlA encodes a phenylalanine ammonia-lyase that is involved in the production of a stilbene antibiotic in *Photorhabdus luminescens* TT01. **Microbiology,** v. 151, n. 8, p. 2543-2550, 2005.

WINTER, C. E.; GRUBER, A. **The *Photorhabdus luminescens* MN7 genome database.** 2013. Disponível em: < http://www.coccidia.icb.usp.br/PMN >.

ZIMMERMAN, M.; YUREWICZ, E.; PATEL, G. A new fluorogenic substrate for chymotrypsin. **Analytical Biochemistry,** v. 70, n. 1, p. 258-262, 1976.