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

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.

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).

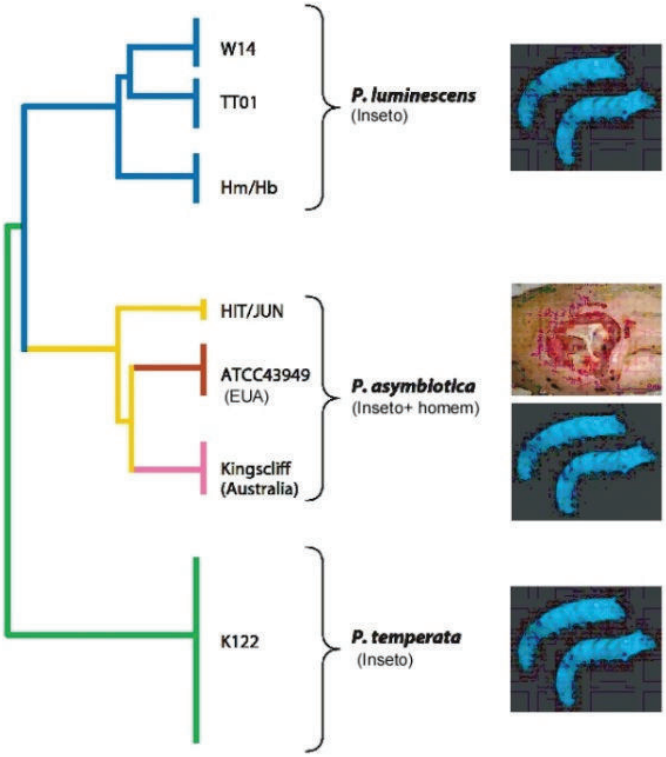
Photorhabdus apresenta um mecanismo muito peculiar para controle de expressão gênica. Durante seu ciclo de vida, a bactéria deve ser capaz de matar e colonizar o cadáver do inseto hospedeiro, mas em outro momento também deve ser capaz de sustentar o mutualismo com o nematoide. A forma patogênica, capaz 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*

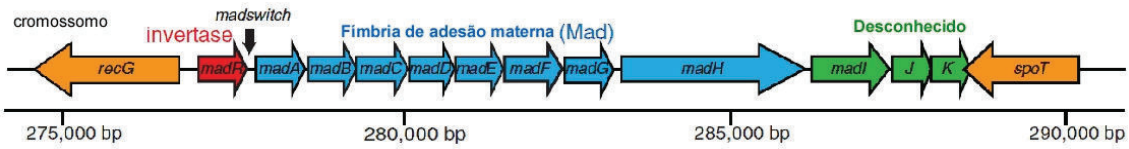


Esquema representativo da filogenia baseada em sequências de diversos locus do gênero *Photorhabdus*. Linhagens tipo de três diferentes espécies estão representados em diferentes clados. Modificado de Waterfield, Ciche e Clarke, 2009.

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).

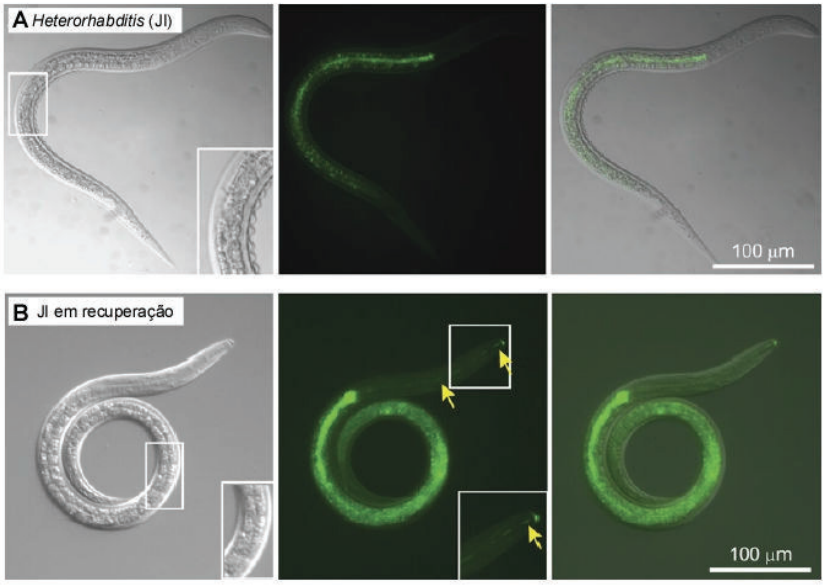
Heterorhabditis é encontrado no solo em apenas uma de suas fases de vida, a de juvenil infectante (JI), que corresponde à terceira fase larval do nematoide. As demais fases larvais e a fase adulta podem apenas ser encontradas no cadáver colonizado de insetos hospedeiros. O

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*

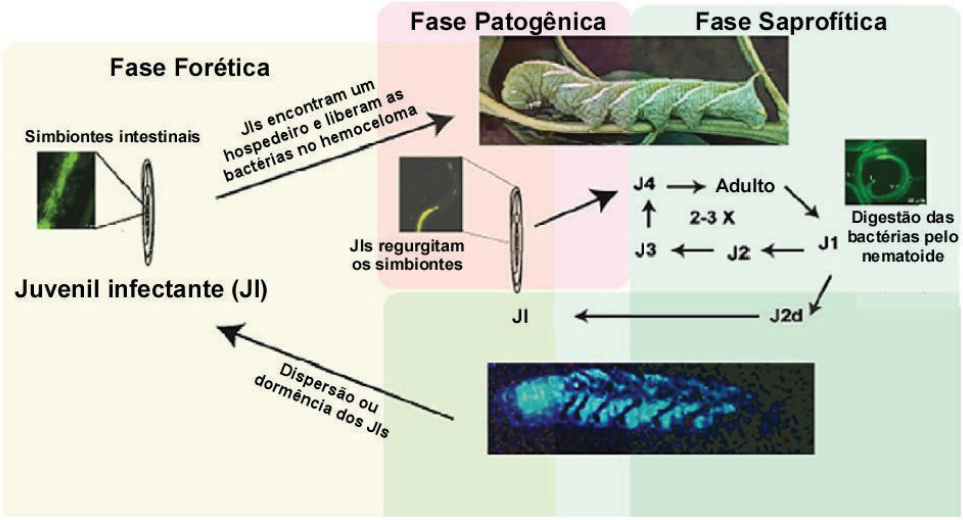


Juvenil infectante (JI) de *Heterorhabditis* e *Photorhabdus* expressando GFP em seu intestino. (A) JI de *Heterorhabditis* com células de *Photorhabdus* expressando GFP presentes na luz de seu intestino. À esquerda, microscopia Nomarski (quadrado branco indicando detalhe em aumento, sendo possível a 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).

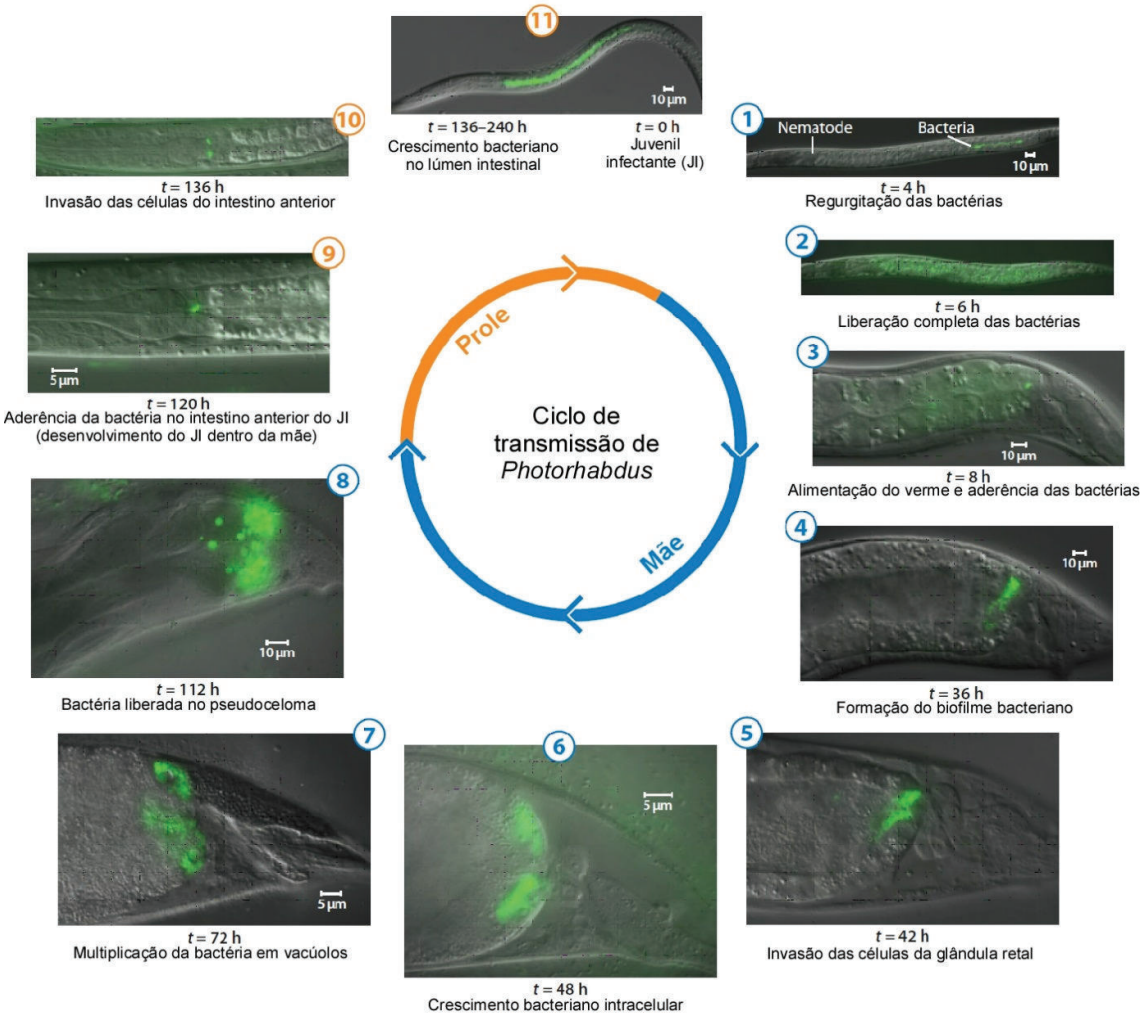
Enquanto existe uma quantidade de bactérias e matéria orgânica no cadáver do inseto suficiente para manter a população de nematoides, os nematoides proliferam, continuando seu desenvolvimento pelas fases larvais, sem entrar na fase de resistência JI. Isso normalmente ocorre por duas a três gerações, 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).

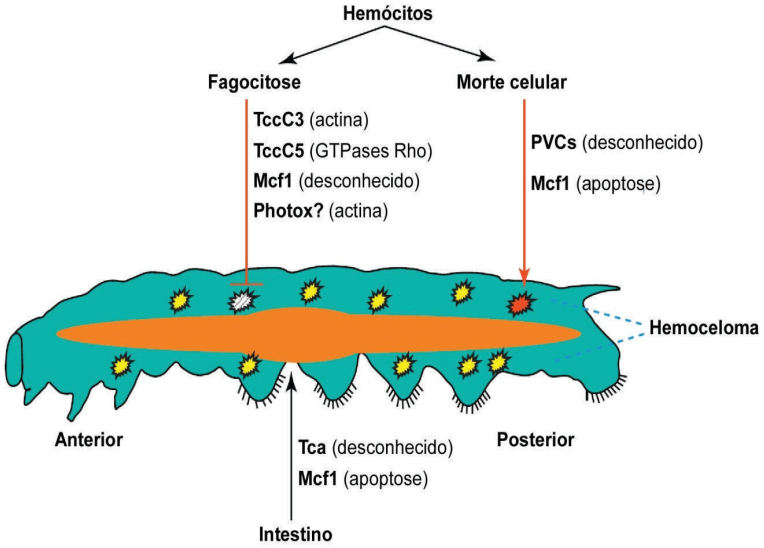
A espécie *P. luminescens* foi a primeira espécie a ser descrita, ainda como *Xenorhabdus luminescens* (THOMAS; POINAR, 1979). A linhagem TTO1, da espécie *P. luminescens*, foi a primeira a ser sequenciada no gênero *Photorhabdus* (DUCHAUD et al., 2003). Por este motivo, TTO1 tem sido adotada como uma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

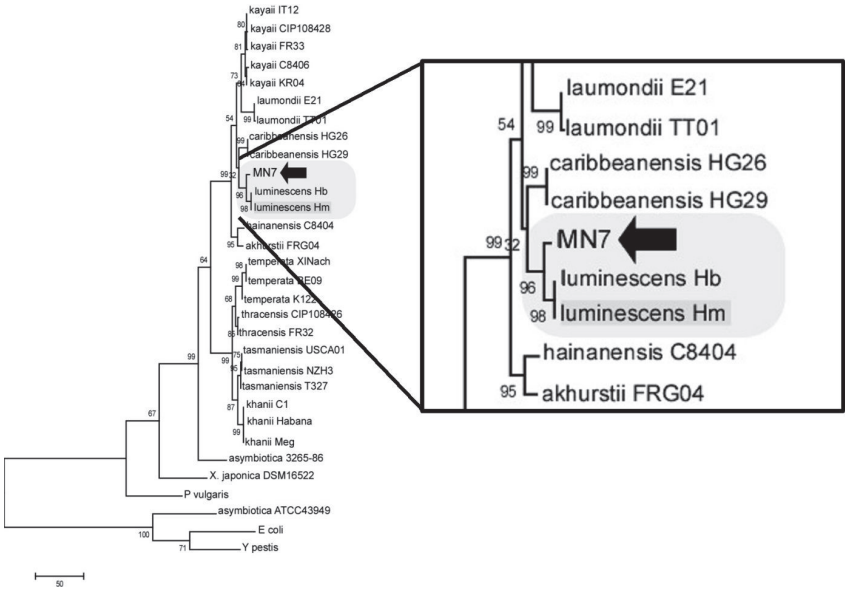
Proteínas desta subfamília são também caracterizadas pela presença do motivo RTX, *repeats-in-toxin*, apresentando um sinal de secreção C-terminal, mas não um peptídeo sinal N-terminal (BAUMANN, 2012).

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

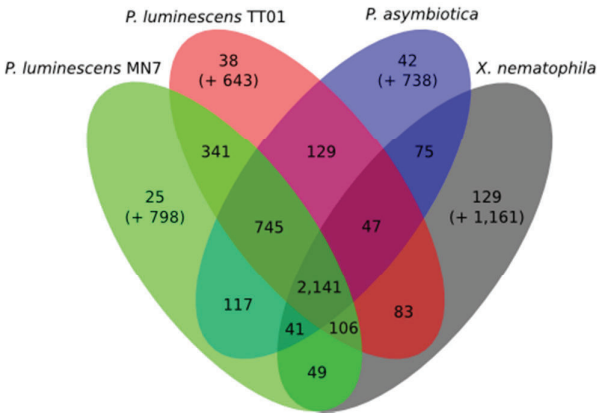
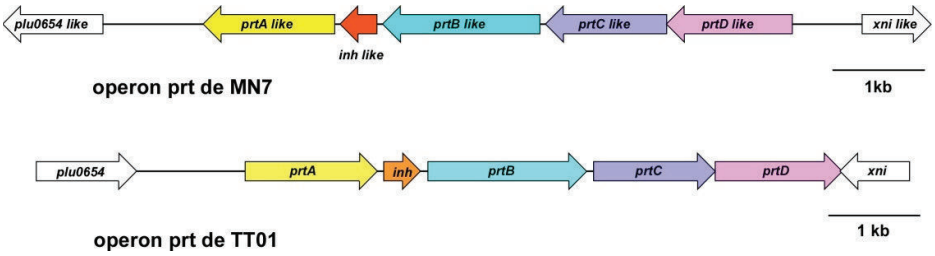


Diagrama de Venn apresentando a quantidade de ortólogos preditos pelo programa OrthoMCL (Li, Stoeckert e Roos, 2003) e compartilhados por diferentes cepas de bactérias simbiontes de nematoides entomopatogênicos. Os números entre parênteses representam os *singletons*, ou seja, genes que não foram classificados 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).

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.