**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Bioquímica)**

EDGAR ENRIQUE LLONTOP CORNEJO

**Estudo funcional e estrutural dos reguladores da
biossíntese do Pilus Tipo IV de *Xanthomonas citri*
subsp. *citri***

Versão corrigida da tese defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

06/05/2019

EDGAR ENRIQUE LLONTOP CORNEJO

**Estudo funcional e estrutural dos reguladores da
biossíntese do Pilus Tipo IV de *Xanthomonas citri*
subsp. *citri***

*Tese apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências (Bioquímica)*

*Orientador: Prof. Dr. Shaker Chuck Farah
Co-orientadora: Profa. Dra. Cristiane Rodrigues Guzzo*

São Paulo

2019

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

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

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

L792e Llontop-Cornejo, Edgar Enrique
Estudo funcional e estrutural dos reguladores da biossíntese do Pilus Tipo IV de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* / Edgar Enrique Llontop-Cornejo. - São Paulo, 2019.
225 p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador: Farah, Shaker Chuck
Coorientador: Guzzo, Cristiane Rodrigues

1. *Xanthomonas citri*. 2. Pilus Tipo IV. 3. Motilidade twitching. 4. c-di-GMP. 5. Biossinalização. I. T. II. Farah, Shaker Chuck, orientador. III. Guzzo, Cristiane Rodrigues, coorientador.

"A mind is like a parachute.
It doesn't work if it is not open"
Frank Zappa

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Chuck Farah pela orientação, por ter me dado a oportunidade de ser parte de seu laboratório e por sempre se preocupar em providenciar as melhores condições para o desenvolvimento deste trabalho. Pelos ensinamentos, pela confiança e a liberdade me dada para direcionar meu trabalho.

A minha co-orientadora Profa. Dra. Cristiane R. Guzzo, pelos ensinamentos, paciência, dicas, conselhos, horas de trabalhos e sobre tudo pela sua amizade e carinho em todos estes anos.

À minha família, em particular aos meus pais por seu amor, compressão e sempre acreditar em mim. A os meus irmãos pelo carinho e apoio constante. A meus tios e primos pelo apoio e sempre se preocupar por min.

Aos meus companheiros de laboratório atuais e passados pelos todos estes anos de boa convivência, conselhos e ajuda nos experimentos: Raphael Teixeira, Germán Sgro, Diorge Souza, Gabriel Oka, Natalia Bueno, William Cenens, Fernanda Nogales, Germán Dunger, Bruno Matsuyama, Maycom Oliveira, Layara Abiko, Phelipe Vitale, Angie Davalos, Tatiana Stabelini, Mario A. Rodríguez, Tania Churasacari, Iris Todeschini, Marcus Cardoso, Jose D. Rivera, Tiago Rodrigo, Santiago J. Arevalo e Felipe Akihiro. Em especial a Ilda Costa e Camila Schroeder, por facilitar o nosso trabalho no laboratório e por me fazer sentir parte da sua família.

Ao Dr. William Cenens pela amizade, paciência e ajuda com os experimentos de microscopia.

À Profa. Dra. Denize Favaro pela amizade e ajuda com os experimentos de RMN.

Ao Prof. Dr. Roberto Salinas e membros do seu laboratório pelos ensinamentos e ajuda como os experimentos de RMN.

Ao os meus amigos Germán S., William, Natalia, Giselda e Germán D. pelos conselhos, a grande amizade e tempo compartilhado.

Ao Prof. Dr. Pedro Chimoy e Prof. Dr. Richard Garrat pela ajuda, conselhos e a amizade em todos estes anos.

Ao Prof. Dr. Frederico Gueiros, à Profa. Dra. Carla Columbano e aos membros de seus laboratórios pela amizade, ajuda e disponibilidade no empréstimo de equipamentos.

Ao Prof. Dr. Alexandre Cardoso pela disponibilidade no uso do microscópio.

À Prof. Dra. Iolanda Cucovia pelo empréstimo de equipamentos.

Ao grupo de dança do IQ-USP que me ajudaram a relaxar durante os momentos de estresse, em especial ao Prof. Jurandir pelos momentos divertidos nas aulas e a todos os novos amigos que fiz.

Aos meus amigos da república: Leandro, Raula, Alexandra, Tania, Guillermo, Zaqueu, Rodrigo, Luis, Fiorella, Ariel, Leydi por sua amizade, brincadeiras, festas compartilhadas e ter se tornado minha família em São Paulo.

Aos meus amigos de longa data: Edwin, Paola, Javier, Saul, Harry, Erick, Juan, Jhonathan, Diego pelo apoio constante nos momentos mais difíceis.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado concedida e a FAPESP pelo apoio financeiro dado ao laboratório do Prof. Chuck.

RESUMO

Llontop, C. E. E. **Estudo funcional e estrutural dos reguladores da biossíntese do Pilus Tipo IV de *Xanthomonas citri* subsp. *citri***. 2019 (225p). Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Bioquímica – Instituto de Química – Universidade de São Paulo, SP.

O pilus tipo IV (T4P) são finos e flexíveis filamentos encontrados na superfície de uma ampla gama de bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e archaea. O T4P desempenha um rol crucial no estilo de vida bacteriano ao estar envolvido em uma variedade de funções incluindo motilidade, aderência, formação de biofilme, patogenicidade, transformação natural e na infecção por fagos. Várias das proteínas requeridas para a biossíntese e regulação do T4P se estendem através do periplasma conectado a membrana interna e externa. O T4P são estruturas dinâmicas que sofrem ciclos de extensão e retração energizados por duas ATPases associadas com a membrana interna bacteriana. Durante a extensão, PilB, a ATPase de biossíntese do T4P, estimula a polimerização do pilus a partir de monômeros de pilinas localizados na membrana interna, através de um mecanismo ainda desconhecido. Duas proteínas, FimX e PilZ estão envolvidas na regulação da biossíntese do T4P via interações com PilB e nocautes de esses genes acabam com a biogênese e função do T4P. Neste trabalho, nós determinamos a estrutura cristalográfica do complexo binário formado pelo domínio N-terminal de PilB (PilB_{Nt}, resíduos 12-163) e a PilZ com uma resolução de 1.7 Å. As interações entre PilB e PilZ envolve uma superfície hidrofóbica formada por aminoácidos altamente conservados na família não canônica de domínios PilZ. Mutações ou deleções de alguns destes resíduos em PilZ enfraquecem a interação PilB-PilZ e afeta a função do T4P. Nós também observamos que esta interação induz mudanças conformacionais no domínio PilB_{Nt}, revelando a possibilidade de um rearranjo estrutural funcionalmente relevante da região N-terminal de PilB permitindo a sua interação com PilM, conectando a ATPase PilB como a maquinaria do T4P. Nós mostramos que PilB, PilZ e FimX podem formar um complexo ternário estável com uma massa molar aparente de ~600 kDa, sugerindo uma estequiometria de 6PilB:6PilZ:2FimX. Também observamos que FimX incrementa a atividade ATPase do complexo PilB-PilZ. O c-di-GMP e o ATP γ S (um análogo não hidrolisável do ATP) induz mudanças conformacionais em FimX e no complexo PilB-PilZ, respectivamente, e estabiliza o complexo ternário PilB-PilZ-FimX. Além disso, PilB, PilZ e FimX localizam em um dos polos da célula (polo líder) em células de *X. citri* e a localização polar dirige a orientação da motilidade twitching. Finalmente, o T4P é necessário para a exitosa infecção de *X. citri* pelo fago Φ Xacm4-11. Nossos resultados sugerem que as

interações entre PilB-PilZ-FimX estariam envolvidas na regulação da função de PilB, onde sinais específicas sentidas pelos domínios de FimX seriam transmitidas por PilZ até PilB.

Palavras-chave: *Xanthomonas citri*, Pilus Tipo IV, Motilidade twitching, PilB, PilZ, FimX, c-di-GMP

ABSTRACT

Llontop, C. E.E. **Functional and structural studies of the regulators of Type IV Pilus biogenesis in *Xanthomonas citri* subsp. *citri***. 2019 (225p). PhD Thesis. Graduate Program in Biochemistry – Institute of Chemistry – University of São Paulo, SP.

Bacterial type IV pili (T4P) are thin and flexible filaments found on the surface of a wide range of Gram-negative bacteria and play a crucial role in their lifestyles due to their involvement in a variety of functions including motility, adherence, biofilm formation, pathogenicity, natural transformation and phage infection. Several proteins required for the biogenesis and regulation of T4P span the periplasm connecting both the inner and outer membranes. T4P are dynamic structures that undergo cycles of extension and retraction powered by two hexameric ATPases associated with the bacterial inner membrane. During extensions, the T4P assembly ATPase PilB stimulates the polymerization of pilin monomers from the inner membrane, though the precise mechanism is unknown. Two proteins, FimX and PilZ are involved in the regulation of T4P biogenesis via interactions with the PilB and knockouts of these proteins abolish T4P biogenesis. Here, we determined the crystal structure of the binary complex made up of the PilB N-terminal domain (PilB_{Nt}, residues 12-163) bound to PilZ at 1.7Å resolution. PilZ interactions with PilB involve a hydrophobic surface made up of amino acids conserved in a non-canonical family of PilZ domains. Mutations or deletion of some these amino acids in PilZ weaken the PilZ-PilB interaction and affect T4P function. This interaction induces significant conformational changes in the PilB_{Nt} domain, suggesting that structural rearrangements of the PilB N-terminal domains could be important for its interaction with PilM, connecting the ATPase PilB with T4P machinery. We show also that full-length PilB, PilZ and FimX can form a stable ternary complex with apparent molecular weight of ~600 kDa, suggestive of a 6PilB:6PilZ:2FimX stoichiometry and that FimX increases the ATPase activity of the PilB – PilZ complex. C-di-GMP and ATP_γS (non-hydrolysable analog of ATP) induce conformational changes in FimX and in PilB-PilZ, respectively, and stabilize the ternary PilB-PilZ-FimX complex. In addition, we show that PilB, PilZ and FimX localize at one cell pole (leading pole) that drives the movement in *X. citri*. Finally, the T4P is necessary for successful infection of *X. citri* cells by phage ΦXacm4-11. Our results suggest how FimX–PilZ–PilB interactions could be involved in the regulation of PilB function, where specific environmental signals sensed by FimX domains could be transmitted via PilZ to PilB.

Key words: *Xanthomonas citri*, Type IV Pilus, Twitching motility, PilB, PilZ, FimX, c-di-GMP

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ap^R – resistência à ampicilina

ATP – adenosina trifosfato

Cl^R – resistência à cloranfenicol

c-di-GMP – diguanilato cíclico

CFU – unidade formadoras de colônia

Da – Dalton

DGC – diguanilato ciclase

DMSO – dimetilsulfosido

D.O. – densidade ótica

HSQC – Heteronuclear single quantum coherence

Gm^R – resistência à gentamicina

IPTG – isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

Kb – quilobase

Kn^R – resistência à kanamicina

ORF – fase de leitura aberta (*Open Reading Frame*)

pb – pares de base

PCR – reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

PDB – banco de dados de proteínas (*Protein Data Bank*)

PDE – fosfodiesterase

PFU – unidade formadora

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

rpm – rotações por minuto

SAD – single-wavelength anomalous dispersion

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

T4P – pilus tipo IV (Type IV Pilus)

Xac – *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* str. 3016)

Lista de Figuras

Figura 1. Espécies e patovares do gênero <i>Xanthomonas</i> apresentam especificidade de hospedeiro e tecido.	23
Figura 2. <i>Xanthomonas</i> spp.	24
Figura 3. Lesões ocasionadas por <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	25
Figura 4. Visualização do pilus tipo IV.....	26
Figura 5. Motilidade twitching.....	27
Figura 6. Ciclo de formação do biofilme	28
Figura 7. Diferenças entre as pilinas do T4P.....	32
Figura 8. Distribuição e organização dos genes do T4P entre os diferentes grupos de bactérias.....	34
Figura 9. Arquitetura da maquinaria do pilus tipo IV.....	37
Figura 10. Modelo de pistão.....	38
Figura 11. Modelo de rotação	39
Figura 12. Modelo de rotação de PilB e PilC.....	40
Figura 13. Componentes das vias de sinalização de c-di-GMP.....	41
Figura 14. Estruturas cristalográficas de proteínas receptoras de c-di-GMP envolvidas na biossíntese do T4P	42
Figura 15. Organização dos domínios de FimX _{XAC2932} , PilZ _{XAC1133} e PilB _{XAC3239} de <i>X. citri</i>	43
Figura 16. Estrutura e resíduos conservados em PilZ _{XAC1133}	44
Figura 17. Estrutura do domínio EAL de FimX em complexo com c-di-GMP e PilZ de <i>X. citri</i>	45
Figura 18. Modelo de interação de FimX e PilZ com a maquinaria de ensemble do T4P em <i>X. citri</i>	46
Figura 19. Mapa dos vectores de expressão pET3a e pET28a	59
Figura 20. Mapa dos vectores de co-expressão pETDuet-1 e pETRSFDuet-1.....	59
Figura 21. Mapa do vector pOBD para a clonagem da isca no ensaio de duplo híbrido..	60
Figura 22. Mapa do vector pUFR047 para complementar mutantes de <i>X. citri</i>	60
Figura 23. Vector suicida pNPTS138	78
Figura 24. Predição dos domínios e da estrutura secundaria de PilB _{XAC3239}	89

Figura 25. Alinhamento e resíduos conservados dos domínios C-terminal na família de ATPase de PilB.....	90
Figura 26. PilZ interage com o a região N-terminal de PilB.....	92
Figura 27. Representação gráfica da arquitetura das presas encontradas no ensaio de duplo híbrido.....	94
Figura 28. Esquema das diferentes construções das proteínas FimX, PilZ e PilB.....	96
Figura 29. SDS-PAGE das diferentes construções das proteínas de interesse purificadas	97
Figura 30. Purificação do domínio ATPase de PilB	98
Figura 31. Purificação dos complexos FimX _{GGDEF-EAL} -PilZ e FimX _{GGDEF-EAL} -PilZ _{Δ107-117} ...	100
Figura 32. Purificação do complexo FimX-PilZ.....	101
Figura 33. Purificação do complexo FimX _{GGDEF-EAL_255-689} -PilZ _{Δ107-117}	101
Figura 34. Purificação do complexo PilZ-PilB ₁₂₋₁₆₃	102
Figura 35. Purificação do complexo PilB ₁₋₁₉₀ – PilZ	103
Figura 36. SDS-PAGE da expressão de PilB na presença e ausência de PilZ.....	104
Figura 37. Purificação do complexo PilB – PilZ.....	105
Figura 38. Cristais do complexo FimX _{GGDEF-EAL_255-289} -PilZ _{Δ107-117} -c-di-GMP	107
Figura 39. Cristais do domínio ATPase de PilB (PilB ₃₀₇₋₅₇₈).....	107
Figura 40. Cristais do complexo PilB ₁₂₋₁₆₃ -PilZ	107
Figura 41. Mapa de densidade eletrônica 2F _o -F _c (contornado a 1,0 σ) e rede cristalina encontrado no cristal do complexo FimX _{GGDEF-EAL_255-689} -PilZ _{Δ107-117} -c-di-GMP	111
Figura 42. Estrutura cristalográfica do complexo FimX _{EAL} -PilZ _{Δ107-117}	112
Figura 43. Resíduos de FimX _{EAL} e PilZ que interagem com c-di-GMP	113
Figura 44. Superposição das estruturas cristalográficas dos complexos FimX _{EAL} -PilZ-c-di-GMP	113
Figura 45. Moléculas do complexo PilB ₁₂₋₁₆₃ -PilZ encontradas na unidade assimétrica.	114
Figura 46. Estrutura cristalográfica do complexo PilB ₁₂₋₁₆₃ -PilZ	115
Figura 47. A conservada região C-terminal de PilZ e importante para a interação com PilB ₁₂₋₁₆₃	116
Figura 48. A região N-terminal de PilB está formado pelos domínios ND0 e ND1.....	117
Figura 49. Alinhamento estrutural da região N-terminal dos homólogos de PilB _{XAC3239} ..	120

Figura 50. Espectro ^1H - ^{15}N HSQC de PilB_{Nt}	122
Figura 51. Análise das interações entre PilB_{Nt} e mutantes de PilZ por SEC.....	124
Figura 52. Superposição das estruturas cristalográficas dos complexos $\text{PilZ-FimX}_{\text{EAL-c-di-GMP}}$ e $\text{PilB}_{12-163}\text{-PilZ}$	125
Figura 53. O ATP induz uma mudança conformacional no complexo PilB-PilZ	127
Figura 54. O ATP não induz uma mudança conformacional no complexo $\text{PilB}_{\text{K343A_E407A}}\text{-PilZ}$	128
Figura 55. Complexo ternário $\text{PilB}_{\text{Nt}}\text{-PilZ-FimX}_{\text{EAL}}$	130
Figura 56. Complexo ternário $\text{PilB}_{\text{Nt}}\text{-PilZ-FimX}_{\text{GGDEF-EAL}}$	131
Figura 57. O Complexo $\text{PilB}_{\text{Nt}}\text{-PilZ}$ não forma um complexo ternário estável com FimX e $\text{FimX}_{\text{PAS-GGDEF-EAL}}$	132
Figura 58. Complexo ternário PilB-PilZ-FimX	134
Figura 59. Complexo ternário $\text{PilB-PilZ-FimX}_{\text{GGDEF-EAL}}$	135
Figura 60. O Domínio FimX_{EAL} não forma um complexo ternário estável com o complexo PilB-PilZ	136
Figura 61. Co-expressão e purificação do complexo ternário PilB-PilZ-FimX	137
Figura 62. Mutações pontuais nos sítios de ligação e hidrólises do ATP do PilB afeta a oligomerização do complexo ternário.....	138
Figura 63. Comparação do perfil de eluição dos complexos PilB-PilZ-FimX e $\text{PilB}_{\text{K343A/E407A}}\text{-PilZ-FimX}$	139
Figura 64. PilB e FimX não interagem na ausência de PilZ	140
Figura 65. Resíduos conservados do PilZ importantes para a estabilidade do complexo ternário.....	142
Figura 66. Espectro ^1H - ^{15}N HSQC de PilZ na presença de FimX_{EAL} e PilB_{12-163}	144
Figura 67. Espectro ^1H - ^{15}N HSQC do complexo $\text{PilZ } (^{15}\text{N})\text{-PilB}_{12-163}$ na presença de FimX_{EAL}	145
Figura 68. Espectros ^1H - ^{15}N HSQC do complexo $\text{PilB}_{12-163}(^{15}\text{N})\text{-PilZ}$ na presença e ausência de FimX_{EAL}	146
Figura 69. Espectro de fluorescência da excitação e emissão de PilZ e $\text{PilZ}_{50\text{HW}}$	147
Figura 70. Curva de titulação de $\text{PilZ}_{50\text{HW}}$	148
Figura 71. Modelos da interação entre PilZ , PilB_{1-190} e FimX_{EAL}	149
Figura 72. Curva de titulação dos complexos $\text{PilZ}_{50\text{HW}}\text{-PilB}_{1-190}$ e $\text{PilZ}_{50\text{HW}}\text{-FimX}_{\text{EAL}}$	151

Figura 73. Determinação da massa molar das construções de FimX por SEC-MALS...	153
Figura 74. Determinação da massa molar da região N-terminal de PilB e do complexo PilB _{Nt} -PilZ por SEC-MALS.	154
Figura 75. Determinação da massa molar do complexo PilB-PilZ por SEC-MALS	156
Figura 76. Determinação da massa molar do complexo PilB-PilZ-FimX por SEC-MALS	157
Figura 77. FimX estimula a atividade ATPásica do complexo PilB-PilZ.....	160
Figura 78. Efeito de c-di-GMP e cardiolipina na atividade ATPásica do complexo PilB-PilZ	161
Figura 79. Motilidade twitching em cepas de <i>X. citri</i>	162
Figura 80. Motilidade twitching em cepas <i>X. citri</i> expressando as quimeras msfGFP-FimX, msfGFP-PilZ e msfGFP-PilB.....	164
Figura 81. Motilidade twitching por time-lapse em cepas de <i>X. citri</i>	166
Figura 82. Motilidade twitching por time-lapse em cepas quimeras de <i>X. citri</i>	167
Figura 83. Localização subcelular de FimX.....	169
Figura 84. Localização celular de PilZ.....	170
Figura 85. Localização celular de PilB	172
Figura 86. Distribuição subcelular de msfGFP-FimX, msfGFP-PilZ e msfGFP-PilB	174
Figura 87. Localização subcelular de FimX, PilZ e PilB em células de <i>X. citri</i> durante a motilidade twitching	175
Figura 88. Dinâmica na localização de FimX, PilZ e PilB	176
Figura 89. Suscetibilidade de <i>X. citri</i> pelo fago Φ Xacm4-11.....	178
Figura 90. Mutações no resíduo conservado Met117 do PilZ afeta a motilidade twitching e a infecção de <i>X. citri</i> pelo fago Φ Xacm4-11	180
Figura 91. Imagem de TEM das partículas do complexo ternário PilB-PilZ-FimX.....	182
Figura 92. Comparação da estrutura cristalográfica de um homólogo de PilB e uma das partículas do complexo PilB-PilZ-FimX visualizadas por TEM	182
Figura 93. Visualização do filamento do T4P em <i>X. citri</i> por TEM	184
Figura 94. Filamento do pilus tipo IV.....	185
Figura 95. Visualização da interação de <i>X. citri</i> com o bacteriófago Φ Xacm4-11.....	186
Figura 96. Alinhamento de sequência de domínios REC.	188

Figura 97. Comparação estrutural dos complexos PilB _{Nt} -PilZ e GspE _{Nt} -GspL _{cyto}	191
Figura 98. Mecanismos envolvidos na ligação das ATPases de montagem com a maquinaria de T4P e T2SS.....	193
Figura 99. Modelo de interação do complexo ternário PilB-PilZ-FimX.....	197
Figura 100. Modelo da localização de PilB, PilZ, FimX e PilT durante a motilidade twitching	200

Lista de tabelas

Tabela 1. Meios de Cultura.....	49
Tabela 2. Linhagens utilizadas neste trabalho.....	50
Tabela 3. Instruções dos ciclos de PCR.....	53
Tabela 4. Construções usadas para expressão dos diferentes fragmentos de <i>FimX</i> _{XAC2398} , <i>PilZ</i> _{XAC1133} e <i>PilB</i> _{XAC3239}	55
Tabela 5. Construções usada nos ensaios de duplo híbrido.	57
Tabela 6. Construções para complementar mutantes de <i>X. citri</i>	57
Tabela 7. Oligonucleotídeos para o sequenciamento das construções	58
Tabela 8. Oligonucleotídeos para a produção de mutações sítio dirigidas.....	62
Tabela 9. Clones e condições otimizadas utilizadas na expressão e co-expressão dos diferentes fragmentos de <i>FimX</i> , <i>PilZ</i> e <i>PilB</i>	65
Tabela 10. Clones e condições otimizadas utilizadas na co-expressão das proteínas de interesse.....	66
Tabela 11. Resumo das condições de purificação das proteínas sozinhas e em complexos	68
Tabela 12. Oligonucleotídeos usados para a inserção de <i>msfGFP</i> e para a deleção dos genes de interesse	79
Tabela 13. Presas encontradas no ensaio de duplo híbrido usando como isca <i>FimX</i> ₁₋₁₆₃ (domínio REC).....	93
Tabela 14. Condições de cristalização e concentração das proteínas em estudo	106
Tabela 15. Processamento e refinamento dos dados de difração de raios X dos complexos cristalizados.....	109
Tabela 16. Resíduos encontrados na interface de interação do complexo <i>PilB</i> ₁₂₋₁₆₃ - <i>PilZ</i>	118
Tabela 17. Proteínas com similar enovelamento à região N-terminal de <i>PilB</i> encontradas com DALI server.....	119
Tabela 18. Resíduos de <i>PilZ</i> que formam parte da interface de interação com <i>FimX</i> _{EAL} e <i>PilB</i> ₁₂₋₁₆₃	126
Tabela 19. Massa molar das proteínas de interesse determinado por SEC-MALS.....	158
Tabela 20. Número de células e dos foci analisados nas diferentes cepas de <i>X. citri</i> expressando as quimeras <i>msfGFP-FimX</i> , <i>msfGFP-PilZ</i> e <i>msfGFP-PilB</i>	173
Tabela 21. Motilidade twitching, suscetibilidade ao fago Φ Xacm4-11 e localização subcelular de <i>msfGFP-FimX</i> , <i>msfGFP-PilZ</i> e <i>msfGFP-PilB</i> nas cepas de <i>X. citri</i>	179
Tabela 22. Link de acesso para os vídeos de time lapse.....	222

Sumário

1	Introdução	23
1.1	O gênero <i>Xanthomonas</i>.....	23
1.1.1	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>.....	24
1.2	Motilidade bacteriana	25
1.3	O Pilus Tipo 4 (T4P)	26
1.4	Funções do Pilus Tipo IV	26
1.4.1	Motilidade twitching	26
1.4.2	Biofilme e aderência	27
1.4.3	Virulência.....	28
1.4.4	Captação de DNA extracelular	29
1.4.5	Infecção por bacteriófagos	30
1.5	Tipos de Pilus tipo IV	30
1.6	Arquitetura do pilus tipo IV (T4P).....	35
1.7	Modelos de biogênese do T4P.	38
1.8	Pilus tipo IV e c-di-GMP	41
1.9	Regulação da biossíntese do T4P	42
2	Objetivos.....	47
3	Materiais e métodos	48
3.1	Cepas utilizadas e meios de cultivo	48
3.2	Predicação das estruturas secundárias e identificação dos domínios de PilB_{XAC3239}, FimX_{XAC2398} e PilZ_{XAC1133}	53
3.3	Reações de PCR, clonagem e expressão de proteínas	53
3.4	Mutação sitio dirigida.....	61
3.5	Indução, expressão e co-expressão de proteínas heterólogas	63
3.6	Expressão de proteínas com selênio-metionina (SeMet)	63
3.7	Expressão de proteínas marcadas com ¹⁵N	64
3.8	Expressão de proteínas marcadas com o L-5-hidroxytriptofano (5OH-W)..	64

3.9	Purificação de proteínas	67
3.10	Ensaio de cristalização.....	71
3.11	Coleta de dados de raios X e determinação da estrutura	71
3.12	Ensaio de Interação proteína-proteína.....	72
3.12.1	Ensaio de duplo híbrido em levedura.....	72
3.12.2	Ensaio de atividade β -galactosidase	73
3.12.3	Cromatografia de exclusão molecular analítica (SEC).....	74
3.12.4	Determinação da massa molar das proteínas de interesse por SEC-MALS	74
3.12.5	Ressonância magnética nuclear	74
3.13	Ensaio de interação proteína – proteína empregando a fluorescência intrínseca de proteínas contendo L-5hidroxitriptofano (5OH-W).....	75
3.14	Detecção da atividade ATPásica de PilB	76
3.15	Obtenção das linhagens de <i>X. citri</i> geneticamente modificadas	76
3.15.1	Desenho dos vectores para nocautear genes em <i>X. citri</i>	76
3.15.2	Desenho dos vectores para a obtenção das cepas <i>Xac_msfGFP-FimX</i> , <i>Xac_msfGFP-PilZ</i> e <i>Xac_msfGFP-PilB</i>	77
3.15.3	Transformação e seleção das linhagens de <i>X. citri</i> geneticamente modificadas	82
3.15.4	Complementação de cepas nocautes de <i>X. citri</i>	83
3.16	Ensaio de microscopia	83
3.16.1	Análise da motilidade twitching	83
3.16.2	Ensaio de localização in vivo das proteínas de interesse em <i>X. citri</i> por microscopia de fluorescência.....	84
3.16.3	Ensaio de motilidade twitching por <i>time-lapse</i> por microscopia de fluorescência.....	84
3.17	Ensaio de infecção de <i>X. citri</i> pelo fago Φ Xacm4-11.....	85
3.18	Ensaio de microscopia de transmissão eletrônica (TEM).....	85
4	Resultados	87

4.1	Predição dos domínios e da estrutura secundária da proteína PilB.....	87
4.2	Ensaio de Duplo Híbrido	91
4.2.1	PilZ interage com a região N-terminal de PilB.....	91
4.2.2	FimX interage com proteínas de quimiotaxia	93
4.3	Expressão e purificação das proteínas FimX, PilB, PilZ e seus fragmentos recombinantes	95
4.4	Co-expressão e purificação dos complexos proteicos binários FimX-PilZ e PilB-PilZ	99
4.4.1	Co-expressão e purificação dos complexos de FimX e PilZ e seus fragmentos	99
4.4.2	Co-expressão e purificação dos complexos PilB e PilZ e seus fragmentos	102
4.5	Cristalização de proteínas	106
4.6	Coleta e processamento dos dados cristalográficos.....	108
4.7	Estrutura do complexo FimX _{GGDEF-EAL_255-689} -PilZ _{Δ107-117} -c-di-GMP.....	110
4.8	Estrutura do complexo PilB ₁₂₋₁₆₃ -PilZ.....	114
4.9	Alinhamento estrutural de homólogos da região N-terminal de PilB.....	119
4.10	PilBNt é uma proteína desenovelada na ausência de PilZ.....	121
4.11	Resíduos conservados de PilZ importantes para a interação com PilB	123
4.12	Comparação das estruturas cristalográficas dos complexos PilB ₁₂₋₁₆₃ -PilZ e PilZ-FimX _{EAL}	125
4.13	O ATP induz uma mudança conformacional no complexo PilB-PilZ	127
4.14	FimX, PilZ e PilB formam um complexo ternário <i>in vitro</i>	129
4.15	FimX e PilB não interagem na ausência de PilZ	139
4.16	Efeito de duas mutações pontuais em PilZ na formação do complexo ternário	141
4.17	Analisando as interações de PilB-PilZ-FimX por RMN.....	143
4.18	Monitoramento dos complexos PilB ₁₋₁₉₀ – PilZ e PilZ – FimX _{EAL} por fluorescência do 5-hidroxytriptofano (5OHW).....	147

4.19	Determinação da massa molar das proteínas de PilB, PilZ e FimX e de seus complexos por SEC-MALS	152
4.20	Determinação da atividade ATPásica de PilB.....	159
4.21	Observação da motilidade twitching nas cepas de <i>X. citri</i>	162
4.22	Localização subcelular de msfGFP-FimX, msfGFP-PilZ e msfGFP-PilB por microscopia de fluorescência.....	168
4.23	Infecção de <i>X. citri</i> pelo fago ΦXacm4-11	177
4.24	Efeito da mutação no resíduo Met117 de PilZ _{XAC1133} em <i>X. citri</i>	180
4.25	Ensaio de microscopia de transmissão eletrônica (TEM).....	181
4.25.1	Visualização do complexo ternário PilB-PilZ-FimX.....	181
4.25.2	Visualização do filamento do T4P em <i>X. citri</i>	183
4.25.3	Análise da interação de <i>X. citri</i> com o bacteriófago ΦXacm4-11 por microscopia eletrônica.	185
5	Discussão.....	187
5.1	Evidências que FimX participa em resposta a sinais extracelulares	187
5.2	A interação entre PilZ e FimX.....	189
5.3	A interação entre PilZ e PilB.....	190
5.4	Mecanismos de regulação de montagem do T4P e do T2SS	192
5.5	Oligomerização e atividade ATPásica de PilB.....	193
5.6	Evidências da formação do complexo ternário PilB-PilZ-FimX.....	195
5.7	Evidência da importância da formação do complexo ternário PilB-PilZ-FimX.	198
5.8	Localização polar de FimX, PilB e PilZ	198
5.9	Observação dos filamentos do T4P e evidências da sua interação com o fago ΦXacm4-11	202
5.10	Considerações finais.....	203
6	Conclusões	204
7	Referências	206

8	Apêndices.....	218
8.1	Vídeo da motilidade twitching em diferentes cepas de <i>X. citri</i>	218
8.2	Vídeos da localização subcelular de FimX, PilZ e PilB em células de <i>X. citri</i> durante a motilidade twitching	220
8.3	Vídeos mostrando a dinâmica na localização de FimX, PilZ e PilB.....	221
9	Anexo.....	223

1 Introdução

1.1 O gênero *Xanthomonas*

O gênero *Xanthomonas* é um grupo de bactérias Gram-negativas que pertence à subdivisão das γ -Proteobactérias e causam sérios danos a centenas de espécies de plantas ornamentais e de interesse agrônomo, incluindo uma grande variedade de cultivos economicamente importantes, como o arroz, cítricos, banana, repolho, tomate, pimenta e feijão [1]. O gênero *Xanthomonas* atualmente possui 36 espécies e mais de 300 patovares [2,3], e cada patovar exibe individualmente uma gama muito restrita de hospedeiros e principalmente especificidade de tecido, invadindo o sistema vascular (xilema) ou os espaços intercelulares no tecido mesófilo do hospedeiro [4] (**Figura 1**). As espécies de *Xanthomonas* apresentam uma forma de bacilo (**Figura 2B**), são aeróbios obrigatórios e a temperatura ótima de crescimento usualmente está entre 25-30 °C. As colônias apresentam uma coloração amarela devido à produção do pigmento xantomonadina, o qual o protege do dano fotobiológico [5,6] (**Figura 2A**).

Figura 1. Espécies e patovares do gênero *Xanthomonas* apresentam especificidade de hospedeiro e tecido. As diferentes espécies de *Xanthomonas* podem atacar plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas, invadindo o sistema vascular (vascular pathogens) ou o tecido mesófilo (mesophylllic pathogens) do hospedeiro. Algumas espécies como *X. manihotis* podem ser capazes de colonizar ambos. Imagem tomada de referência [1].

Tipicamente, a bactéria infecta a planta através de aberturas naturais (por exemplo: estomas e hidatódios) e ferimentos ocasionados por insetos ou durante a coleta [4]. O sucesso da infecção e da multiplicação bacteriana no hospedeiro depende da expressão coordenada de uma ampla gama de fatores de virulência como por exemplo os sistemas de secreção, adesinas, polissacarídeos, LPS e enzimas hidrolíticas [5]. A fixação bacteriana é chave para o processo de colonização dos tecidos do hospedeiro, e se inicia através de estruturas de superfície e apêndices que contribuem na patogênese, na

motilidade, na adesão a célula hospedeira e na sua interação com os tecidos do hospedeiro, sendo o pilus tipo IV (Type IV Pilus, T4P) de grande importância nestes processos [7,8].

Figura 2. *Xanthomonas* spp. **A.** Cultura de *Xanthomonas* spp. mostrando a sua característica pigmentação amarela (xanthomonadina) e à aparência mucoide. **B.** Imagem de microscopia das células de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* mostrando a sua morfologia bacilar, magnificação 100x. **A.** Imagem tomada de referencia [11]. **B.** Imagem elaborada pelo autor

1.1.1 *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Xanthomonas citri subsp. *citri* (*X. citri* ou *Xac*), previamente chamada *Xanthomonas axonopodis* subsp. *citri* linhagem 306, é a causadora do cancro cítrico, doença que afeta cultivares de citros comerciais com grande impacto econômico no mundo [7,9]. A doença se manifesta inicialmente nas folhas, surgindo lesões necróticas arredondadas, salientes e de coloração amarronzada e amarelada ao redor, nos dois lados das folhas (**Figura 3A**). Posteriormente, estas lesões aparecem nas frutas e nos ramos diminuindo a quantidade e a qualidade das frutas causando um elevado prejuízo na produção de frutos e seus derivados [10,11] (**Figura 3B e C**). O genoma de *X. citri* foi o primeiro do gênero em ser sequenciado, e possui um cromossoma circular de aproximadamente 5 milhões de pares de bases (pb) e dois plasmídeos: pXAC33 (33,699 pb) e pXAC64 (64,920 pb), apresentando mais de 4300 ORFs (Open Reading Frames) [12]. A virulência de *X. citri* subsp. *citri* envolve a coordenada expressão de um amplo leque de fatores de virulência secretados e associados na célula como por exemplo os sistemas de secreção tipo II (T2SS) e tipo III (T3SS), adesinas (como fimbrias e T4P), exopolissacarídeos (EPS) e lipopolissacarídeos (LPS), todos eles importantes para a exitosa interação com seu hospedeiro [5].

Figura 3. Lesões ocasionadas por *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Lesões em folias (A), fruto (B) e em ramos (C) de diferentes plantas cítricas. Imagens foram tomadas do endereço eletrônico:

www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/prokaryotes/pages/citruscankerport.aspx

1.2 Motilidade bacteriana

A motilidade fornece às bactérias a capacidade de se locomover e procurar ativamente ambientes favoráveis e evitar situações perigosas, facilitando o crescimento e sobrevivência em seus habitats naturais [13]. Para isto as bactérias têm desenvolvido uma variedade de estruturas como o flagelo e o pilus tipo IV responsáveis pela motilidade. A expressão de estas estruturas varia dependendo não só do organismo em questão, mas também do ambiente em que se encontra [14]. O flagelo é a estrutura bacteriana mais amplamente estudada envolvido nos tipos de motilidade conhecidos como swimming e swarming, assim como na formação de biofilme, transporte de proteínas, aderência e virulência [15,16]. Swarming é definido como um rápido movimento multicelular de bactérias sob uma superfície húmida impulsado pela rotação do flagelo e pode ser visualizado experimentalmente em meios com baixa concentração de ágar (0,5 - 0,7%) [16,17]. Swimming é um modo de movimento bacteriano que também é impulsado pela rotação do flagelo, mas, a diferencia de swarming, toma lugar em células individuais movendo-se em um ambiente líquido [16]. Nas últimas décadas o pilus tipo IV tem surgido como uma estrutura bacteriana envolvido na motilidade de um amplo número de bactérias sob superfícies orgânicas e inorgânicas, chamada twitching que é um tipo de motilidade impulsado por ciclos consecutivos de extensão e retração do pilus tipo IV. Em condições de laboratório, twitching é realizado na superfície intersticial entre uma superfície sólida e o ágar [17,18]. Outro tipo de motilidade que tem sido observado a ser influenciado por o T4P é o sliding, uma passiva translocação independente do flagelo e do T4P produzida pela força de expansão de uma colônia em crescimento sob superfícies húmidas, correlacionado com a secreção de substâncias que diminuem a tensão superficial como lipopeptídeos, lipopolisacarídeos e glicolípidos [17]. Finalmente, gliding é um tipo de

movimento ativo de superfície independente do flagelo e do T4P ou de qualquer outro apêndice externo. Geralmente o movimento celular segue o eixo longo da célula e parece ser dependente de estruturas altamente dinâmicas chamadas "focal-adhesion complex" que estão localizados em todo o corpo da bactéria [19].

1.3 O Pilus Tipo 4 (T4P)

O T4P são fibras helicoidais longas (1-5 μm), finas (50–80Å de diâmetro) e flexíveis que podem resistir até 100 pN de força, são expressos nas superfícies de uma ampla variedade de espécies bacterianas Gram-positivas, Gram-negativas e archaea [20]. O T4P desempenha um papel importante em diversas funções bacterianas como na formação de biofilme, motilidade, patogenicidade, formação de microcolônias, na interação com planta e fungos, na sinalização celular, na captação de DNA exógeno e como receptor da entrada de bacteriófagos [8,20–24]. Além disso, o T4P tem sido encontrado para funcionar no transporte de elétrons em *Geobacter sp.* [25] e como um mechano-sensor que induz a expressão de genes de virulência em *Pseudomonas aeruginosa* [26]. Estas estruturas tem sido amplamente estudadas em bactérias patogênicas de humanos do gênero *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Vibrio* e *Escherichia*, assim como em bactérias de vida livre como *Thermus thermophilus* e *Myxococcus xanthus* [27–32].

Figura 4. Visualização do pilus tipo IV. Microscopia eletrônica de varredura mostrando os filamentos do T4P distribuídos peritricamente em *N. gonorrhoeae* (A). Microscopia eletrônica de transmissão dos filamentos de T4P com localização polar em *P. aeruginosa* (B) e *T. thermophilus* (C). Barra de escala é 500 nm em B e C. Imagens foram tomadas das referências [8], [33] e [25].

1.4 Funções do Pilus Tipo IV

1.4.1 Motilidade twitching

A motilidade twitching é uma forma de translocação independente do flagelo que produz zonas de espalhamento sob meio sólido e tem sido observada num grande número de bactérias que expressam T4P como *P. aeruginosa*, *M. xanthus*, *N. gonorrhoeae*, *X. citri* subsp. *citri*, *Ralstonia solanacearum*, *Lysobacter sp.* e *V. cholerae*. [18,21,34,35]. A

motilidade twitching envolve ciclos repetitivos de polimerização, aderência a superfícies (substratos sólidos ou outras células), e posteriormente despolimerização ou retração do pilus (sendo a retração do pilus essencial para a motilidade) resultando no movimento celular (translocação) sob superfícies de 2 até 20 (ou mais) $\mu\text{m min}^{-1}$, dependendo da espécie bacteriana, das condições do substrato e se as células se movem sozinhas ou em grupos (rafts) [35–38]. Alguns relatos tem mostrado que a motilidade twitching é influenciado por condições nutricionais, densidade celular e por sinais extracelulares e intracelulares dependente de contato entre células, porem as sinais ambientais específicas que controlam a motilidade twitching ainda são desconhecidas [36,39,40]. A motilidade twitching permite exploração de superfícies, e pode atuar como um mecanismo de escape quando o ambiente não for favorável [39]. A motilidade twitching também desempenha uma série de papéis na formação de biofilme, promovendo a adesão inicial das bactérias a vários substratos e a morfologia do biofilme [41,42]. Além disso, também contribui para a virulência de patógenos e já foi demonstrado que mutantes de *P. aeruginosa* que expressam o T4P, mas que não realizam a motilidade twitching, são capazes de colonizar os pulmões de ratos em níveis comparáveis aos do tipo selvagem, mas foram prejudicadas na sua capacidade de se disseminar para outros órgãos [43]. Similarmente, a motilidade twitching permite a disseminação de *Xylella fastidiosa* através do xilema da planta [44].

Figura 5. Motilidade twitching. **A)** Representação gráfica da motilidade twitching, o pilus é estendido (polimerização) vários micrometros, a ponta do pilus se adere na superfície e imediatamente é retraído permitindo o descolamento da bactéria. **B)** Visualização de células de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* realizando twitching, onde se observa células individuais o em grupos se afastando da colônia. Imagem elaborada pelo autor.

1.4.2 Biofilme e aderência

O T4P desempenha papeis muito importantes na formação de biofilme pois participa na aderência a superfícies, a formação de microcolônias e o manutenção da estrutura

formada [41]. Biofilmes são comunidades bacterianas altamente organizadas e topologicamente complexas formadas por uma matriz de bactéria, proteína, polissacarídeos e DNA extracelular aderida a uma superfície [45], e são geralmente formados em resposta a estímulos que podem prejudicar o crescimento da bactéria, protegendo-se assim de diversas condições adversas através do incremento da resistência a antibióticos, crescimento lento, expressão genica diferencial, elevados níveis de transferência lateral de genes, resistência ao estresse e resistência aos mecanismos de defesa do hospedeiro [46,47]. Existem vários trabalhos mostrando que mutantes nos genes relacionados com o T4P são deficientes na formação de biofilme e na aderência a superfície em vários tipos de bactéria como *P. aeruginosa* [27], *N. meningitidis* [48], *V. cholerae* [49], *E. coli* [50], *Clostridium difficile* [51] e *X. citri* sp. *citri* [21]. Além de promover a aderência e a formação de microcolônias no biofilme [41], o T4P participa no modelamento da arquitetura do biofilme (estruturas que assemelham cogumelos) através da motilidade twitching permitindo que a bactéria se mova a específicas zonas do biofilme [42,52]. Similarmente, em *M. xanthus* a motilidade twitching foi mostrado para ser importante na correta formação dos corpos frutíferos (fruiting body) [53]. Além disso, em *N. gonorrhoeae* e *M. xanthus*, mutantes em *pilT* (ATPase necessária para a retração do T4P) são capazes de se aderir a superfícies e a outras células, mas não são capazes de formar microcolônias ou amplos grupos (rafts) de células, respectivamente [54,55].

Figura 6. Ciclo de formação do biofilme. O processo de formação do biofilme pode ser agrupado em 5 diferentes fases: (1) As células entram em contato com a superfície e se aderem reversivelmente, (2) início da produção da matriz exopolissacarídica (EPS) e a adesão irreversível e agregação bacteriana, (3) divisão celular e formação de microcolônias, (4) crescimento e maturação do biofilme, observando-se uma arquitetura complexa no biofilme, e (5) biofilme maduro e células individuais móveis (células escuras) se dispersam do biofilme podendo repetir o ciclo. Adaptado da referência [45].

1.4.3 Virulência

A habilidade para aderir-se ao hospedeiro é um requisito importante para a patogenicidade, sendo este passo requerido para iniciar a infecção. Vários estudos com

bactérias patógenos de animais tem mostrado que a perda do T4P diminui a aderência e a habilidade de colonizar o hospedeiro, o qual está relacionado com a redução da virulência e a patogenicidade [56,57]. Em *V. cholerae* a Toxin-coregulated pili (TCP), um tipo de T4P, está envolvido na secreção do fator de colonização (TcpF), na formação de microcolônias mediando a interação pilus-pilus formando uma estrutura conhecida como "bundled filaments" que as protegem dos mecanismos de defesa do hospedeiro [58]. Em *P. aeruginosa*, o T4P atua como um mecano-sensor, o qual requer a aderência a superfície e a posterior retração do pilus, regulando os níveis de cAMP via o sistema quimo-sensor Chp induzindo a expressão de fatores de virulência como os T2SS e T3SS [26]. O T4P também são fatores de virulência de vários patógenos de plantas, e estão envolvidos na aderência a tecidos de plantas e na disseminação. Algumas bactérias como *P. syringae* e *P. putida* são conhecidas por penetrar os seus hospedeiros através de um mecanismo T4P-dependente [59]. Em *X. oryzae* pv. *oryzae* a deleção de dois reguladores da biossíntese do T4P, FimX e PilZ, resulta na diminuição da transcrição de genes do T3SS e na diminuição da sua virulência no arroz [60]. Por outro lado, mutações nos componentes do T4P em *X. campestris* pv. *campestris* e *X. citri* sp. *citri* não afeta a sua capacidade de causar doença no seu hospedeiro [21,61].

1.4.4 Captação de DNA extracelular

Os T4P estão fortemente associados com a captação de DNA extracelular em várias espécies bacterianas, assim desempenhando um importante papel na transferência horizontal de genes [62]. A habilidade de bactérias para internalizar e incorporar DNA para alterar seus genomas permite que elas se adaptem a diferentes ambientes e hospedeiros por meio da aquisição de uma variedade de características de virulência e resistência [63]. A captação de DNA extracelular vem sendo estudado em organismos como *N. gonorrhoeae* [64], *Streptococcus pneumoniae* [63], *V. cholerae* [22,30], *Haemophilus influenzae* [64] e *T. thermophilus* [65]. Em *Neisseria* sp. e *H. influenzae* tem sido observado que a presença de sequências específicas no DNA são requeridas para uma eficiente captura de DNA [64,66]. Algumas bactérias como *Neisseria* sp. são constitutivamente competentes [67], por outro lado, em *Vibrio* sp. a competência é induzida pela presença de quitina [22]. Apesar dos muitos estudos investigando a captação de DNA extracelular via o T4P, ainda não se conhecem os mecanismos que envolvem este processo. Recentemente foi observado diretamente em *V. cholerae*, que o DNA extracelular se liga na ponta do pilus e que a incorporação do DNA no interior da célula é mediada pela retração do pilus [30].

1.4.5 Infecção por bacteriófagos

Os bacteriófagos tem adquirido atenção por seu enorme potencial biotecnológico ao ser usados como antibacterianos, em sistemas phage display, como veículos para o delivery de vacinas, na tipificação de bactérias e como biocontrol de patógenos de plantas [68]. Os bacteriófagos, ou fagos, são vírus bacterianos ubíquos que infectam exclusivamente bactérias alvos através da sua interação com receptores na superfície da célula, adsorção, injetando seu genoma, multiplicando-se exponencialmente e matando a bactéria por lise [69]. O T4P tem sido identificado como receptor de bacteriófagos em várias espécies bacterianas como *P. aeruginosa* [70,71], *V. cholerae* [72], *P. syringae* [73], *X. axonopodis* pv. *citri* cepa XW47 [74], *X. citri* subsp. *citri* [21], *X. fastidiosa* [75], *Stenotrophomonas maltophilia* [76] e *R. solanacearum* [77]. A exata maneira na qual eles interagem com o pilus ainda é desconhecida. Por outro lado, imagens de microscopia eletrônica sugerem que aderência dos fagos ocorre ao longo do pilus e são levados até a célula durante a retração do pilus [23]. Fagos podem ter importância na evolução patogênica bacteriana. Por exemplo, o TCP em *Vibrio* atua como um específico receptor para o fago CTX Φ (Cholera toxin phage), a qual pode infectar espécies de *Vibrio* não patogênicas e conferi-lhes virulência por provê-las dos genes que codificam as subunidades da toxina do cólera [72]. Outros fagos como XacF1 e ϕ RSM3 causam a perda de virulência e a motilidade twitching em *X. axonopodis* pv *citri* cepa MAFF301080 e *R. solanacearum*, respectivamente [78,79]. Recentemente tem sido observado que a glicosilação de PilA em *P. aeruginosa* é um mecanismo de defesa contra a infecção de fagos [71].

1.5 Tipos de Pilus tipo IV

O T4P é classificado em dois subtipos, o pilus tipo IVa (T4aP) e o tipo IVb (T4bP), baseado no tamanho do peptídeo líder, na sequência de aminoácidos das pilinas, no rearranjo de seus genes no genoma e nos componentes que fazem parte da maquinaria de biossíntese [80]. O T4aP estão presentes numa ampla gama de espécies bacterianas como *P. aeruginosa* [39], *N. meningitidis* [81], *M. xanthus* [82], *Clostridium* sp. [83] e *X. citri* [21]. Por outro lado, o T4bP foram inicialmente encontrados exclusivamente em bactérias entero-patogênicas [80] como *V. cholerae* [84], *E. coli* entero-toxigênica [85] e *Salmonella enterica* [86], mas atualmente também tem sido reportado em *Mycobacterium tuberculosis* [87].

As pilinas do T4aP possuem uma curta sequência líder (5 a 7 resíduos) e um tamanho de sequência da pilina madura (após a clivagem da sequência líder por uma prepilin peptidase) de 150-175 resíduos, enquanto que, nas pilinas do T4bP a sequência

líder e a sequência da pilina madura são maiores (15-30 resíduos e 180-200 resíduos, respectivamente) [20] (**Figura 7**). As pilinas do T4aP após a clivagem do peptídeo sinal frequentemente são metiladas no seu resíduo N-terminal fenilalanina (Phe) altamente conservado, mas o resíduo metilado não é conservado nas pilinas do T4bP (**Figura 7C**). Tanto o T4aP como o T4bP estão associados em funções como aderência em superfícies bióticas e abióticas, a auto-agregação, a formação de biofilme e receptor de fagos [20,31], enquanto que, a motilidade twitching é só atribuído ao T4aP [39].

Atualmente existem várias estruturas disponíveis das pilinas do T4P, todas mostrando uma arquitetura similar que lembra um pirulito (lollipop) (**Figura 7A**), formada por uma região N-terminal de aproximadamente 53 resíduos formando uma α -hélice estendida ($\alpha 1$), a qual forma um core hidrofóbico durante a montagem do pilus, e um domínio globular variável que providencia específicas interfaces de interação entre as subunidades e é a região que define a superfície exposta do pilus [8,20]. A hélice $\alpha 1$ pode ser dividida em duas regiões: a região $\alpha 1$ -N, que se estende fora do domínio globular C-terminal e ancora este domínio na membrana interna antes da polimerização do pilus, e a região $\alpha 1$ -C, que está enterrada no domínio globular da pilina (**Figura 7A**). O domínio globular está formado por uma folha β com 4-7 fitas antiparalelas flanqueado por duas regiões que mostram uma variável sequência, tamanho e estrutura denominadas $\alpha\beta$ -loop, que conecta a hélice $\alpha 1$ com a folha β , e a região D, que é adjacente à folha β e é delimitado por conservadas cistinas [8] (**Figura 7B**). São estas regiões que geram um pilus com características únicas e com específicos parceiros de interação e funções [83].

Figura 7. Diferenças entre as pilinas do T4P. As pilinas do T4P são caracterizadas por seu conservado N-terminal α -hélice (ciano) conectada a um folha β (cinza) pelo $\alpha\beta$ -loop (magenta). O N-terminal α -hélice é dividido em dois subdomínios, o $\alpha 1$ -N (resíduos 1-28) e o $\alpha 1$ -C (resíduos 29-52), como indicado para estrutura da pilina maioritária de *N. gonorrhoeae*, PilE. Na maioria das pilinas dois resíduos de cistinas formam uma ponte dissulfeto formando uma região variável chamada região D (em verde). **A)** Pilinas maioritárias do T4aP em *N. gonorrhoeae* (PilE) e em *P. aeruginosa* (PilA), estão formadas pela região N-terminal α -hélice em forma de "S" seguida por uma continua folha β antiparalela. A arquitetura das regiões $\alpha\beta$ -loop e a região D são amplamente variáveis apresentando definidas estruturas secundárias. **B)** Pilinas do T4bP em *V. cholerae* (TcpA) e *E. coli* enterro-patogênica (BfpA), possuem um enovelamento diferente das pilinas do T4aP com fitas β descontínuas formando uma folha β . A região D está embutido na proteína, com a região C-terminal formando a última fita da folha β , além disso, a região $\alpha\beta$ -loop contém uma hélice α orientada 90° respeito a $\alpha 1$. **C)** Alinhamento da sequência do peptídeo líder e dos primeiros 43 resíduos N-terminais de representativas pilinas do T4aP e T4bP, o alinhamento foi baseado no sitio de clivagem da prepilin peptidase (marcado com uma seta). A caixa em vermelho representa o resíduo que é metilado após clivagem do peptídeo sinal, sendo o resíduo Phe (F) conservado nas pilinas do T4aP. O resíduo número 5 Glu (E) também é conservado e importante para a montagem do pilus. Ng: *Neisseria gonorrhoeae*, Nm: *N. meningitidis*, Pa: *Pseudomonas aeruginosa*, Xac: *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, Mx: *Myxococcus xanthus*, ETEC: *Escherichia coli* enterro-toxigênica, Vc: *Vibrio cholerae*, EPEC: *E. coli* enterro-patogênica, Se: *Salmonella enterica*. Imagem elaborada pelo autor.

Os T4P também podem ser diferenciados pela organização dos seus genes no genoma (**Figura 8**). Os genes do T4aP estão agrupados em pequenos clusters espalhados pelo genoma com a exceção de bactérias Gram positivas, nas quais todos os genes estão agrupados em um único loci [88]. Em *P. aeruginosa* aproximadamente 40 genes são requeridos para a correta montagem e funcionamento do T4aP. Alguns destes genes codificam para componentes estruturais da maquinaria do T4P (T4P core machine) enquanto outros regulam a biogêneses do pilus ou vias quimio-sensoriais que controlam a atividade em resposta a sinais ambientais [18]. Por outro lado, os genes que codificam para a maquinaria de biossíntese do T4bP incluindo o gene que codifica a pilina que forma o pilus estão agrupados em um operon [88] e compreende em torno de doze genes (entre 11-14 genes) os quais são suficientes para a biossíntese do pilus [31]. Além disso, a presença do cluster gênico *pilMNOPQ* (componente da maquinaria de biossíntese do T4P) está associado ao T4aP mas não ao T4bP [39].

Type IVa pili

Figura 8. Distribuição e organização dos genes do T4P entre os diferentes grupos de bactérias. Os genes com as mesmas cores codificam proteínas com similar função. Os genes conservados da maquinaria biosintética do T4P encontrados em Gram-negativas estão identificados: pilina maioritária (pilE/pilA →), as pilinas minoritárias (→), a prepilin peptidase (pilD→), o motor ATPase de polimerização (pilF/pilB→), o complexo de membrana interna (pilM→ pilN→ pilO→ pilP→) e o complexo de membrana externa o secretina (pilQ→). Os genes marcados com asterisco (*) tem sido descritos como não necessários para biosíntese do T4P e inclui genes housekeeping não relacionados com o T4P como yggS (→), yacG (→), coaE (→), ispG (→), yfgB (→), ponA (→), aroK (→) e aroB (→). Coma finalidade de uma maior clareza, os cluster de genes do T4aP foram organizados em base ao genoma de *Neisseria meningitidis* mostrado no topo da figura. As bactérias Gram-positivas (Filo Formicute) possuem também genes que codificam o T4aP, mas a diferença com as bactérias Gram-negativas, estão agrupados em um cluster. Os genes que decodificam para o T4bP também estão agrupados em um cluster e difere do T4aP, entre outras diferenças, por não possuir o cluster gênico pilMNOPQ. Figura adaptada de referência [88].

1.6 Arquitetura do pilus tipo IV (T4P)

Os T4P são nanomaquinas moleculares relacionados ao sistema de secreção tipo II (T2SS), que translocam proteínas enoveladas do periplasma ao meio extracelular. Os T4P também são relacionados ao sistema flagelar de arqueas [89]. A biossíntese do pilus é coordenado e catalisado por um complexo multiproteico altamente conservado entre os diversos grupos bacterianos. Este complexo atravessa a membrana interna, o periplasma e a membrana externa bacteriana [90] (**Figura 9**) e pode ser dividido em 4 subcomplexos: i) o complexo de membrana externa ou secretina, ii) o pilus, iii) o complexo de membrana interna ou plataforma de biossíntese e iv) os complexos energéticos ou motores do sistema.

O complexo de membrana externa inclui a PilQ, uma proteína multimérica (12 cópias) que forma um poro o qual serve como porta de passagem do pilus durante a sua polimerização e despolimerização [91], e a pilotina PilF quem promove a localização e multimerização de PilQ [92]. Outras proteínas como TsaP, em *N. gonorrhoeae* e *M. xanthus*, e FimV, em *P. aeruginosa*, também forma parte do complexo de membrana externa permitindo a ancoragem de PilQ na parede de peptidoglicano [93,94].

Um segundo complexo estaria composto pelo pilus formado por um polímero helicoidal da pilina maioritária PilA e por pilinas minoritárias (PilE, PilV, PilW, PilX PilY1 e PilY2) importantes para a formação da base e da ponta do pilus [18]. As pilinas são sintetizadas como pre-pilinas, e possuem no seu extremo N-terminal um peptídeo sinal classe III, que permite a sua translocação através da membrana interna via o sistema Sec [95]. Antes de ser adicionadas ao pilus, o peptídeo sinal das pre-pilinas são removidos e posteriormente metiladas no seu N-terminal por PilD, uma prepilin peptidase [96]. O pilus é polimerizado a partir de um pool de monômeros de pilinas ligadas à membrana interna e são mantidas juntas no core do pilus via interações hidrofóbicas entre o conservado segmento N-terminal helicoidal ($\alpha 1$) das pilinas [97] (**Figura 7A**) que também inclui resíduos polares conservados importantes para a formação de pontes salinas, como o resíduo invariável Glu (na posição 5) (**Figura 7B**), essenciais para a montagem e função do pilus [98]. Não todas as pilinas minoritárias são requeridas para a biogênese do pilus, como foi observado para FimT em *P. aeruginosa* [99], e PilX, ComP e PilV em *N. meningitidis* [100]. Por outro lado, as pilinas minoritárias tem sido descritas como importantes para o início da polimerização do pilus [101] e para modular importantes funções como adesão, agregação e captação de DNA extracelular [102,103].

Para as pilinas serem montadas na base do pilus em crescimento requerem do complexo de membrana interna ou plataforma de montagem formado pelas proteínas de

membrana interna PilC, PilN, PilO, PilP e pela proteína citoplasmática PilM [104,105]. A PilP, uma lipoproteína periplasmática com uma região N-terminal desestruturada seguida por um domínio β -sandwich, conecta os complexos de membrana interna e externa através das suas interações com as regiões globulares periplasmáticas do complexo PilN-PilO [106] e com as subunidades do anel de PilQ [104]. Em *M. xanthus*, nocautes em *pilP* acelera a degradação de PilM, PilN e PilO e causa a perda da localização de PilC [82]. A proteína citoplasmática PilM faz parte da plataforma de montagem via a sua interação com a curta região N-terminal citoplasmática desestruturada de PilN [107], e junto com os domínios citoplasmáticos de PilC conecta a plataforma de montagem com os complexos energético citoplasmáticos constituídos pelos motores ATPásicos PilB e PilT [105]. A estrutura da maquinaria do T4P de *M. xanthus* resolvida por tomografia crio-eletrônica (cryo-electron tomography) com uma resolução de 3-4 nm, mostra que todos os componentes da maquinaria do T4P, com a exceção de PilC (proteína dimérica) e os motores energéticos (hexâmeros), formam anéis com 12 subunidades de cada componente que se conectam um com outro, criando uma estrutura integrada e flexível que se expande através do envelope celular [90] (**Figura 9B**).

A energia requerida para a incorporação das subunidades das pilinas durante polimerização ou extensão do pilus é fornecido por PilB, enquanto que a outra ATPase, PilT (algumas espécies apresentam também uma outra ATPase chamada PilU), estimula a remoção das subunidades do pilus durante a despolimerização ou retração do pilus [108]. Ambas as ATPases, PilB e PilT, apresentam estruturas hexaméricas associadas à face citosólica da membrana interna, e são responsáveis pelo funcionamento dos ciclos de polimerização e retração do T4P, respectivamente. A principal diferença entre PilB e PilT é a presença de aproximadamente uns 200 resíduos no extremo N-terminal de PilB, os quais estão ausentes em PilT. Esta região N-terminal é conservada entre as ATPases responsáveis pela biossíntese do pilus T4P assim como nas ATPases do T2SS. Este domínio tem sido observado em XpsE (homólogo de PilB) e está envolvido na interação com o domínio citoplasmático de EpsL no T2SS (domínio homólogo a PilM em T4P) [109]. Os ciclos de polimerização e despolimerização do pilus são importantes para vários processos biológicos, como na motilidade twitching e no processo de autotransformação [80], mas os mecanismos moleculares que regulam a polimerização e despolimerização do pilus ainda são poucos conhecidos.

Figura 9. Arquitetura da maquinaria do pilus tipo IV. **A)** O T4P é composto majoritariamente por subunidades da pilina maioritária PilA (A) depois de ter sido processada pela pre-pilin peptidase PilD (D). A polimerização do pilus é dependente da ATPase hexamérica, PilB (B), que junto com o complexo de membrana interna (IM) PilC (C), PilM (M), PilN (N) e PilO (O) trabalham incorporando PilA na base do pilus em crescimento. Na despolimerização ou retração do pilus participam as ATPases hexamérica PilT (T) e/ou PilU (não mostrado). Durante a polimerização e despolimerização o pilus passa através da secretina docecamérica PilQ (Q) localizada na membrana externa (OM). A oligomerização e localização de PilQ é dependente de PilF (F) O PilP (P) conecta o complexo de membrana interna com a secretina na membrana externa criando uma estrutura integrada. **B)** Modelo da arquitetura do T4P de *Myxococcus xanthus* resolvido por tomografia crio-eletrônica mostrando os PDB das estruturas cristalográficas usados para modelar a densidade eletrônica encontrada. Adaptado das referências [82,90].

1.7 Modelos de biogênese do T4P.

Pouco se conhece de como as pilinas são extraídas da membrana e como os componentes da maquinaria do T4P trabalham juntos para dirigir a polimerização (e subsequentemente a despolimerização) do pilus [28]. Diferentes modelos têm sido propostos com a finalidade de explicar este processo baseados em conhecidas estruturas helicoidais do filamento. O modelo de pistão (**Figura 10**) é baseado na estrutura cristalográfica e de microscopia crio-eletrônica (Cryo-electron microscopy, cryo-EM) da pilina do T4P de *N gonorrhoeae*. Neste mecanismo quimo-mecânico, as mudanças conformacionais da ATPase hexamérica PilB durante a ligação e hidrólise do ATP induzem o movimento de PilC como um pistão (MBP, membrane binding partner) deslocando 10,5 Å para acima a base do pilus em crescimento permitindo a incorporação de uma nova subunidade de PilA na espaço criado [110].

Figura 10. Modelo de pistão. As pilinas são solubilizadas na membrana interna (IM) por interações hidrofóbicas entre a bicamada lipídica e a região N-terminal da hélice $\alpha 1$ ($\alpha 1$ -N). A adição de uma subunidade ao filamento em crescimento é favorecida pelas interações hidrofóbicas entre os resíduos da hélice N-terminal ($\alpha 1$ -N) e em parte pela formação de uma ponte de hidrogênio entre o resíduo altamente conservado E_5 (-) da subunidade a ser adicionada (n) com o grupo α -amino da F_1 (+) da subunidade já inserida na posição n+1. A base do filamento é composta por três fitas que se enroscam para formar uma estrutura 3-helix bundle. Desta forma, há três sítios ativos para adicionar uma nova subunidade (n, n+3 e n+4). O mecanismo de polimerização é feito em 5 passos: 1) A subunidade da pilina maioritária, PilA, se une ao filamento em crescimento, 2) uma molécula de ATP é hidrolisada por PilB (assembly ATPase), 3) a hidrólise causa mudanças conformacionais no PilB que são transmitidas a PilC (membrane binding partner, MBP) ocasionando um movimento de pistão neste último que, 4) faz que o filamento se desloque para cima no periplasma uns 10,5 Å, e 5) A troca de ADP por ATP permite que o PilC (MBP) volte a seu estado inicial (relaxado). Este mecanismo pode ocorrer consecutivamente nos três sítios ativos. Cada fita da estrutura 3-helix bundle está colorida de uma cor, vermelho, azul e amarelo. A hidrólise de 3 ATP para a adição de 3 subunidade resulta na formação de um buraco de 31,5 Å no primeiro sítio que iria acomodar uma nova subunidade. Imagem tomada da referência [110].

Um outro modelo, chamado de rotação, foi proposto em base das mudanças conformacionais de uma das proteínas do complexo de membrana interna GspF (homólogo de PilC) no T2SS de *Klebsiella oxytoca* [98]. Neste modelo, os câmbios conformacionais de GspE (ATPase homólogo de PilB) durante a ligação e hidrólise do ATP fazem que o GspF gire, permitindo a incorporação da pilina GspG (homólogo de PilA) na base do pilus (**Figura 11**). Além disso, foram mostrados que pontes salinas formados entre resíduos carregados da região N-terminal da hélice $\alpha 1$ ($\alpha 1$ -N) da pilina são importantes para a biossíntese e a estabilidade do pilus [98]. O modelo de rotação é o mais aceito até agora e tem sido também proposto por Chang Y. et al [90], baseado na estrutura da maquinaria do T4P de *M. xanthus* resolvido por tomografia crio-eletrônica (cryo-electron tomography, cryo-ET). Neste modelo todos os componentes da maquinaria do T4P estão interligados e o único componente livre com possibilidades de rodar é PilC e potencialmente o pilus (**Figura 9B**).

Figura 11. Modelo de rotação. O esquema representa os componentes do T2SS marcados com uma letra, com a secretina D (GspD) na membrana externa, a plataforma de ensemble F (GspF), C (GspC), L (GspL) e M (GspM) na membrana interna, e a ATPase do sistema E (GspE) no lado citoplasmático da membrana interna. O mecanismo de polimerização é feito em 6 passos: (1) a pilina majoritária G (GspG) em verde é dirigida até as pilinas minoritárias HIJK (em rosa), as quais inicial o ensemble do pilus, e para as proteínas de ensemble E e F. Uma mutante pontual de G^{E5A} é defectiva neste passo (em branco). (2) Um segunda pilina de GspG (P) (em azul) entra na maquinaria de ensemble e interage com a pilina previamente ensamblada via contatos hidrofóbicos e eletrostáticos (signos + e -). (3) A hidrólise do ATP promove a rotação de F em complexo com o nascente pseudopilus, enrolando P no filamento e aumentando uns 10,4 Å o tamanho do filamento. (4) Top view mostrando a ATPase E (círculo em cinza com seis segmentos) e F (forma de lua crescente), rodeado pelos complexos CLM (círculos pequenos). Ciclos de ligação do ATP, hidrólise e liberação do ADP (estrela em vermelho, amarelo e branco, respectivamente) dirigem a rotação de F e o ensemble das subunidades de G na base do pilus em crescimento. (5) Depois de 3 ciclos, P+3 é extraído da membrana e estabilizados através das interações entre o seu resíduo $E5_{P+3}$ com resíduos K28 e K35 de P. (6) O seguinte passo de elongação permite que as interações entre P-P+4 estabilizem as interações entre as pilinas do T2SS já incorporadas. Imagem tomada da referência [98].

Recentemente foi proposto o modelo rotacional-pistão, no qual PilB roda sequencialmente durante os ciclos de ligação (estado fechado), hidrólise de ATP e liberação do ADP (estado aberto), induzindo o movimento de pistão e de rotação no PilC e a incorporação das pilinas na base do pilus (**Figura 12**). Isto foi proposto com base as estruturas cristalográficas dos domínios C-terminais de PilB de *Geobacter sp.*, onde PilB apresenta a estrutura hexamérica alongada com simetria de ordem 2. Neste modelo o estado dimérico de PilC encaixa com a observada simetria de ordem 2 da estrutura de PilB [111,112].

Figura 12. Modelo de rotação de PilB e PilC. **A)** O modelo hexamérico do complexo PilB-ADP (PDB:5TSG) foi alinhado ao modelo hexamérico do complexo PilB-AMP-PNP (pdb:5TSH) para sugerir o movimento que pode ocorrer de como duas subunidades fechadas (closed) se abrem (open) e duas subunidades abertas se fecham durante a troca do nucleotídeo. **B)** Modelo do mecanismo de trabalho de PilB e PilC. A rotação de PilB durante a hidrólise de ATP induzindo o movimento de pistão e a rotação de PilC. Adaptado de referência [111]

1.8 Pilus tipo IV e c-di-GMP

O bis-(3'-5')-cyclic dimeric GMP (c-di-GMP) é um segundo mensageiro ubíquo, envolvido na regulação de uma variedade de processos que são tipicamente associados com mudanças no estilo de vida em resposta a sinais ambientais em bactérias. Estes processos incluem motilidade, aderência, biossínteses de exopolissacarídeos (EPS), formação de biofilme, virulências e progressão do ciclo celular, sendo os níveis intracelulares de c-di-GMP quem estimula estas características [113,114].

O c-di-GMP é produzido a partir de duas moléculas de GTP por proteínas que contêm domínios GGDEF com atividade diguanilato ciclase (DGC) e degradado a pGpG ou GMP por proteínas com atividade fosfodiesterase (PDE) que possuem o domínio EAL ou HD-GYP [115,116]. Também, tem sido identificados várias classes de receptores de c-di-GMP incluindo domínios EAL e GGDEF inativos [117,118], sítios alostéricos em domínios GGDEF [115], domínios PilZ [119], riboswitches [120], entre outros [113,116], todos eles envolvidos na regulação das diversas características bacterianas como patogenicidade, motilidade, formação de biofilme, entre outros [114,121] (**Figura 13**).

Figura 13. Componentes das vias de sinalização de c-di-GMP. A nível celular, a concentração de bis-(3'-5')-cyclic dimeric GMP (c-di-GMP) é determinada pela ação de proteínas di-guanilato ciclase que levam um domínio GGDEF catalítico (verde) e fosfodiesterase que levam um domínio EAL ou HD-GYP catalítico (laranja). Estas enzimas são tipicamente controladas por sinais internas ou externas que são sentidas diretamente ou indiretamente por domínios sensores (não mostrado). Através de interações com diferentes receptores, tais como proteínas contendo um domínio PilZ ou EAL não catalítico (amarelo), o c-di-GMP modula negativamente a motilidade celular e características associadas com a virulência e estimula várias funções associadas a biofilme, como a expressão de fímbrias e outras adesinas e a expressão de uma matriz exopolissacarídica. Duas moléculas de GTP são necessárias para a formação de uma molécula de c-di-GMP, por outro lado, a hidrólise de c-di-GMP gera pGpG (5'-phosphoguanylyl-(3'-5')- guanosine) ou GMP. Adaptado da referência [114].

O c-di-GMP desempenha um papel chave na transição entre o estilo de vida móvel explorando o ambiente aquoso e a vida sésil em comunidades de biofilme, processos nos quais tem sido observado que o T4P participa ativamente [122]. Os mecanismos moleculares de como c-di-GMP regula estes processos ainda não estão esclarecidos. Em *P. aeruginosa* e *Xanthomonas* sp. a biossíntese e função do T4P requer de uma proteína receptora de c-di-GMP chamada FimX (**Figura 14A e B**) [123,124], e foi proposto para *P. aeruginosa* que a ligação de c-di-GMP poderia mediar a localização polar de FimX e a sua interação com algum parceiro de interação [125]. Recentemente, foi mostrado que algumas ATPases que controlam a biossínteses do T4P em *V. cholerae* (MshE) e em *C. difficile* (PilB2) são capazes de ligar c-di-GMP (**Figura 14C**) e mutações nos resíduos importantes para a ligação afeta drasticamente a função do T4P [126–128]. Mutações pontuais nos resíduos importantes para a ligação de c-di-GMP em MshE afeta a montagem do pilus, a aderência ao hospedeiro e a formação de biofilme em *V. cholerae* [126,128]. Por outro lado, também tem sido observado que c-di-GMP pode regular diretamente os níveis de transcrição dos genes do T4P, incluindo a pilina maioritária e a ATPase PilB, em *C. difficile* [129] e *M. xanthus* [130].

Figura 14. Estruturas cristalográficas de proteínas receptoras de c-di-GMP envolvidas na biossíntese do T4P. A) e B) Domínio EAL de FimX de *P. aeruginosa* (PDB:3HV8) e *X. citri* subsp. *citri* (PDB: 4FOK) em complexo de c-di-GMP. C) Domínio N-terminal da ATPase MshE, do sistema MshA-T4P em *V. cholerae*, em complexo com c-di-GMP (PDB:5HTL). Imagem elaborada pelo autor.

1.9 Regulação da biossíntese do T4P

A regulação da polimerização e despolimerização do T4P é centrada nos motores ATPásicos, PilB e PilT, que fornecem a energia para estes processos e ambas as ATPases pertence à família AAA ATPases (ATPases associated with diverse cellular activities) [131]. São de muito interesse e ainda pouco conhecido os mecanismos que regulam e controlam a formação do pilus através da atividade de PilB. Os diferentes organismos modelos nos

quais o T4P tem sido estudado incluindo *P. aeruginosa*, *Neisseria sp.*, *M. xanthus*, *V. cholerae* e *Synechocystis sp.* possuem complexos mecanismos de regulação com características únicas [28]. Por exemplo em *M. xanthus* o sistema quimo-sensorial Frz, e as proteínas MglA, SofG e BacP controlam a motilidade e a localização polar de PilB e PilT [132]. Por outro lado, em *P. aeruginosa* a função de ATPases do T4P é dependente das proteínas ChpA, PilG e PilH pertencentes ao sistema quimosensor Chp [133] e sua localização subcelular é dependente do contato com a superfície e da proteína MreB [134]. Outras duas proteínas, PilZ e FimX (**Figura 15**), tem sido descritas como reguladores do funcionamento do T4P em *X. citri* [21,135] e *P. aeruginosa* [40,136].

Figura 15. Organização dos domínios de FimX_{XAC2932}, PilZ_{XAC1133} e PilB_{XAC3239} de *X. citri*. Os números indicam a posição dos aminoácidos que conformam os domínios. Imagem elaborada pelo autor como descrito na referência [137].

PilZ pertence a um amplo grupo de proteínas com baixa similaridade de sequência que ligam o segundo mensageiro bacteriano c-di-GMP [119,138]. Interessantemente, PilZ de *X. citri* (XAC1133) e de *P. aeruginosa* (PA2960) pertencem a um subgrupo de PilZ (denominado grupo de ortólogos XAC1133/PA2960) que não possuem os motivos RxxxR ou D/NxSxxG envolvidos na ligação de c-di-GMP. Porém, este grupo apresenta cinco motivos altamente conservados (MI – MV) que correspondem aos seguintes resíduos em PilZ_{XAC1133}: L₂₁Y₂₂XXY₂₅M₂₆P₂₇F₂₈XXXG₃₂G₃₃(I/L)₃₄F₃₅(V/I)₃₆XT₃₈ (MI), G₆₅XV₆₇XW₆₉XXP₇₂ (MII), G₈₂(I/V)₈₃G₈₄(I/V)₈₅ (MIII), (R/K)₉₇XXI₁₀₀E₁₀₁XXL₁₀₄ (MIV) e S₁₁₀XXXT₁₁₄- xT₁₁₆ (MV) (**Figura 16B**) e dentro de estes motivos se observam resíduos aromáticos e hidrofóbicos altamente conservados [137] (**Figura 16C**). Além disso, nocautes do gene *pilZ* ou mutações pontuais nos resíduos conservados em diferentes bactérias produzem mudanças em diferentes fenótipos. Por exemplo em *P. aeruginosa*, perde a motilidade twitching pelo bloqueio da

montagem do T4P [136], em *X. citri* se observa uma diminuição no movimento twitching, um aumento na dispersão das células em meio semi-sólido e reduzida formação do biofilme [21,137], em *X. campestris* pv. *campestris* reduz a motilidade e a virulência [139] e em *N. meningitidis* foi observada uma diminuição na formação de agregados bacterianos sem afetar a biogênese do pilus [100].

Figura 16. Estrutura e resíduos conservados em PilZ_{XAC1133}. **A)** Modelo em cartoon da estrutura cristalográfica de PilZ de *X. citri* (PDB: 3CNR). **B)** Modelo em surface de PilZ mostrando os motivos MI-MIV em cores amarelo, verde, magenta e azul respectivamente. O motivo MV se encontra na região C-terminal desestruturada, pelo que não foi modela na estrutura de PilZ. **C)** Resíduos aromáticos e hidrofóbicos conservado dentro dos motivos de PilZ são mostrados em vermelho. Imagem adaptada da referência [137].

FimX é uma proteína modular que contém quatro domínios implicados em dar uma resposta a sinais ambientais conhecidos como REC, PAS, GGDEF e EAL (**Figura 15**). O domínio N-terminal REC (phosphoreceptor) carece do resíduo conservado Asp requerido para sua fosforilação, e é importante para a localização polar e a dimerização de FimX em *P. aeruginosa* [40,140,141]. O domínio PAS (Per/ARNT/Sim) é amplamente encontrado em diversas proteínas de sinalização promovendo interações proteína-proteína ou transferência de sinais assim como também sentindo diretamente os estímulos percebidos, além de possuir uma estrutura tridimensional conservada mas com uma alta divergência na sua sequência primária [142,143]. Alguns domínios PAS podem ligar cofatores tais como íons, heme e nucleotídeos [144]. A função do domínio PAS em FimX e/ou seu ligante ainda são desconhecidos. Os domínios GGDEF e EAL pertencem a um grupo de enzimas com atividade diguanilato ciclase (DGC) e fosfodiesterase (PDE) respectivamente, mas ambos os domínios em FimX carecem de atividade enzimática *in vitro* [141]. O domínio EAL de FimX (FimX_{EAL}) foi identificado como receptor de alta afinidade para o segundo mensageiro c-di-GMP (**Figura 14A e B**) e a sua ligação induz mudanças conformacionais no extremo N-terminal do FimX de *P. aeruginosa* (no domínio REC e no adjacente linker

entre os domínios REC e PAS) [125]. A localização subcelular de FimX em *P. aeruginosa* é principalmente unipolar e mutações nos seus resíduos conservados (EVL→AAA, domínio EAL) importantes para a ligação de c-di-GMP induz uma localização bipolar [123,145]. Além disso, também foi observado que a localização unipolar de FimX permite à bactéria realizar twitching movendo-se unidirecionalmente (consistente com a montagem do T4P em um dos polos). Por outro lado, quando a localização de FimX é bipolar a bactéria não se move e oscila numa posição fixa, que é uma resposta a disponibilidade de nutrientes no meio [146]. Em *X. oryzae* pv. *oryzae*, nocaute da proteína Filp (homólogo de FimX) resulta na redução de virulência e redução dos níveis da expressão dos genes do sistema de secreção tipo 3 (T3SS) [60], enquanto que, em *X. citri* subsp. *citri*, o nocaute de FimX afeta a motilidade twitching, a formação de biofilme, a aderência ao hospedeiro e as cepas mostram resistência a infecção pelo bacteriófago ΦXacm4-11 [21].

Ambas as proteínas FimX (domínio EAL) e PilZ podem formar um complexo estável *in vitro* em *X. citri* subsp. *citri* [135,137], *X. campestris* pv. *campestris* [147] e *X. oryzae* pv. *oryzae* [60] (**Figura 17**), enquanto que, interações entre FimX e PilZ de *P. aeruginosa* não tem sido observadas [148]. A formação deste complexo é independente da presença ou ausência de c-di-GMP [135,148], e as estruturas cristalográficas do complexo entre PilZ e o domínio EAL de FimX na presença de c-di-GMP (PilZ-FimX_{EAL}-c-di-GMP) de *X. citri* subsp. *citri* e *X. campestris* pv. *campestris* tem sido resolvidas [135,147].

Figura 17. Estrutura do domínio EAL de FimX em complexo com c-di-GMP e PilZ de *X. citri*. Modelo em cartoon do complexo PilZ-FimX_{EAL}-c-di-GMP (PDB:4FOU). O domínio EAL apresenta um modificado barril TIM (verde), c-di-GMP (vermelho) e PilZ (azul). Imagem elaborada pelo autor.

Além de interagir com FimX, PilZ também interage com a ATPase PilB e a formação um complexo ternário entre FimX-PilZ-PilB foi observado em *X. citri* subsp. *citri* por ensaios de far-Western, sendo PilZ importante para a formação deste complexo [137]. Foi proposto que FimX poderia transmitir sinais extra e/ou intracelulares via PilZ para PilB regulando a sua atividade enzimática e biossínteses do pilus [137] (**Figura 18**). A natureza destas interações ainda permanece desconhecidas, assim como o papel de c-di-GMP na formação do complexo ternário. Sabemos somente que as interações entre PilZ e PilB são mediadas em parte pelos dez últimos resíduos desestruturados altamente conservados de PilZ (motivo MV), os quais não são importantes para a interação com FimX e não foram observados na estrutura cristalográfica do complexo PilZ-FimX_{EAL}-C-di-GMP [135] (**Figura 17**). Por outro lado, em *P. aeruginosa*, tem sido observado interações entre FimX e PilB, e a ausência de PilZ não afeta a formação deste complexo [145], mostrando pela primeira vez interação direta entre FimX e PilB. Interessantemente, na cepa de *P. aeruginosa* nocaute em *fimX*, o ensamble do T4P e a formação de biofilme é restaurado em altas concentrações intracelulares de c-di-GMP [33].

Figura 18. Modelo de interação de FimX e PilZ com a maquinaria de ensamble do T4P em *X. citri*. O modelo mostra que PilZ (Z) interatua com o domínio EAL FimX e com PilB (B), atuando provavelmente como uma ponte, permitindo a transmissão de sinais captadas diretamente pelos domínios de FimX ou por interações com outra proteína (?). Estas interações poderiam regular a atividade ATPase de PilB e/ou as suas interações com os outros componentes de maquinaria do T4P como PilM (M) e PilC (C), estimulando a polimerização do pilus. Na figura não se mostra os outros componentes de membrana interna (IM) da maquinaria do T4P como PilO, PilP. Imagem elaborada pelo autor.

2 Objetivos

O trabalho aqui descrito teve como objetivo geral estudar os mecanismos moleculares que regulam a biossíntese do pilus tipo IV em *Xanthomonas citri* subsp. *citri* com foco especial na ATPase PilB e seus parceiros PilZ e FimX. Para isto propusemos os seguintes objetivos específicos:

- Identificar o (s) domínio (s) de PilB que interagem com PilZ.
- Identificar os possíveis parceiros de interação de FimX.
- Estudar por técnicas biofísicas, bioquímicas e funcionais as interações entre PilB, PilZ e FimX na presença dos seus ligantes.
- Observar a localização subcelular de PilB, PilZ e FimX.
- Empregar cristalografia e microscopia eletrônica para estudar os complexos formados entre PilB, PilZ e FimX.

3 Materiais e métodos

3.1 Cepas utilizadas e meios de cultivo

Todas as cepas de *Xanthomonas citri* (**Tabela 2**) usadas neste trabalho foram derivadas da cepa selvagem *Xanthomonas citri* strain 306 (Xac) [12]. A cepa de *Saccharomyces cerevisiae* e as cepas *Escherichia coli* usadas neste trabalho estão listadas na **Tabela 2**. As cepas de *X. citri* e *E. coli* foram rotineiramente crescidas sob agitação a 30 e 37°C respectivamente, a 200 r.p.m em meio 2xTY (**Tabela 1**) suplementado ou não com o antibiótico requerido. A cepa de *S. cerevisiae* foi crescida em meio YAPD-agar ou SC-agar a 30 °C segundo o requerido. Modificações no meio SC foram feitas pela eliminação de um ou de alguns dos aminoácidos: SC-W (SC sem triptofano), SC-L (SC sem leucina), SC-WH (SC sem triptofano e histidina), SC-WHA (SC sem triptofano, histidina e adenina), SC-WHAL (SC sem triptofano, histidina, adenina e leucina).

Os antibióticos, quando necessários, foram usados nas seguintes concentrações:

- Ampicilina: 100 µg/mL
- Kanamicina: 40 µg/mL
- Gentamicina: 10 µg/mL
- Cloranfenicol: 50 µg/mL

Tabela 1. Meios de Cultura

Meio de cultura	Composição
2xTY	16 g/L triptona, 10 g/L extrato de levedura, 5 g/L NaCl. 1,5 % ágar (quando meio sólido) pH 7.4
LB	10 g/L Triptona, 5 g/L extrato de levedura, 10 g/L NaCl. 1,5 % ágar (quando meio sólido) pH 7.5
Meio mínimo	6 g/L Na ₂ HPO ₄ , 3 g/L KH ₂ PO ₄ , 0.5 g/L NaCl, 2 mM MgSO ₄ , 0.4 % glicose, 100 mM CaCl ₂ , 1 g/L NH ₄ Cl. pH 7.35
YAPD	10 g/L extrato de levedura, 20 g/L peptona, 2 g/L glicose, 0.08 g/L adenina. 1.6 % de ágar (quando meio sólido)
YPD	10 g/L extrato de levedura, 20 g/L peptona, 2 g/L glicose. 1.6 % de ágar (quando meio sólido)
SC	0,66 % de Base nitrogenada de levedura sem aminoácido, 2 % de glicose, 2 % de mix de aminoácidos (300 mg de isoleucina, 1500 mg de valina, 200 mg de arginina, 300 mg de lisina, 200 mg de metionina, 500 mg de fenilalanina, 200 mg de treonina, 300 mg de tirosina, 200 mg de uracila, 1000 mg de ácido glutâmico, 4000 mg de serina, 1000 mg de ácido aspártico, 18 mg de adenina, 60 mg de leucina, 12 mg de histidina e 12 mg de triptofano). 1,6 % de ágar (quando meio sólido) pH 5.8
KB	20 g/L peptona, 1.5 g/L K ₂ HPO ₄ , 15 mL/L glicerol, 1.5 g/L MgSO ₄ , 2 mM CaCl ₂ . 1 % de ágar (quando meio sólido) pH 7.0

Tabela 2. Linhagens utilizadas neste trabalho

Linhagens	Características	Referencia
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	F ⁻ ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(r _K ⁻ , m _K ⁺) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ ⁻	Invitrogen
BL21 (DE3)	F ⁻ dcm ompT hsdS(r _B ⁻ m _B ⁻) gal λ (DE3)	Novagen
BL21 (DE3) Star	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ , m _B ⁻) gal dcm rne131 (DE3)	Novagen
BL21 (DE3) RIL	F ⁻ ompT hsdS(r _B ⁻ m _B ⁻) dcm ⁺ Tet ^R gal endA Hte [argU ileY leuW Cam ^R]	Stratagene
BL21 (DE3) RP	F ⁻ ompT hsdS(r _B ⁻ m _B ⁻) dcm ⁺ Tet ^R gal λ (DE3) endA Hte [argU proL Cam ^R]	Stratagene
ArcticExpress (DE3)	F ⁻ ompT hsdS(r _B ⁻ m _B ⁻) dcm ⁺ Tet ^R gal λ (DE3) endA Hte [cpn10 cpn60 Gent ^r]	Agilent
XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI ^q Z Δ M15 Tn10 (Tet ^R)]	Stratagene
XL10-Gold	Tet ^R Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI ^q Z Δ M15 Tn10 (Tet ^R) Amy Cam ^R]	Stratagene
KC8	hsdR, leuB600, trpC9830, pyrF::Tn5, hisB463, lac Δ X74, strA, galU,K	Clonetech
Cy BL21 (DE3) pLys	W3110 tnaA2 Δ trpEA2	[149]
<i>Xanthomonas citri</i> (Xac)		
Xac_Wt (Xac str.306)	Linhagem selvagem (Wt), Ap ^R	[12]
Xac_ΔpilA	Xac str. 306 com o gene pilA _{XAC3241} nocauteado, Ap ^R	[21]
Xac_ΔfimX	Xac str. 306 com o gene fimX _{XAC2398} nocauteado, Ap ^R	[137]
Xac_ΔpilB	Xac str. 306 com o gene pilB _{XAC3239} nocauteado, Ap ^R	Este trabalho
Xac_ΔpilZ	Xac str. 306 com o gene pilZ _{XAC1133} nocauteado, Ap ^R	[137]
Xac_ΔpilM	Xac str. 306 com o gene pilM _{XAC3385} nocauteado, Ap ^R	Este trabalho
Xac_ΔpilC	Xac str. 306 com o gene pilC _{XAC3242} nocauteado, Ap ^R	Este trabalho
Xac_ΔpilT	Xac str. 306 com o gene pilT _{XAC2924} nocauteado, Ap ^R	[21]

Xac_msfGFP-FimX_WT	Xac str. 306 com uma inserção cromossômica do gene <i>msfgfp</i> no extremo N-terminal do gene <i>fimX</i> _{XAC2398} , Ap ^R	Este trabalho
Xac_msfGFP-FimX_Δ<i>pilZ</i>	Xac str. 306 com uma inserção cromossômica do gene <i>msfgfp</i> no extremo N-terminal do gene <i>fimX</i> _{XAC2398} e com o gene <i>pilZ</i> _{XAC1133} nocauteado, Ap ^R	Este trabalho
Xac_msfGFP-FimX_Δ<i>pilB</i>	Xac str. 306 com uma inserção cromossômica da sequência modificante do msfGFP no extremo N-terminal do <i>FimX</i> _{XAC2398} e com o gene <i>pilB</i> _{XAC3239} nocauteado, Ap ^R	Este trabalho
Xac_msfGFP-FimX_Δ<i>pilM</i>	Xac str. 306 com uma inserção cromossômica do gene <i>msfgfp</i> no extremo N-terminal do gene <i>fimX</i> _{XAC2398} e com o gene <i>pilM</i> _{XAC33859} nocauteado, Ap ^R	Este trabalho
Xac_msfGFP-FimX_{R534A}	Xac str. 306 com uma inserção cromossômica do gene <i>msfgfp</i> no extremo N-terminal do gene <i>fimX</i> _{XAC2398} e com uma mutação pontual R534A, Ap ^R	Este trabalho
Xac_msfGFP-FimX_ΔREC	Xac str. 306 com uma inserção cromossômica do gene <i>msfgfp</i> no extremo N-terminal do gene <i>fimX</i> _{XAC2398} e deleção no domínio REC, Ap ^R	Este trabalho
Xac_msfGFP-FimX_ΔPAS	Xac str. 306 com uma inserção cromossômica do gene <i>msfgfp</i> no extremo N-terminal do gene <i>fimX</i> _{XAC2398} e deleção no domínio PAS, Ap ^R	Este trabalho
Xac_msfGFP-PilZ_Wt	Xac str. 306 com uma inserção cromossômica do gene <i>msfgfp</i> no extremo N-terminal do gene <i>pilZ</i> _{XAC1133} , Ap ^R	Este trabalho
Xac_msfGFP-PilZ_Δ<i>fimX</i>	Xac str. 306 com uma inserção cromossômica do gene <i>msfgfp</i> no extremo N-terminal do gene <i>pilZ</i> _{XAC1133} e com o gene <i>fimX</i> _{XAC2398} nocauteado, Ap ^R	Este trabalho
Xac_msfGFP-PilZ_Δ<i>pilB</i>	Xac str. 306 com uma inserção cromossômica do gene <i>msfgfp</i> no extremo N-terminal do gene <i>pilZ</i> _{XAC1133} e com o gene <i>pilB</i> _{XAC3239} nocauteado, Ap ^R	Este trabalho
Xac_msfGFP-PilZ_Δ<i>pilM</i>	Xac str. 306 com uma inserção cromossômica do gene <i>msfgfp</i> no extremo N-terminal do gene <i>pilZ</i> _{XAC1133} e com o gene <i>pilM</i> _{XAC33859} nocauteado, Ap ^R	Este trabalho
XacWt_msfGFP-PilB	Xac str. 306 com uma inserção cromossômica do gene <i>msfgfp</i> no extremo N-terminal do gene <i>pilB</i> _{XAC3239} , Ap ^R	Este trabalho
Xac_msfGFP-PilB_{K343A}	Xac str. 306 com uma inserção cromossômica do gene <i>msfgfp</i> no extremo N-terminal do gene <i>pilB</i> _{XAC3239} e com uma mutação pontual K343A, Ap ^R	Este trabalho
Xac_msfGFP-PilB_{K343A/E404A}	Xac str. 306 com uma inserção cromossômica do gene <i>msfgfp</i> no extremo N-terminal do gene <i>pilB</i> _{XAC3239} e com dupla mutação pontual K343A e E404A, Ap ^R	Este trabalho
Xac_msfGFP-PilB_Δ<i>fimX</i>	Xac str. 306 com uma inserção cromossômica do gene <i>msfgfp</i> no extremo N-terminal do gene <i>pilB</i> _{XAC3239} e com o gene <i>fimX</i> _{XAC2398} nocauteado, Ap ^R	Este trabalho
Xac_msfGFP-PilB_Δ<i>pilZ</i>	Xac str. 306 com uma inserção cromossômica do gene <i>msfgfp</i> no extremo N-terminal do gene <i>pilB</i> _{XAC3239} e com o gene <i>pilZ</i> _{XAC1133} nocauteado, Ap ^R	Este trabalho
Xac_msfGFP-PilB_ΔPilB_{Nt}	Xac str. 306 com uma inserção cromossômica do gene <i>msfgfp</i> no extremo N-terminal do gene <i>pilB</i> _{XAC3239} e deleção dos domínios ND0-ND1, Ap ^R	Este trabalho
Xac_msfGFP-PilB_Δ<i>pilT</i>	Xac str. 306 com uma inserção cromossômica do gene <i>msfgfp</i> no extremo N-terminal do gene <i>pilB</i> _{XAC3239} e com o gene <i>pilT</i> _{XAC2924} nocauteado, Ap ^R	Este trabalho

Xac_msfGFP-PilB_Δ<i>pilM</i>	<i>Xac</i> str. 306 com uma inserção cromossômica do gene <i>msfgfp</i> no extremo N-terminal do gene <i>pilB</i> _{XAC3239} e com o gene <i>pilM</i> _{XAC3385} nocauteado, Ap ^R	Este trabalho
Xac_msfGFP-PilB_Δ<i>pilC</i>	<i>Xac</i> str. 306 com uma inserção cromossômica do gene <i>msfgfp</i> no extremo N-terminal do gene <i>pilB</i> _{XAC3239} e com o gene <i>pilC</i> _{XAC3242} nocauteado, Ap ^R	Este trabalho
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
PJ694-a	<i>MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ</i>	James, 1996

3.2 Predição das estruturas secundárias e identificação dos domínios de PilB_{XAC3239}, FimX_{XAC2398} e PilZ_{XAC1133}

A sequência de PilB_{XAC3239} foi analisada para determinar os seus domínios estruturais utilizando as bases de dados Pfam [150] e InterPro [151]. A predição da estrutura secundária foi feita através da base de dados Phyre2 [152]. O análise e descrição dos domínios de FimX_{XAC2398} e de PilZ_{XAC1133} foram descritos previamente [135,137].

3.3 Reações de PCR, clonagem e expressão de proteínas

As reações de PCR foram feitas usando 200 ng de DNA genômico de *Xac* e 0.5 μ M do par de oligonucleotídeos *forward* e *reverse* específicos para cada gene, 200 μ M de cada dNTP (Fermentas), 3 % de DMSO, 1x High Fidelity Buffer, 0.02 U/ μ L da enzima Phusion High Fidelity DNA polimerase (Thermo Scientific) em reações de 50 μ L. Os ciclos utilizados para as reações de PCR são mostrados na **Tabela 3**. A temperatura de anelamento (T_m) para cada uma das amplificações foram calculados usando o site T_m -Calculator da Thermo Scientific (**Tabela 4, 5 e 6**). Os produtos da PCR foram analisados por eletroforeses em gel de agarose 1 % e purificados pelo kit GeneJET PCR Purification (Fermentas).

Tabela 3. Instruções dos ciclos de PCR

Ciclos	1	30			1
Etapas	Desnaturação Inicial	Desnaturação	Anelamento (T_m)	Extensão	Extensão final
Temperatura	98 °C	98 °C	X °C	72 °C	72 °C
Tempo	2-5 min	10 seg	10 seg	30 seg/kb	10 min

A **Tabela 4** mostra os oligonucleotídeos usados para obter as diferentes construções das proteínas de interesse neste estudo e as enzimas de restrição utilizadas para a clonagens de cada uma delas nos vetores de expressão: pET28a e pET3a (**Figura 19**). A **Tabela 5** mostra os oligonucleotídeos utilizados para amplificar regiões dos genes de interesse e as enzimas de restrição usadas para a clonagem dos genes no vector pOBD (**Figura 21**) para os ensaios de duplo híbrido. A **Tabela 6** mostra os oligonucleotídeos utilizados para amplificar os genes e as enzimas necessárias para a clonagem no vector pRFR047 para a complementação de *Xac* mutantes. Os fragmentos amplificados foram digeridos com suas respectivas enzimas de restrição seguindo as especificações dos fabricantes (Thermo Scientific e New England Biolabs) e ligados ao vector correspondente. As reações de ligação foram realizadas utilizando a enzima T4 DNA Ligase (Thermo

Scientific) num volume final de 20 μ L seguindo as especificações do fabricante. O produto da reação foi usado para transformar células de *E. coli* DH5 α quimio-competentes e selecionadas em meio LB-agar contendo antibiótico adequado. As colônias que cresceram foram inoculadas em meio 2xTY suplementados com antibiótico adequado e crescidas a 37°C sob agitação por 16 horas. O DNA plasmidial foi extraído utilizando o kit Plasmid Miniprep (Thermo Scientific). As confirmações dos clones positivos foram realizadas por digestão com as enzimas de restrição adequadas e por sequenciamento usando o método de Sanger através do kit ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction III (Applied Biosystem). Para as reações de sequenciamento foram utilizados oligonucleotídeos que flanqueiam as regiões de clonado (MCS: Multiple cloning site) como mostrado na **Tabela 7** e oligonucleotídeos que pareiam em regiões internas dos genes. As reações foram preparadas usando 200ng de DNA plasmidial, 1 μ L de oligonucleotídeo forward o reverse (4 pmol), 6 μ L de tampão de reação para Big Dye, 2 μ L de Big Dye Terminator e água ultrapura para um volume final de 20 μ L. As condições da reação foram: 1 ciclo de 96°C por 2 minutos e 40 ciclos de 95°C por 45 segundos, 50°C por 30 segundos, 60°C por 4 minutos. Após a reação, foi adicionado 80 μ L de isopropanol 75%, incubado por 15 minutos a temperatura ambiente e centrifugado a por 45 minutos a 4000 r.p.m. O sobrenadante foi descartado e a solução residual foi seca no termociclador a 98°C por 1 minuto. As reações foram sequenciadas no sequenciador automático ABI PRISM 3110XL GeneticAnalyser (Applied Biosystems). Para a clonagem dos genes de interesse nos vectores de co-expressão pETDuet e pRSFDuet (**Figura 20**), os insertos clonados no vector pET28a foram digeridos com as enzimas NcoI/HindIII ou NdeI/XhoI e sub-clonados nos sítio MCS1 e/ou MCS2 respectivamente dos vectores pETDuet e pRSFDuet, inseridos de tal forma que as enzimas usadas para inserir o segundo fragmento não digira o fragmento previamente clonado.

Tabela 4. Construções usadas para expressão dos diferentes fragmentos de FimX_{XAC2398}, PilZ_{XAC1133} e PilB_{XAC3239}

Construções	Enzimas de Restrição	Oligonucleotídeos (5'→3')	T _m (°C)	Tamanho (pb)	Vector	Apelido (Domínios)	Referencia
FimX ₁₋₆₈₉	NdeI BamHI	TTATCATATGCAAAAAGGCCAAAGATCTCACCC TTGGATCCTCAGCCGAAGTCGTAATTCATCAAC	62	2070	pET28a	FimX (inteira)	Este trabalho
FimX ₁₅₃₋₆₈₉	NdeI BamHI	TTATCATATGTCTCGTGACCCGATCGCCTAC TTGGATCCTCAGCCGAAGTCGTAATTCATCAAC	64	1617	pET28a	FimX _{PAS-GGDEF-EAL}	Este trabalho
FimX ₂₆₈₋₆₈₉	-				pET28a	FimX _{GGDEF-EAL}	[137]
FimX ₂₃₃₋₆₈₉	NdeI BamHI	AAAACATATGACGATGGAGTTCGCCACCGCC TTGGATCCTCAGCCGAAGTCGTAATTCATCAAC	62	1374	pET28a	FimX _{GGDEF-EAL_233-689}	Este trabalho
FimX ₂₄₅₋₆₈₉	NdeI BamHI	AAAACATATGCCATGCATCCAGGTGGTGTTC TTGGATCCTCAGCCGAAGTCGTAATTCATCAAC	64	1341	pET28a	FimX _{GGDEF-EAL_245-689}	Este trabalho
FimX ₂₅₀₋₆₈₉	NdeI BamHI	AAAACATATGGTGTTCGCGCCGCGGAGGAG TTGGATCCTCAGCCGAAGTCGTAATTCATCAAC	64	1326	pET28a	FimX _{GGDEF-EAL_250-689}	Este trabalho
FimX ₂₅₅₋₆₈₉	NdeI BamHI	AAAACATATGGAGGAGTTCGACCCGGAAC TTGGATCCTCAGCCGAAGTCGTAATTCATCAAC	60	1308	pET28a	FimX _{GGDEF-EAL_255-689}	Este trabalho
FimX ₂₆₀₋₆₈₉	NdeI BamHI	AAAACATATGGAAGTGGCGCGGAGGTCTGAAGAC TTGGATCCTCAGCCGAAGTCGTAATTCATCAAC	60	1293	pET28a	FimX _{GGDEF-EAL_260-689}	Este trabalho
FimX ₄₂₆₋₆₈₉	-				pET3a	FimX _{EAL}	[135]
FimX ₁₅₃₋₂₅₂	NdeI BamHI	TTATCATATGTCTCGTGACCCGATCGCCTAC TTGGATCCTCACCAGAACACCACTGGATGC	62	309	pET3a	FimX _{PAS}	Este trabalho
FimX ₁₅₃₋₂₇₃	NdeI BamHI,	TTATCATATGTCTCGTGACCCGATCGCCTAC TATATGGATCCTTACTGGTCGCGCTGGCG	64	372	pET3a/pET28a	FimX _{PAS_153-273}	Este trabalho
PilZ ₁₋₁₁₇	-				pET3a	PilZ (inteira)	[137]
PilZ _{Δ107-117}	-				pET3a	PilZ _{Δ107-117}	[137]
PilZ _{ΔM117}	NdeI BamHI / XhoI	CTGACATATGAGTGCAATGAATG CAGTGGATCCCTCGAGTTACGTATGCGTCGGCTTG	52	351	pET3a	PilZ _{ΔM117}	Este trabalho
PilZ _{M117G}	NdeI BamHI / XhoI	CTGACATATGAGTGCAATGAATG CAGTGGATCCCTCGAGTTAGCCCGTATGCGTCG	52	354	pET3a	PilZ _{M117G}	Este trabalho
PilB ₁₋₅₇₈	NcoI / NdeI HindIII / XhoI	AAAACCATGGTACATATGAATAGCGTCGTGACCG TTTTAAGCTTCTCGAGTTATTCGTGTCACCGAGCGCG	62	1737	pET28a	PilB (inteira)	Este trabalho

PilB ₁₋₁₉₀	NcoI / NdeI HindIII / XhoI	AAAA CCATGG TAC CATATG AATAGCGTCGTGACCG TTTT AAGCTTCTCGAG TTAGCCCTTGGCATCAACCC	62	570	pET28a	PilB ₁₋₁₉₀	Este trabalho
PilB ₁₂₋₁₆₃	NdeI HindIII	AAAA CATATG ATAACGGGCATCGCGCGTCGTC TTTT AAGCTT TTATTCGTCGTCACCGAGCGCG	62	459	pET28a	PilB ₁₂₋₁₆₃	Este trabalho
PilB ₁₅₉₋₅₇₈	NcoI / NdeI HindIII / XhoI	AAAA CCATGG TAC CATATG CTTGGTGACGACGAGGAG TTTT AAGCTTCTCGAG TTATTCGTCGTCACCGAGCGCG	60	1737	pET28a	PilB ₁₅₉₋₅₇₈	Este trabalho
PilB ₁₉₀₋₅₇₈	NdeI HindIII / XhoI	AAAA CATATG GGGAGACGACACGCCGGTGGTGAAG TTTT AAGCTTCTCGAG TTATTCGTCGTCACCGAGCGCG	62	1173	pET28a	PilB ₁₉₀₋₅₇₈	Este trabalho
PilB ₃₀₇₋₅₇₈	NdeI HindIII / XhoI	AAAA CATATG CTGGGCATCGACAAGCTG TTTT AAGCTTCTCGAG TTATTCGTCGTCACCGAGCGCG	62	819	pET28a	PilB ₃₀₇₋₅₇₈	Este trabalho

Tabela 5. Construções usada nos ensaios de duplo híbrido.

Construções	Domínios	Massa molar (kDa)	Enzimas de Restrição	Primers (5'→3')	T _m (°C)	Tamanho (pb)	Vector	Referencia
FimX ₁₋₁₆₂	REC	17.8	NcoI XhoI	TTATCCATGGTACAAAAAGGCAAAGATCTCACCC TATCTCGAGCTATTCATGCACGTAGGCGATC	62	486	pOBD	Este trabalho
FimX ₁₋₂₇₃	REC-PAS	30.6	NcoI XhoI	TTATCCATGGTATCTCGTGACCCGATCGCCTAC TATATCTCGAGTTACTGGTCGCGCTGGCG	64	819	pOBD	Este trabalho
PilB ₁₋₁₉₀	ND0-ND1	20	NcoI XhoI	AAAACCATGGTAAATAGCGTCGTGACCG TTTTCTCGAGTTAGCCCTTGCCATCAACCC	62	570	pOBD	Este trabalho
PilB ₁₅₆₋₃₀₆	ND2-ATPase	45.6	NcoI XhoI	AAAACCATGGTACTTGGTGACGACGAGGAG TTTTCTCGAGTTACTTGCCGCGCTGC	60	1272	pOBD	Este trabalho
PilB ₁₅₉₋₅₇₈	ND1-ATPase	42.6	NcoI XhoI	AAAACCATGGTACTTGGTGACGACGAGGAG TTTTCTCGAGTTATTGTCGTCACCGAGCGCG	60	1737	pOBD	Este trabalho
PilZ ₁₋₁₁₇	PilZ	12.4	- -				pOAD	[137]

Tabela 6. Construções para complementar mutantes de *X citri*.

Construções	Enzimas de Restrição	Primers (5'→3')	T _m (°C)	Tamanho (pb)	Vector	Referencia
PilZ _{ΔM117}	NcoI XhoI	CACGGATCCGACGGAGCCTATGCCATGACCGC CAGTGGATCCCTCGAGTTACGTATGCGTCGGCTTG	62	1322	pUFR047	Este trabalho
PilZ _{M117G}	NcoI XhoI	CACGGATCCGACGGAGCCTATGCCATGACCGC CAGTGGATCCCTCGAGTTAGCCGATGCGTCG	62	1325	pUFR047	Este trabalho
PilZ _{XAC1133}	-----				pUFR047	[137]

Tabela 7. Oligonucleotídeos para o sequenciamento das construções

Vector		Primer (5'→3')
pET3a e pET28a	T7_promoter	TAATACGACTCACTAT
	T7_terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
pETDuet-1_MSC1	pDueSeqt_F1	TAATACGACTCACTAT
	pDuetSeq_R1	GATTATGCGGCCGTGTACAA
pETDuet-1_MSC2	pDuetSeq_F2	TTGTACACGGCCGCATAATC
	T7_terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
pETRSFDuet-1_MSC1	pRSFSeq_F1	GGATCTCGACGCTCTCC
	pDuetSeq_R1	GATTATGCGGCCGTGTACAA
pETRSFDuet-1_MSC2	pDuetSeq_F2	TTGTACACGGCCGCATAATC
	T7_terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
pOBD	pOBD_F	CAAAGACAGTTGACTGTATCGAACTATC

Figura 19. Mapa dos vectores de expressão pET3a e pET28a

Figura 20. Mapa dos vectores de co-expressão pETDuet-1 e pETRSFDuet-1

Figura 21. Mapa do vector pOBD para a clonagem da isca no ensaio de duplo híbrido

Figura 22. Mapa do vector pUFR047 para complementar mutantes de *X. citri*

3.4 Mutação sitio dirigida

As mutações sitio dirigidas foram feitas usando o kit Quikchange Lightning Site-Directed Mutagenesis (Stratagene). A reação foi feita segundo as recomendações do fornecedor, usando oligonucleotídeos específico contendo a mutação e o plasmídeo contendo o gene a ser mutado (**Tabela 8**). A reação foi feita usando 5 µL do tampão de reação 10x, 1 µL do mix de dNTPs, 50 ng de DNA molde, 1 µL de oligonucleotídeos (10 pmol) sense e anti-sense, 1 µL de QuikChange Lightning Enzyme e água ultrapura para completar um volume final de 50 µL. Os parâmetros para a reação de mutagêneses foram: 1 ciclo de 95°C por 2 minutos, 18 ciclos de 95°C por 20 segundos, 60°C por 10 segundos e 68°C por 30 segundo por cada kb do plasmídeo, 1 ciclo de 68°C por 5 minutos de extensão final. Ao termino da reação foi adicionado 1 µL da enzima de restrição DpnI e incubado a 37°C por 1 hora. 2 µL da reação foi usado para transformar cepas de E. coli XL1-Blue (STRATAGENE) por choque térmico e selecionas me meio LB-ágar contendo antibiótico adequado. Colônias individuais que cresceram foram inoculadas no meio liquido 2xTY com antibiótico adequado e incubadas a 37 °C por 16 horas sob agitação. Após do crescimento o DNA plasmidial foi extraído usando o kit Plasmid Miniprep (Thermo Scientific) e foi feito reações de sequenciamento para confirmação da mutação como descrito na seção 3.3.

Tabela 8. Oligonucleotídeos para a produção de mutações sitio dirigidas

Mutação	Primers (5'→3')	Tm (°C)	Região da mutação
FimX _{R534A}	GTTCCGGTCCGATG GC CACCAGCAGGTGG	73	Sitio de ligação do c-di-GMP (Domínio EAL)
	CCACCTGCTGGTGG GC CATCGGACCGAAC	73	
PilB _{F77A}	GTTGGACGTGTCGGCG GC CGACGCCAGCCAAAAC	78	Interface de interação com PilZ
	GTTTTGGCTGGCGTCG GC CGCCGACACGTCCAAC	78	
PilB _{R103A}	CCGCTGTTCAAG GC CGGCAACCGGCTG	75	Interface de interação com PilZ
	CAGCCGGTTGCCG GC CTTGAACAGCGG	75	
PilB _{F101A}	CAAGTGCTACCGCTG GC CAAGCGCGGCAACCG	74	Interface de interação com PilZ
	CGGTTGCCGCGCTTG GC CAGCGGTAGCACTTG	74	
PilB _{F108A}	GGCAACCGGCTG GC CGTAGGGGTGAG	75	Interface de interação com PilZ
	CTCACCCCTACG GC CAGCCGGTTGCC	75	
PilB _{E132A}	GAAGTTGGTAGTCG GC CCCATCCTTGTGG	70	Interface de interação com PilZ
	CCACAAGGATGGGC GC GACTACCAAGTTC	70	
PilB _{K343A}	GACCGGCTCGGGC GC GACGGTGTCTTG	77	Walker A, sitio de Ligação do ATP
	CAACGACACCGTC GC GCCCGAGCCGGTC	77	
PilB _{E407A}	CATCATGGTCGGCG CA ATCCGTGACCTGG	71	Walker B, sitio de hidrolises do ATP
	CCAGGTCACGGATT GC GCCGACCATGATG	71	

3.5 Indução, expressão e co-expressão de proteínas heterólogas

Para encontrar a melhor condição de expressão para as diferentes construções das proteínas neste estudo inicialmente foram testados alguns parâmetros de indução (temperatura, tempo de indução) e vários tipos de cepas de *E. coli*: BL21(DE3), BL21(DE3) RIL, BL21(DE3) RP, BL21(DE3) STAR e ArcticExpress (DE3). Os vetores nos que as proteínas foram clonadas e as melhores condições de para a sua expressão são mostradas na **Tabela 9** e **10**.

As células de *E. coli* quimio-competentes foram transformadas ou co-transformadas por choque térmico (1 minuto a 42°C e 2 minutos no gelo) com 50 ng dos vetores de expressão, recuperadas por 60 minutos a 37°C em meio 2xTY, plaqueadas em meio LB-água suplementados com antibiótico adequado e incubadas a 37°C por 16 horas. Colônias isoladas dos transformantes foram inoculadas em 15 mL de meio 2xTY suplementado com antibiótico adequado e incubadas sob agitação a 37°C por 16 horas (pre-inoculo). Após as 16 horas 10 mL do pre-inoculo foi adicionado em 1 L de meio 2xTY suplementado com antibiótico adequado e colocado para crescer sob agitação a 37°C e quando a densidade ótica (D.O._{600nm}) se encontrava entre 0,8 e 1,0 foi adicionado 0,1 – 0,2 mM de IPTG (*isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside*) (Thermo Scientific) para a indução da expressão das proteínas e incubado sob agitação a temperatura e tempo adequados de expressão (**Tabela 9**) e co-expressão das proteínas de interesse.

Após o termino da indução as células foram coletadas por centrifugação 7500 rpm por 15 minutos a 4°C e ressuspensas em 25 mL de tampão de lises por litro de cultura (50 mM de Tris-HCl pH 8,0, 200 mM de NaCl, 25% de sacarose, 5% glicerol, 0,03% de Triton X-100, 0,03% de Tween 20) e lisadas por French Press (sob pressão de 2500 psi). A fração solúvel do lisado foi obtida por centrifugação a 17500 r.p.m por 45 minutos a 4 °C usando o rotor JA-10 e centrífuga Beckman Avanti-J25. Para a confirmação da expressão e a solubilidade das proteínas, alíquotas das frações não induzida (antes da adição de IPTG), induzida (após o tempo de indução), pellet e sobrenadante foram tomadas e ressuspensas com 160 µL de tampão de lises, 40 µL de tampão de amostra 5x (10% p/v glicerol; 2% SDS; 50 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1% bromofenol blue, 100mM β-mercaptoetanol) e incubadas a 100 °C por 5 minutos. As amostras foram analisadas por SDS-PAGE [153].

3.6 Expressão de proteínas com selênio-metionina (SeMet)

Um pré-inoculo das bactérias transformadas com o plasmídeo de expressão contendo o gene a ser expresso foi crescido a 37 °C em 10 mL de meio 2xTY suplementados com antibiótico adequado por 16 horas. 5mL do pré-inoculo foi centrifugado, ressuspensado em 1 mL de meio mínimo (**Tabela 1**) e adicionado em 1 L de meio mínimo suplementado com antibiótico adequado e incubada a 37 °C sob agitação de

200 r.p.m. Ao atingir a D.O de 0,8 foi adicionado os seguintes aminoácidos: selênio-metionina (60 mg), lisina, fenilalanina e treonina (100 mg), valina e isoleucina (50 mg). Após 15 min foi adicionado 200 μ M de IPTG e incubados por 4 horas a 22 °C sob agitação de 200 r.p.m. A coleta das células e lises estão descritas na secção 3.5.

3.7 Expressão de proteínas marcadas com ^{15}N

Um pré-inoculo das bactérias transformadas com o plasmídeo de expressão contendo o gene a ser expresso foi crescido a 37 °C em 5 mL de meio 2xTY suplementados com antibiótico adequado por 10 horas. 1 mL do pre-inoculo foi centrifugado, ressuscitado em 1 mL de meio mínimo (**Tabela 1**) marcado com ^{15}N (1 g/L $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$) e adicionado em 50 mL de meio mínimo marcado com ^{15}N suplementado com antibiótico adequado e incubado a 37 °C sob agitação a 200 r.p.m por 16 horas. Após as 16 horas de incubação os 50 mL foram adicionados a 1 L de meio mínimo marcado ^{15}N e incubado a 37 °C sob agitação a 200 r.p.m. Quando até atingir a D.O de 1,0 foi adicionado 200 μ M de IPTG e incubado a 22 °C sob agitação a 200 r.p.m por 6 horas. A coleta das células e lises está descrita na secção 3.5.

3.8 Expressão de proteínas marcadas com o L-5-hidroxytriptofano (5OH-W)

Um pré-inoculo da bactéria *E. coli* Cy BL21 (DE3p) Lys transformadas com o plasmídeo de expressão contendo o gene a ser expresso foi crescido a 37 °C em 5 mL de meio 2xTY suplementados com antibiótico adequado por 10 horas. 1 mL do pre-inoculo foi centrifugado, ressuscitado em 1 mL de meio mínimo (**Tabela 1**) e adicionado em 50 mL de meio mínimo suplementado com 100 mg/L de L-triptofano e antibiótico e incubado a 37 °C sob agitação a 200 r.p.m por 16 horas. Após as 16 horas de incubação os 50 mL foram adicionados a 1 L de meio mínimo suplementado com 100 mg/L de L-triptofano e antibiótico adequado e incubado a 37 °C sob agitação a 200 r.p.m. Quando até atingir a D.O₆₀₀ de 1,0, foi centrifugado a 6000 rpm por 15 min em frascos estéreis, posteriormente o pellet foi ressuscitado em 1 L de meio mínimo sem L-triptofano suplementado com antibiótico adequado e 0,4 mM de IPTG e incubado a 37 °C por 15 min sob agitação a 200 r.p.m. Após os 15 min foi adicionado 200 mg/L de L-5OH-triptofano e incubado a 37 °C por 4 horas sob agitação a 200 r.p.m [154]. A coleta das células e lises estão descritas na secção 3.5.

Tabela 9. Clones e condições otimizadas utilizadas na expressão e co-expressão dos diferentes fragmentos de FimX, PilZ e PilB.

Proteínas	Vector	Cepas	Antibiótico	Condições de expressão	MW_{teórica} (kDa)
HisPilB	pET28a	<i>E. coli</i> BL21 DE3	Kn ^R	-----	62
HisPilB₁₂₋₁₆₃	pET28a	<i>E. coli</i> BL21 DE3 RIL	Kn ^R /Cl ^R	22°C / 6 horas	16,6
HisPilB₁₋₁₉₀ e mutantes	pET28a	<i>E. coli</i> BL21 DE3 RIL	Kn ^R	16 °C / 16 horas	20
HisPilB₃₀₇₋₅₇₈	pET28a	<i>E. coli</i> BL21 DE3	Kn ^R	16 °C / 16 horas	28
HisPilB₁₉₀₋₅₇₈	pET28a	<i>E. coli</i> BL21 DE3	Kn ^R	16 °C / 16 horas	39
HisPilB₁₅₉₋₅₇₈	pET28a	<i>E. coli</i> BL21 DE3	Kn ^R	16 °C / 16 horas	42,6
HisFimX e mutantes	pET28a	<i>E. coli</i> BL21 DE3	Kn ^R	22°C / 6 horas	76
HisFimX_{PAS-GGDEF--EAL}	pET28a	<i>E. coli</i> BL21 DE3	Kn ^R	22°C / 6 horas	59,5
HisFimX_{GGDEF-EAL}	pET28a	<i>E. coli</i> BL21 DE3	Kn ^R	22°C / 6 horas	48
HisFimX_{EAL}	pET28a	<i>E. coli</i> BL21 DE3	Kn ^R	22°C / 6 horas	31,7
FimX_{EAL}	pET3a	<i>E. coli</i> BL21 DE3	Ap ^R	22°C / 6 horas	29,7
FimX_{PAS}	pET3a	<i>E. coli</i> BL21 DE3 RIL	Ap ^R /Cl ^R	18°C / 16 horas	11,4
FimX_{PA_153-255}	pET3a	<i>E. coli</i> BL21 DE3 RIL	Ap ^R /Cl ^R	18°C / 16 horas	14,2
PilZ e mutantes	pET3a	<i>E. coli</i> BL21 DE3 RIL	Ap ^R /Cl ^R	37°C / 4 horas	12,4

Tabela 10. Clones e condições otimizadas utilizadas na co-expressão das proteínas de interesse

Co-expressão de proteínas	Vector	Cepas	Antibiótico	Condições de expressão	MW ^{teórica} (kDa)
HisFimX _{GGDEF-EAL} / PilZ _{Δ107-117}	pET28a / pET3a	<i>E. coli</i> BL21 DE3 Star	Kn ^R /Ap ^R	25°C / 4 hrs	48 / 11,3
HisFimX _{GGDEF-EAL_233-689} / PilZ _{Δ107-117}	pET28a / pET3a	<i>E. coli</i> BL21 DE3 Star	Kn ^R /Ap ^R	25°C / 4 hrs	47,6 / 11,3
HisFimX _{GGDEF-EAL_245-689} / PilZ _{Δ107-117}	pET28a / pET3a	<i>E. coli</i> BL21 DE3 Star	Kn ^R /Ap ^R	22°C / 4 hrs	50 / 11,3
HisFimX _{GGDEF-EAL_250-689} / PilZ _{Δ107-117}	pET28a / pET3a	<i>E. coli</i> BL21 DE3 Star	Kn ^R /Ap ^R	25°C / 4 hrs	49 / 11,3
HisFimX _{GGDEF-EAL_255-689} / PilZ _{Δ107-117}	pET28a / pET3a	<i>E. coli</i> BL21 DE3 Star	Kn ^R /Ap ^R	22°C / 4 hrs	48,5 / 11,3
HisFimX _{GGDEF-EAL_260-689} / PilZ _{Δ107-117}	pET28a / pET3a	<i>E. coli</i> BL21 DE3 Star	Kn ^R /Ap ^R	22°C / 4 hrs	47 / 11,3
HisPilB ₁₂₋₁₆₃ / PilZ	pET28a / pET3a	<i>E. coli</i> BL21 DE3 RIL	Kn ^R /Ap ^R /Cl ^R	18°C / 16 horas	16,6 / 12,4
HisPilB ₁₋₁₉₀ / PilZ	pET28a / pET3a	<i>E. coli</i> BL21 DE3 RIL	Kn ^R /Ap ^R /Cl ^R	18°C / 16 horas	20 / 12,4
HisPilB-PilZ	pETDuet	<i>E. coli</i> BL21 DE3	Ap ^R	16 °C / 16 horas	62 / 12,4
HisPilB _{K343A_E407A} -PilZ	pETDuet	<i>E. coli</i> BL21 DE3	Ap ^R	16 °C / 16 horas	62 / 12,4
HisFimX / PilB - PilZ	pRFSDuet / pETDuet	<i>E. coli</i> BL21 DE3	Kn ^R /Ap ^R	16 °C / 16 horas	72 / 62 / 12,4
HisFimX _{GGDEF-EAL} / PilB - PilZ	pRFSDuet / pETDuet	<i>E. coli</i> BL21 DE3	Kn ^R /Ap ^R	16°C / 16 horas	46 / 62 / 12,4
HisFimX _{EAL} / PilB - PilZ	pRFSDuet / pETDuet	<i>E. coli</i> BL21 DE3	Kn ^R /Ap ^R	16°C / 16 horas	46 / 62 / 12,4

3.9 Purificação de proteínas

Todas as construções das proteínas de interesse foram purificadas seguindo técnicas estándares de cromatografia como cromatografia de afinidade (utilizando a coluna HiTrap Chelating 5m HP, GE Healthcare), de troca iônica (usando as colunas HiPrep Q Sepharose Fast Flow 16/10 e HiPrep SP Sepharose 16/10, GE Healthcare) e de exclusão molecular (utilizando as colunas HiLoad 26/600 Superdex 200 (S200), HiLoad 26/600 Superdex 75 (S75) e Superose 6 10/300 (S6), GE Healthcare). A técnica cromatográfica utilizada, os tampões e a metodologia otimizada empregada na purificação de cada uma das proteínas e dos complexos proteicos estão descritas na **Tabela 11**.

As proteínas que possuem uma cauda de 6xhistidinas foram aplicadas em uma coluna de 5 mL Hi-Trap carregada com níquel e equilibrada com tampão A em um fluxo de 1 mL/min em um sistema AKTA purifier (GE, Healthcare). Posteriormente para eliminar aquelas proteínas contaminantes a coluna foi lavada com 10-20 CV (volume de coluna) de tampão A ou com 5-10% do tampão B (como indicado na **Tabela 11** para cada proteína) para as proteínas que se ligaram na coluna com maior afinidade. A eluição das proteínas e dos complexos foi feito pela aplicação de um gradiente de Imidazol (tampão B) e foram coletadas frações de 5 mL. A cauda de 6xhistidinas foram clivadas usando o Kit Thrombin CleanCleave (Sigma-Aldrich) seguindo as especificações do fornecedor. Para aquelas proteínas que não possuem uma cauda de histidinas foram inicialmente purificadas por cromatografia de troca iônica sendo eluídas por um gradiente de NaCl (como indicado na **Tabela 11**) e as frações foram coletadas em volumes de 10 mL. Após a primeira etapa de purificação e clivagem da cauda de histidinas, as proteínas foram concentradas até 10 mL e sometidas a uma segunda etapa de purificação por cromatografia de exclusão molecular. Após de cada etapa de purificação alíquotas de cada fração que eluíram nas cromatografias foram aplicadas e analisadas em gel SDS-PAGE.

Tabela 11. Resumo das condições de purificação das proteínas sozinhas e em complexos

Proteínas	1° Etapa de purificação	2° Etapa de purificação
<p>HisPilB₁₂₋₁₆₃</p> <p>HisPilB₁₋₁₉₀ e mutantes</p>	<p>Cromatografia de Afinidade Tampão A: 50 mM Tris-HCl pH 8,0 200 mM NaCl 20 mM Imidazol 5 % (w/v) Glicerol Lavagem: 6% de tampão B 10 – 20 CV Gradiente: 6 – 50% tampão B 12 CV Tampão B: Tampão A + 500 mM Imidazol Temperatura: 10 °C</p>	<p>Cromatografia de Exclusão molecular (S200) 50 mM Tris-HCl pH 8,0 100 mM NaCl 5 % (w/v) Glicerol Temperatura: 10 °C</p>
HisPilB ₃₀₇₋₅₇₈	<p>Cromatografia de Afinidade Tampão A: 50 mM Tris-HCl pH 8,0 200 mM NaCl 5 mM MgCl₂ 20 mM Imidazol 1 mM β-Mercatoetanol 10 % (w/v) Glicerol Lavagem: 0 % de tampão B 10 – 20 CV Gradiente: 0 – 50% tampão B 20 CV Tampão B: Tampão A + 500 mM Imidazol Temperatura: 10 °C</p>	<p>Cromatografia de Exclusão molecular (S200) 20 mM Tris-HCl pH 8,0 100 mM NaCl 5 mM MgCl₂ 1 mM β-Mercatoetanol 2% (w/v) Glicerol Temperatura: 10 °C</p>
<p>HisPilB₁₉₀₋₅₇₈</p> <p>HisPilB₁₅₉₋₅₇₈</p>	<p>Cromatografia de Afinidade Tampão A: 50 mM Tris-HCl pH 8,0 200 mM NaCl 5 mM MgCl₂ 20 mM Imidazol 1 mM β-Mercatoetanol 10 % (w/v) Glicerol Lavagem: 0 % de tampão B 10 – 20 CV Gradiente 0 – 50% tampão B 20 CV Tampão B: Tampão A + 500 mM Imidazol Temperatura: 10 °C</p>	
<p>HisFimX e mutantes</p> <p>HisFimX_{PAS-GGDEF--EAL}</p> <p>HisFimX_{GGDEF--EAL}</p> <p>HisFimX_{EAL}</p>	<p>Cromatografia de Afinidade Tampão A: 50 mM Tris-HCl pH 8,0 200 mM NaCl 5 mM MgCl₂ 20 mM Imidazol 5 % (w/v) Glicerol Lavagem: 0% de tampão B 10 – 15 CV Gradiente 0 – 50 % tampão B 20 CV Tampão B: Tampão A + 500 mM Imidazol</p>	<p>Cromatografia de Exclusão molecular (S200) 10 mM Tris-HCl pH 8,0 20 mM NaCl 5 mM MgCl₂ 1 mM β-Mercatoetanol</p>

HisFimX_{PAS}	Cromatografia de Afinidade Tampão A: 50 mM Tris-HCl pH 8,0 200 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 25 mM Imidazol Lavagem: 0% de tampão B 10 – 15 CV Gradiente 0 – 50 %B 20 CV Tampão B: Tampão A + 500 mM Imidazol	Cromatografia de Exclusão molecular (S200) 10 mM Tris-HCl pH 7,0 100 mM NaCl
FimX_{EAL}	Cromatografia de Troca Aniônica Tampão A: 50 mM Tris-HCl pH 7.0 1 mM EDTA 1 mM β-Mercatoetanol Lavagem: 0% de tampão B 10 CV Gradiente 0 – 50 % tampão B 20 CV Tampão B: Tampão A + 1M NaCl	Cromatografia de Exclusão molecular (S200) 10 mM Tris-HCl pH 8,0 20 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 1 mM β-Mercatoetanol
PilZ e mutantes	Cromatografia de Troca Catiônica Tampão A: 50 mM Tris-HCl pH 8.0 1 mM EDTA Lavagem: 5% de tampão B 10 – 20 CV Gradiente 5 – 50 % tampão B 12 CV Tampão B: Tampão A + 1 M NaCl	Cromatografia de Exclusão molecular (S200) 10 mM Tris-HCl pH 8,0 20 mM NaCl
Complexos proteicos		
HisFimX _{GGDEF-EAL - PilZ_{Δ107-117}} HisFimX _{GGDEF-EAL_233-689 - PilZ_{Δ107-117}} HisFimX _{GGDEF-EAL_245-389 - PilZ_{Δ107-117}} HisFimX _{GGDEF-EAL_250-689 - PilZ_{Δ107-117}} HisFimX _{GGDEF-EAL_255-689 - PilZ_{Δ107-117}} HisFimX _{GGDEF-EAL_260-689 - PilZ_{Δ107-117}}	Cromatografia de Afinidade Tampão A: 50 mM Tris-HCl pH 8,0 200 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 20 mM Imidazol 1 mM β-Mercatoetanol 10 % (w/v) Glicerol Lavagem 50 mM de Imidazol Gradiente 0 – 50 % tampão B 20 CV Tampão B: Tampão A + 500 mM Imidazol	Cromatografia de Exclusão molecular (S200) 10 mM Tris-HCl pH 8,0 20 mM NaCl 1 mM MgCl ₂

<p>HisPiIB₁₂₋₁₆₃-PiIZ</p> <p>HisPiIB₁₋₁₉₀-PiIZ</p>	<p>Cromatografia de Afinidade Tampão A: 50 mM Tris pH 8.0 150 mM NaCl 20 mM Imidazole Lavagem: 0% de tampão B 15 CV Gradiente 0 – 50 % tampão B 20 CV Tampão B: Tampão A + 500 mM Imidazol</p>	<p>Cromatografia de Exclusão molecular (S200) 10 mM Tris pH 8.0 20 mM NaCl</p>
<p>HisPiIB-PiIZ</p> <p>HisPiIB_{K343A_E407A}-PiIZ</p>	<p>Cromatografia de Afinidade Tampão A: 50 mM Tris-HCl pH 8,0 200 mM NaCl 2 mM MgCl₂ 20 mM Imidazol 10 % (w/v) Glicerol Lavagem: 10% de tampão B Gradiente 10 – 50% tampão B 10 CV Tampão B: Tampão A + 500 mM Imidazol</p>	<p>Cromatografia de Exclusão molecular (S6) 20 mM Tris-HCl pH 7,0 50 mM NaCl 5 mM MgCl₂</p>
<p>HisFimX-PiIB-PiIZ</p> <p>HisFimX_{GGDEF-EAL}-PiIB-PiIZ</p> <p>HisFimX_{EAL}-PiIB-PiIZ</p>	<p>Cromatografia de Afinidade Tampão A: 50 mM Tris-HCl pH 7,0 100 mM NaCl 2 mM MgCl₂ 20 mM Imidazol 10 % (w/v) Glicerol Lavagem: 0% de tampão B Gradiente 0 – 50% tampão B 10 CV Tampão B: Tampão A + 500 mM Imidazol</p>	<p>Cromatografia de Exclusão molecular (S6) 20 mM Tris-HCl pH 7,0 50 mM NaCl 5 mM MgCl₂ 1 mM β-Mercatoetanol</p>

3.10 Ensaios de cristalização

Todas as proteínas e os complexos purificados (**Tabela 11**) foram concentrados através dos filtros Amicon Ultra-Centrifugal de 10 kDa (Millipore) até uma concentração na faixa de 5-10 mg/mL e a pureza das amostras foi verificada por eletroforese Tricine-SDS-PAGE 10%. As triagens de cristalização foram feitas pela técnica de difusão de vapor em gota sentada (*sitting drop*) usando kits de cristalização da Hampton Research (Crystal Screen 1 e 2, Index 1 e 2, SalRX e PEG/Ion HT) em placas de 24 poços. No reservatório, foram aplicados 300 μ L de solução de cristalização e no pedestal se adicionará 1 μ L de proteína pura concentrada e 1 μ L da solução de cristalização. As placas foram fechadas com plástico aderente da empresa Hampton e foram mantidas a 18°C. Os testes de cristalização também foram feitos na presença dos ligantes c-di-GMP (FimX e seus fragmentos que possuam o domínio EAL), ATP e o seu análogo não hidrolisável ATP γ S (PilB e seus fragmentos que possuam o domínio ATPase). As condições na que foram favoráveis à formação de cristais foram refinadas variando o pH do tampão, a concentração do sal e do precipitante com a finalidade de obter melhores cristais que possam gerar um bom padrão de difração nos experimentos de difração de raios X.

3.11 Coleta de dados de raios X e determinação da estrutura

Os testes iniciais de difração e coleta de dados foram feitos no difratômetro com anodo rotatório Rigaku MicroMax-007HR situado no Instituto de Química -USP e na linha MX2 no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS – Campinas, SP).

Os cristais do complexo FimX_{GGDEF-EAL_255-689}-PilZ _{Δ 107-117}-cdiGMP difrataram a uma resolução de 3,4 Å. Os dados foram indexados, integrados e escalonados utilizando o programa HKL2000 [155]. O arquivo final .sca gerado pelo programa HKL2000 foi convertido para um arquivo .mtz pelo programa *scalepack2mtz* presente no pacote do programa CCP4i [156], o qual também converte as intensidades em fatores de estrutura. As fases foram resolvidas por substituição molecular utilizando o programa *Phaser* [157] do pacote de programa Phenix [158], empregando como moldes a estrutura previamente cristalizada do complexo PilZ-FimX_{EAL}-c-di-GMP [135] e o modelo predito para o domínio FimX_{GGDEF} pelo Phyre2 [152].

Para os cristais do complexo PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ foram coletados 3 conjuntos de dados: dois conjuntos de dados nativos e um conjunto de dados com as proteínas marcadas com SeMet os quais difrataram a 2,0; 1,6 e 1,7 Å respectivamente. Os dados de difração do complexo PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ foram processados no pacote de programas XDS [159]. As fases foram resolvidas pela técnica *Single Anomalous Dispersion* (SAD) utilizando cristais do complexo PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ marcados com o aminoácido SeMet (PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ possui 8

metioninas). As posições dos átomos pesados foram encontrados usando o programa Autosol [160] do pacote de programa Phenix [158]. O modelo gerado foi usado para realizar substituição molecular dos dados nativos do complexo PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ através do programa Phaser do pacote de programa Phenix. O refinamento das estruturas foi feito através de ciclos iterativos usando os programas COOT [161] e Phenix.

3.12 Ensaios de Interação proteína-proteína

3.12.1 Ensaios de duplo híbrido em levedura

Nosso grupo previamente mostrou que PilB_{XAC3239} interage com PilZ_{XAC1133} empregando a técnica de duplo híbrido [137]. Com a finalidade de determinar qual dos domínios de PilB estariam envolvidos na interação foram desenhadas três construções de PilB (**Tabela 5**) clonadas no vetor pOBD (iscas) para serem utilizados em ensaios de interação com PilZ clonada no vector pOAD (presa). Também foram desenhadas duas construções da região N-terminal de FimX que contém os domínios REC e PAS (**Tabela 5**) para uso em ensaios contra a biblioteca do genoma de *Xac* clonada no vector pOAD [162]. A construção e caracterização desta biblioteca está descrita em publicações anteriores do nosso grupo [162,163].

Os ensaios de duplo híbrido foram realizados de acordo ao protocolo previamente estabelecido por nosso laboratório [162]. A levedura *S. cerevisiae* PJ69-4a (**Tabela 2**) foi transformada por eletroporação com os diferentes fragmentos codificando diferentes regiões das proteínas de interesse (**Tabela 5**) clonados no vector pOBD (**Figura 21**). O protocolo consiste em crescer células de levedura em placas contendo meio YAPD sólido (**Tabela 1**). Foram recolhidos 25 µL de células e lavadas com água autoclavada, imediatamente foi adicionado 240 µL de 50% PEG 3350, 36 µL de 1M acetato de lítio, 50 µL de espermatozoides de salmão, 4 µL de DNA plasmidial e 30 µL de água, a solução foi homogeneizada suavemente e incubada a 42°C por 30 minutos, sendo homogeneizada cada 10 minutos. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 6000 r.p.m por 2 min, o sobrenadante foi retirado, adicionou 200 µL de água e incubado a temperatura ambiente por 5 min. Após este período as células plaqueadas em meio SC-W (**Tabela 1**) para selecionar as transformantes e encubadas a 30°C por 2-4 dias.

As células transformadas (crescidas no meio SC-W) foram submetidas a teste de auto-ativação a fim de determinar a quantidade mínima de 3-aminotriazol que as células não conseguem crescer. O 3-aminotriazol é um inibidor da síntese de adenina usado na triagem. As células transformadas crescidas em meio SC-W foram ressuspensas em 1mL de água autoclavada, da solução serão retiradas 5 µL e diluída em 1 mL. 100 µL desta solução diluída foram plaqueadas em placas de contendo os meios SC-W, SC-WH (**Tabela**

1), contendo diferentes concentrações de 3-aminotriazol (0, 3, 5, 10, 15, 25 e 35 mM) e foram encubadas a 30°C por 5 dias. A concentração 3 mM de 3-aminotriazol foi escolhida por não ter crescimento nenhuma das condições testadas.

As células previamente transformadas com a isca (pOBD) foi co-transformada com o vector pOAD que contém o inserto PilZ (ensaio de interação com PilB) ou a biblioteca genômica de Xac (ensaio de interação com os domínios REC e PAs de FimX). Células de levedura foram transformadas seguindo o protocolo descrito acima nesta mesma seção. Após a transformação as células foram plaqueadas em meio SC-WHL (**Tabela 1**) e encubadas a 30°C por 14 dias. As células transformadas foram selecionadas em meio seletivo para interação, SC-WHLA (**Tabela 1**). Nos ensaios contra a biblioteca de Xac, as colônias crescidas no meio SC-WHLA foram inoculadas no meio SC-L líquido para a seleção do vector pOAD. Posteriormente, o vector pOAD foi extraído da levedura e usado para transformar as cepas bacteriana kC8 (**Tabela 2**) para posteriormente ser extraído por miniprep e sequenciado usando oligonucleotídeos específicos (**Tabela 7**).

3.12.2 Ensaio de atividade β -galactosidase

As células de levedura PJ69-4a contendo os plasmídeos de isca e presa foram crescidas em meio SC-WHLA líquido a 30°C sob agitação de 200rpm. 1mL do cultivo foi centrifugado a 6000 r.p.m. a 4°C por 5 min. As células foram ressuspensas em 1mL de tampão Z (0.06 M de fosfato disódico, 0.04 M de 62 fosfato de sódio, 0.01 M de cloreto de potássio, 0.001 M de sulfato de magnésio, 0.05 M de β -Mercaptoetanol, em pH =7.0) e a DO_{600nm} foi medida. Posteriormente foi adicionado 100 μ L de clorofórmio e 50 μ L de 0.1% SDS. O meio é misturado e incubado por 5 min a 28 °C. A reação se iniciou com a adição de 25 μ L de 4 mg/mL de ONPG (o-nitrofenil-beta-D-galactosidase) e incubada 1 hora a 28 °C. A reação foi parada pela adição de 0.5 mL de 1 M de carbonato disódico e centrifugado por 5 min a 13000 r.p.m. O sobrenadante foi utilizado para medir a absorbância em 550 nm e 420 nm. O cálculo da Unidade de Miller é feita segundo a equação:

Equação 1

$$Miller Unit = \frac{1000 * [(DO_{420nm} - 1,75 * DO_{550nm})]}{60 * 1 * DO_{600nm}}$$

3.12.3 Cromatografia de exclusão molecular analítica (SEC)

Para determinar a formação dos complexos entre as construções das proteínas purificadas foi utilizada uma coluna Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare) acoplada a um AKTA purifier (GE Healthcare) equilibrada com 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM β -Mercaptoetanol. Para os experimentos com as proteínas inteiras foi utilizada uma coluna Superose 6 10/300 GL (GE Healthcare) equilibrada com 20 mM Tris-HCl pH 7,0, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM β -Mercaptoetanol. Todos experimentos foram feitos na presença e na ausência dos ligantes específicos (c-di-GMP e $\text{ATP}\gamma\text{S}$) para cada proteína.

3.12.4 Determinação da massa molar das proteínas de interesse por SEC-MALS

Análise por cromatografia de exclusão molecular acoplada a um detector de espalhamentos de luz em múlti-ângulos (SEC-MALS) foram realizados para determinar a massa molar das proteínas de interesse sozinhas e em complexo com seus parceiros de interação na ausência e na presença dos seus ligantes (c-di-GMP e/ou $\text{ATP}\gamma\text{S}$). Alíquotas de 100 μL das proteínas (sozinhas e em complexo) foram injetadas uma coluna de exclusão molecular analítica Wyatt Technology WTC-015S5 (5 μm , 150 $\text{\AA}$, 7,8/300) com um volume de 15 mL e equilibrada em tampão 50 mM Tris-pH 8,0, 50 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM β -mercaptoetanol e acoplada em serie aos sistemas miniDAWN TREOS multi-angles light scattering detector / detector de espalhamento de luz em múltiplos ângulos (MALS) e Optilab T-rEX refractive index detector / detector de índice de refração. Para determinar a massa molar dos complexos das proteínas inteiras foi utilizada uma coluna de exclusão molecular analítica Wyatt Technology WTC-050S5 (5 μm , 500 $\text{\AA}$, 7,8/300) com um volume de 15 mL e equilibrada com 20 mM Tris-HCl pH 7,0, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM β -mercaptoetanol. Foi utilizado um fluxo constante de 0,5 mL/min em cada corrida. Todos experimentos foram feitos na presença e na ausência dos ligantes específicos para cada proteína. Os dados foram analisados utilizando o software ASTRA 7.1.1.3 (Wyatt Technology). A massa molar das proteínas foi calculada assumindo que o índice de refração (dn/dc) é equivalente a 0,186 mL/g [164].

3.12.5 Ressonância magnética nuclear

As proteínas marcadas com ^{15}N foram utilizadas para adquirir espectros ^1H - ^{15}N HSQC das proteínas livres e em complexos com seus parceiros de interação não marcados (^{14}N). Os espectros foram adquiridos em um instrumento de RMN marca Bruker Ascend III de 800 MHz com criosonda TCI. Os espectros para PilB₁₂₋₁₆₇ (^{15}N) livre (150 μM) foram adquiridos a 278 e 298 K e em complexo com PilZ (^{14}N) (proporção 1:1,5) a 298 K. Os espectros do PilZ (^{15}N) livre (300 μM) e na presença de PilB₁₂₋₁₆₃ (^{14}N) e FimX_{EAL} foram

adquiridos a 298 K. Em alguns casos as proteínas marcadas e não marcadas com ^{15}N foram misturadas e os complexos purificados por cromatografia de exclusão molecular utilizando uma coluna Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare) acoplada a um AKTA purifier (GE Healthcare). Posteriormente, espectros ^1H - ^{15}N HSQC do complexo PilZ (^{15}N)-PilB₁₂₋₁₆₃ (^{14}N), purificado por SEC e concentrado a 300 μM , foram adquiridos com diferentes concentrações de FimX_{EAL} (^{14}N) a 298 K. Espectros do complexo PilZ (^{15}N)-PilB₁₂₋₁₆₃ (purificado por SEC) na presença de FimX_{EAL} (^{14}N) também foram adquiridos. Todas as proteínas se encontravam em 20 mM Tris-HCl pH 7,0, 50 mM NaCl, 1 mM MgCl₂. Os espectros de RMN foram processados usando o programa NMRPipe [165] e analisados usando o software CCPN Analysis [166].

3.13 Ensaios de interação proteína – proteína empregando a fluorescência intrínseca de proteínas contendo L-5hidroxitriptofano (5OH-W)

Os ensaios de titulação foram realizados utilizando um espectrofluorímetro SHIMADZU Modelo RF-6000 (Central Analítica /IQ-USP) a 25 °C. As amostras foram excitadas a 310 nm (bandwidth: 5 nm) e os espectros de emissão foram coletados na faixa de 325 – 445 nm (bandwidth: 5 nm). A concentração inicial da proteína marcada com L-5OH-triptofano foi de 1 μM (PilZ_{5OHW}, complexo PilB₁₋₁₉₀-PilZ_{5OHW}, complexo PilZ_{5OHW}-FimX_{EAL}) e os espectros de emissão foram coletados após a adição de alíquotas dos ligantes (PilB₁₋₁₉₀ e FimX_{EAL}). Os complexos PilB₁₋₁₉₀-PilZ_{5OHW} e PilZ_{5OHW}-FimX_{EAL} foram obtidos por cromatografia de exclusão utilizando uma coluna Superdex 200 GL10/300 (GE Healthcare). Todas as proteínas foram diluídas em 50 mM Tris-pH 8,0, 50 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM β -Mercaptoetanol. As amostras foram equilibradas por 2 min antes de cada medida. As curvas de titulação obtidas foram usadas para calcular o K_d de interação entre as proteínas pelo programa SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc) utilizando a seguinte equação [167]:

Equação 2

$$F = (v_0/V) \left(\frac{(\alpha - 1)/2[P]}{([L] + [P] + K_d - ((([L] + [P] + K_d)^2 - 4[L][P])^{1/2}) + 1)} \right)$$

F: fluorescência em um dado ponto da titulação, v₀: volume inicial, V: volume em um ponto dado da titulação, [P]: concentração da proteína marcada com 5OH-W em um dado ponto da titulação, [L]: concentração do ligante em um dado ponto da titulação, K_d: constante de dissociação, α : fluorescência máxima/fluorescência inicial.

3.14 Detecção da atividade ATPásica de PilB

A atividade ATPásica de PilB foi monitorada pela quantificação colorimétrica (ensaio de verde malaquita) do fosfato inorgânico (P_i) produzido pela hidrólise do ATP. O ensaio de verde malaquita é baseado na formação de um complexo entre o verde malaquita, o molibdato e o ortofosfato livre em condições acídicas. O complexo formado é proporcional à concentração do fosfato inorgânico livre e pode ser medido por absorvância a 650nm [168,169]. O ensaio de verde malaquita foi realizado seguindo o protocolo previamente descrito por nosso laboratório [170]. As reações foram feitas em volumes de 100 μ L contendo 1 μ M do complexo PilB-PilZ (ou PilB_{K343A_E407A}-PilZ) em tampão 25 mM Tris-HCl pH 7,0, 50 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 2 mM β -mercatoetanol e 1 mM de ATP e incubadas a 30 °C por 12 horas. Antes da adição do substrato (ATP) as reações foram incubadas por 10 minutos a 30 °C. As reações também foram feitas na presença de FimX na presença e na ausência de c-di-GMP. Após das 12 horas de incubação, 50 μ L das reações foram colocadas em placas de 96 poços e as reações paradas pela adição de 200 μ L do reagente colorimétrico para a detecção do fosfato inorgânico (P_i). O reagente colorimétrico foi preparado no mesmo dia de uso misturando de 3 volumes de 0.045 % de verde malaquita, 1 volume de molibdato de amônio (4.2 % em 4 N de HCl) e 1/100 volume de 1 % Triton X-100, incubado pelo menos por 30 minutos a temperatura ambiente protegido da luz e filtrado usando um filtro de 0.22 μ m. Após a adição do reagente colorimétrico as reações foram incubadas a temperatura ambiente por 10 min protegidas da luz. A leitura foi feita a 650nm utilizando um leitor de microplacas SpectraMax – Molecular Devices. Uma curva padrão de 0 a 150 μ M de fosfato inorgânico foi realizada com as mesmas condições descritas acima.

3.15 Obtenção das linhagens de *X. citri* geneticamente modificadas

3.15.1 Desenho dos vectores para nocautear genes em *X. citri*

Para obtenção de cepas nocautes de *X. citri* inicialmente, foram utilizados oligonucleotídeos específicos (**Tabela 12**) para amplificar fragmentos de aproximadamente 1000 pb *upstream* e *downstream* que flanqueiam a região codificadora da proteína de interesse. Estes fragmentos denominados "F1 – R1" (*upstream*) e "F2 – R2" (*downstream*) foram clonados no vector suicida pNPTS138 (**Figura 23**) previamente linearizado utilizando a estratégia de Gibson Assembly (New England Biolabs) o qual permite juntar vários fragmentos de DNA por sobreposição (overlapping) numa única reação pela ação concertada das enzimas 5' exonuclease, a DNA polimerase e a DNA ligase [171]. O desenho dos oligonucleotídeos e a reação de Gibson Assembly foi realizada seguindo as indicações do fornecedor (Gibson Assembly Instruction Manual, NEB). Cada

oligonucleotídeo (F1, F2, R1 e R2) possuem no seu extremo 5' uma região homologa (~20 nucleotídeos) à região 3' do fragmento na qual será ligado. O vector pNPTS138 linearizado e os fragmentos F1 – R1 e F2 – R2 foram obtidos por PCR como descrito na secção 3.3 utilizando os oligonucleotídeos mostrados na **Tabela 12**. O produto da reação de PCR do vector pNPTS138 foi tratado com a enzima DpnI a 37 °C por 1 hora para eliminar o vector parental (metilado) usado como molde na reação de PCR. Os tamanhos dos produtos de PCR foram verificados por eletroforese em gel de agarose 1% e purificados usando o KIT GeneJET PCR Purification (Fermentas). A reação de Gibson Assembly foi feita usando 10 µL de Gibson Assembly Master Mix (2X), 50 ng do vector pNPTS138 linearizado, 70 ng do fragmento F1 – R1, 70 ng do fragmento F1 – R1 em reações de 20 µL e incubada a 50 °C por 1 hora num termociclador. O produto da reação foi usado para transformar células de *E. coli* DH5α quimio-competentes e selecionadas em meio LB-agar contendo o antibiótico Kanamicina (40 µg/mL). As colônias que cresceram foram inoculadas em meio 2xTY suplementado com o antibiótico Kanamicina (40 µg/mL) e crescidas a 37°C sob agitação por 16 horas. A extração do DNA plasmidial e a confirmação dos insertos foi feito por digestão com enzimas de restrição específicas e por sequenciamento como descrito na secção 3.3.

3.15.2 Desenho dos vectores para a obtenção das cepas *Xac_msfGFP-FimX*, *Xac_msfGFP-PilZ* e *Xac_msfGFP-PilB*

Para inserir e fusionar msfGFP (monomeric superfolder Green Fluorescent Protein) nas proteínas de interesse (FimX_{XAC2398}, PilZ_{XAC1133} e PilB_{XAC3239}) foram utilizados oligonucleotídeos específicos (**Tabela 12**) para amplificar fragmentos de aproximadamente 1000 pb *upstream* e *downstream* que flanqueiam a região inserção (imediatamente depois do ATG de cada gene). O gene de *msfgfp* foi amplificado a partir do vector pDHL1029 [172], introduzindo um linker flexível no seu extremo C-terminal (SGGGG). A estratégia para montagem dos vectores foi similar à descrita na secção 3.15.1. A reação de Gibson Assembly foi feita usando 10 µL de Gibson Assembly Master Mix (2X), 50 ng do vector pNPTS138 linearizado, 70 ng do fragmento F1 – R1, 70 ng do fragmento F1 – R1, 50 ng do DNA de *msfGFP* em reações de 20 µL e incubada a 50 °C por 1 hora num termociclador. O produto da reação foi usado para transformar células de *E. coli* DH5α quimio-competentes e selecionadas em meio LB-agar contendo o antibiótico Kanamicina (40 µg/mL). As colônias que cresceram foram inoculadas em meio 2xTY suplementado com o antibiótico Kanamicina (40 µg/mL) e crescidas a 37°C sob agitação por 16 horas. A extração do DNA plasmidial e a confirmação dos insertos foi feito por digestão com enzimas de restrição específicas e por sequenciamento como descrito na secção 3.3.

Figura 23. Vector suicida pNPTS138. Este vector confere resistência a Kanamicina e codifica a enzima Levansucrase (gene sacB).

Tabela 12. Oligonucleotídeos usados para a inserção de msfGFP e para a deleção dos genes de interesse

Nome	Oligonucleotídeos (5'→3')	T _m (°C)	Descrição
CW30	GAAGTGTTCACCGGTGTTG	58	msfGFP_F3 (Fusão N-terminal de GFP)
CW168	GCTGCCACCGCCACCTTTGTAGAGTTCATCCATGC		msfGFP-linker_R3 (Fusão N-terminal de GFP)
CW164	TCACCTAAGGCCTTGACTAGAGGGTCGACAGATCCGCACCCAGTGC	58	msfGFP-FimX_F1
CW165	ACCGGTGAACAGTTCTTCACCTTTACTCATGCGCGGCTCCCTAG		msfGFP-FimX_R1
CW166	ATGAAGTCTACAAAGGTGGCGGTGGCAGCCAAAAAGGCAAAGATCTCACC	58	msfGFP-FimX_F2
CW167	CAGGATATCTGGATCCACGAATTCGCTAGGAACTGTGTTGCGCCGAAG		msfGFP-FimX_R2
EL13	CAGTTGTTCTGCGACATCTCC	60	msfGFP-FimX_F4 (confirmação da fusão msfGFP-FimX)
EL14	CGTCCCCACGCTGAACAC		msfGFP-FimX_R4 (confirmação da fusão msfGFP-FimX)
EL1	TCACCTAAGGCCTTGACTAGAGGGTCGACGCTGCCCCAGTATCAGAAC	58	msfGFP-PilB_F1
EL2	ACCGGTGAACAGTTCTTCACCTTTACTCATCATTGTTCCCAATTGGC		msfGFP-PilB_R1
EL3	ATGAAGTCTACAAAGGTGGCGGTGGCAGCAATAGCGTCGTGACCGC	58	msfGFP-PilB_F2
EL4	CAGGATATCTGGATCCACGAATTCGCTAGCACCAGCACCATGCCATAG		msfGFP-PilB_R2
EL5	CATGAAGAAGCAACAGGGTTTC	60	msfGFP-PilB_F4 (confirmação da fusão msfGFP-PilB)
EL6	CAGGCAAGCGGATTTTCGAC		msfGFP-PilB_R4 (confirmação da fusão msfGFP-PilB)
EL7	TCACCTAAGGCCTTGACTAGAGGGTCGAGAGCCTATGCCATGACCGC	58	msfGFP-PilZ_F1
EL8	ACCGGTGAACAGTTCTTCACCTTTACTCATCGAGTTCCCCTAGAACGTG		msfGFP-PilZ_R1
EL9	ATGAAGTCTACAAAGGTGGCGGTGGCAGCAGTGCAATGAATGCACGCC	58	msfGFP-PilZ_F2
EL10	CAGGATATCTGGATCCACGAATTCGCTAGCCATCGCAACCAGAGCAC		msfGFP-PilZ_R2
EL11	CTGTATTTCTGTGGCGGTGG	60	msfGFP-PilB_F4 (confirmação da fusão msfGFP-PilZ)
EL12	CTTTTCCGACTTCACATCGAC		msfGFP-PilB_R4 (confirmação da fusão msfGFP-PilZ)
EL15	TCACCTAAGGCCTTGACTAGAGGGTCGATACAACCTCCAGTGGGCG	60	msfGFP-FimX_ΔREC_F1
EL16	GATGAGTGCCTCGCAGCGGCGCTCGGTCTCGAGGGTGAGATCTTTGCC		msfGFP-FimX_ΔREC_R1
EL17	GCTGCGACGCACTCATC	60	msfGFP-FimX_ΔREC_F2
EL18	CAGGATATCTGGATCCACGAATTCGCTAGCAGGAAGGCCTGGTACAG		msfGFP-FimX_ΔREC_R2

EL19	TCACTTAAGGCCTTGACTAGAGGGTCGAGTAACTGCCGGTTCATG		
EL20	GTTCCGGGTCGAACTCCTCGCGGAGTGCGTCGCAGCGG	62	msfGFP-FimX_ΔPAS_F1
EL21	GAGGAGTTCGACCCGGAAC		msfGFP-FimX_ΔPAS_R1
EL22	CAGGATATCTGGATCCACGAATTCGCTAGCAGCCCGACCTTGCAATC	62	msfGFP-FimX_ΔPAS_F2
EL23	TCACTTAAGGCCTTGACTAGAGGGTCGA CGCCATAACGTTGAAGACG		msfGFP-FimX_ΔPAS_R2
EL24	CTGACCGCATTGCCACCGAG GTCGAACTCCTCGCGGC	62	msfGFP-FimX_ΔGGDEF_F1
EL25	GTGGCAATGCGGTCAGCATC		msfGFP-FimX_ΔGGDEF_R1
EL26	CAGGATATCTGGATCCACGAATTCGCTAGCAGAACACCTTGCCCTCGC	62	msfGFP-FimX_ΔGGDEF_F2
EL27	TCACTTAAGGCCTTGACTAGAGGGTCGACGAAGAGAACGCCCTGGTC		msfGFP-FimX_ΔGGDEF_R2
EL28	GTGCGACGAAATCGCCCTGGACCGCATTGCCACCGAGCTC	60	msfGFP-FimX_ΔEAL_F1
EL29	CAGGGCGATTTCGTGCGCAC		msfGFP-FimX_ΔEAL_R1
EL30	CAGGATATCTGGATCCACGAATTCGCTAGCAACCGCATTTTCTGTTC	60	msfGFP-FimX_ΔEAL_F2
EL31	TCACTTAAGGCCTTGACTAGAGGGTCGA CGCTGCCCCAGTATCAGAAC		msfGFP-FimX_ΔEAL_R2
EL32	AAGTCTTCTTCGACCGC	60	ΔPilB_F1
EL33	GCGGTGCAAGAAGCAGTT AATGCGATGCAGATCGCC		ΔPilB_R1
EL34	CAGGATATCTGGATCCACGAATTCGCTAGGCCCTTCGTCCTTGTTAC	56	ΔPilB_F2
EL36	TCACTTAAGGCCTTGACTAGAGGGTCGAATTGGTTTACTGCGACTGC		ΔPilB_R2
EL37	GCTGCCACCGCCACCTTTG	60	msfGFP-PilB_ΔPilBN-terminal_F1 (Resíduos 10-165)
EL38	CAAAGGTGGCGGTGGCAGCATGGGGGATCTGGACGTCTC		msfGFP-PilB_ΔPilBN-terminal_R1 (Resíduos 10-165)
EL39	CAGGATATCTGGATCCACGAATTCGCTAGTAGCCTTCGGTGCACTCATC	60	msfGFP-PilB_ΔPilBN-terminal_F2 (Resíduos 10-165)
EL54	TCACTTAAGGCCTTGACTAGAGGGTCGAGATCATTTCTGACGCACCAG		msfGFP-PilB_ΔPilBN-terminal_R2 (Resíduos 10-165)
EL55	CACGGCAGTCGAACTAATGTC	58	ΔpilM_F1
EL56	GACATTAGTTCGACTGCCGTG GTCGAAGAGCAGCTCGGTGTG		ΔpilM_R1
EL57	CAGGATATCTGGATCCACGAATTCGCTAGCAGCACCATGATGAACAAGC	58	ΔpilM_F2
EL58	TCACTTAAGGCCTTGACTAGAGGGTCGAAGCTGCGAATTCAGTAGGAC		ΔpilM_R2
EL59	CGTTTGTTGCGCTTTCATCTTGAC	58	ΔpilC_F1
EL60	CAAGATGAAAGGCGAACAACG GAGTATTTGAGCAGGAAGTCAAC	58	ΔpilC_R1
			ΔpilC_F2

EL61	CAGGATATCTGGATCCACGAATTCGCTAGGATGAAGTCGCTCATCGTCG		$\Delta pilC_R2$
EL62	TCACTTAAGGCCTTGACTAGAGGGTCGAGCAAATTTGGTTGGAATAACG	60	PilB_K343A_F1 (Mutação pontual no resíduo K343)
EL51	CAACGACACCGTCGCGCCCCGAGCCGGTC		PilB_K343A_R1 (Mutação pontual no resíduo K343)
EL50	GACCGGCTCGGGCGCGACGGTGTCGTTG	60	PilB_K343A_F2 (Mutação pontual no resíduo k343)
EL63	CAGGATATCTGGATCCACGAATTCGCTAGCATCGCCGTGCCGCCCTCTTC		PilB_E407A_R2 (Mutação pontual no resíduo E407)
EL52	CATCATGGTCGGCGCAATCCGTGACCTGG	60	PilB_E407A_F2 (Mutação pontual no resíduo E407)
EL53	CCAGGTCACGGATTGCGCCGACCATGATG		PilB_E407A_R2 (Mutação pontual no resíduo E407)
EL64	TCACTTAAGGCCTTGACTAGAGGGTCGACAGTACGTCGACGATTTCAAAC	60	FimX_R534A_F1 (Mutação pontual no resíduo R534)
EL65	GTTCCGTCCGATGGCCACCAGCAGGTGG		FimX_R534A_R1 (Mutação pontual no resíduo R534)
EL66	CCACCTGCTGGTGGCCATCGGACCGAAC	60	FimX_R534A_F2 (Mutação pontual no resíduo R534)
EL67	CAGGATATCTGGATCCACGAATTCGCTAGCTCAATACCTTCGTGATCGTG		FimX_R534A_R2 (Mutação pontual no resíduo R534)
EL68	GAAGCCTTTAATCACCTTGTTG	60	$\Delta pilC_F3$ (confirmação da deleção do PilC)
EL69	GTACACCCAGCTTCTCGAAC		$\Delta pilC_R3$ (confirmação da deleção do PilC)
EL71	CATGGCGATGATCGTAGAC	60	$\Delta pilM_F3$ (confirmação da deleção do PilM)
EL72	CTTAAGCGGCTCCAGGTTT		$\Delta pilM_R3$ (confirmação da deleção do PilM)
EL91	TCACTTAAGGCCTTGACTAGAGGGTCGACTTGGCCAAGCAGTTTGG	62	$\Delta fimX_F1$
EL92	CAGTTCTTCCTGGCTTTGC		$\Delta fimX_R1$
EL93	GCAAAGCCAGGAAGAACTGATTCTGACAATGGCCGAATTC	62	$\Delta fimX_F2$
EL94	CAGGATATCTGGATCCACGAATTCGCTAGGTCGTTGCTTGCGTCAATC		$\Delta fimX_R2$
EL95	GATGTGCTGTGGTCCAGC	60	$\Delta fimX_F3$ (confirmação da deleção do FimX)
EL96	CTGAATCGTCGGTCAGGTG		$\Delta fimX_R3$ (confirmação da deleção do FimX)

3.15.3 Transformação e seleção das linhagens de *X. citri* geneticamente modificadas

Todas as modificações no genoma de *X. citri* (**Tabela 2**) foram introduzidas por troca alélica em dois passos (Two-step allelic exchange), o qual permite fazer modificações genicas precisas como nocautes e knock-ins de genes, assim como inserções, deleções e substituições de nucleotídeos únicos [173]. O vector suicida pNPTS138 (**Figura 23**) contendo os fragmentos de 1000 pb *upstream* e *downstream* que falqueiam a região a ser modificada foi utilizado para obter as cepas de *X. citri* geneticamente modificadas. O vector pNPTS138 confere resistência ao antibiótico kanamicina além de levar o gene *sacB*, quem codifica para a enzima Levansucrase que sintetiza fructooligosacarídeos a partir de sacarose. O gene *sacB* atua como um marcador de seleção negativa porque o acúmulo de este oligossacarídeo é tóxico para a célula [174]. As células de *X. citri* foram transformadas com os vectores desenhados acima seguindo o protocolo previamente estandardizado no nosso laboratório. No qual, 1 mL de uma cultura de *X. citri* em meio 2xTY incubada por 16 horas foi inoculado em 50 mL de meio 2xTY e incubado em agitação a 30 °C até atingir uma D.O_{600nm} de 0.3. O inoculo foi centrifugado a 4000 rpm a 4°C por 15 min, o pellet foi lavado 3 vezes com água estéril gelada. As células foram ressuspensas com o volume residual e 50 µL destas células foram misturadas com 3 µL do vector (200 ng/µL). A transformação é feita por eletroporação utilizando cubetas de 0.2 cm (BIO-RAD) e um sistema de eletroporação BIO-RAD com os parâmetros de 2KV, 25µF e 200V. As células foram recuperadas em 1 mL de 2xTY incubadas por 2 horas a 30 °C. As células foram centrifugadas e o pellet ressuspensado em 100 µL de meio 2xTY foi plaqueado em placas contendo LB-agar suplementados com Kanamicina (40 µg/mL) e incubados a 30 °C por 3-5 dias (primeiro evento de recombinação). As colônias obtidas nestas placas integraram o vector no genoma por recombinação homóloga usando os fragmentos de 1000 pb *upstream* ou *downstream* clonados no vector pNPTS138. Um grupo de colônias resistentes à Kanamicina foram selecionadas e replaqueadas em meio LB-agar suplementado com 5% de sacarose e incubadas a 30 °C por 3 dias, o qual permite selecionar as células que tenham eliminado o vector pNPTS138 integrado por um segundo evento de recombinação entre a duplicada região de 1000 pb *upstream* ou *downstream*. As colônias que sofreram o segundo evento de recombinação foram selecionadas pela perda da resistência ao antibiótico kanamicina. Para isto as colônias isoladas crescidas no meio LB-agar suplementado com sacarose foram picadas e riscadas em duas placas de LB-agar (sem sacarose), uma delas suplementada com Kanamicina (40 µg/mL). As colônias que cresceram em placas com LB-agar mas não em LB-agar suplementado com Kanamicina foram selecionadas como possíveis clones positivos para a deleção do gene de interesse ou inserção do gene *msfgfp*. As colônias positivas foram confirmadas por PCR usando

oligonucleotídeos específicos (**Tabela 12**) que alinham fora da região usada para amplificar os fragmentos. Os produtos de PCR com o tamanho esperado para a deleção ou inserção foram confirmados por sequenciamento. As cepas de *X. citri* confirmadas obtidas foram guardadas em -80 °C em meio LB suplementado com ampicilina com 20 % glicerol.

3.15.4 Complementação de cepas nocautes de *X. citri*

A cepa com o gene $PilZ_{XAC1133}$ nocauteado foi complementada com plasmídeos contendo o gene de $PilZ_{XAC1133}$ selvagem e duas mutantes pontuais do mesmo gene ($PilZ_{M117A}$ e $PilZ_{\Delta M117}$) clonados no vector pUFR047 (sob controle do promotor endógeno) o qual confere resistência a gentamicina. As cepas complementadas foram também transformadas com o plasmídeo pBBR-MCS2-GFP (confere resistência a Kanamicina) o qual permite a expressão constitutiva de GFP para ensaio de microscopia. A transformação das cepas nocautes com os plasmídeos para complementação foi feita como descrito na secção 3.15.3 e plaqueadas em meio LB-agar suplementado com o antibiótico gentamicina ou quando co-transformadas (com pUFR047 e pBBR2-MCS2) forma plaqueadas em meio LB-ágar suplementado com Kanamicina (40 µg/mL) e gentamicina (10 µg/mL).

3.16 Ensaios de microscopia

3.16.1 Análise da motilidade twitching

As linhagens de *X. citri* produzidas neste trabalho (**Tabela 2**) foram avaliadas pela sua capacidade de realizar motilidade *twitching*. Os ensaios foram realizados em câmaras para microscopia de oito poços com tampa de vidro (Nu155411; Lab-Tek, NUNC) contendo meio KB-agar suplementado com 2 mM de $CaCl_2$ e com antibiótico adequado (quando as cepas de *Xac* levavam plasmídeos de complementação e ou plasmídeos para a expressão de GFP) seguindo a metodologia previamente publicada por nosso laboratório [21]. Colônias das diferentes linhagens de *X. citri* crescidas em placas contendo meio LB-ágar suplementados com antibiótico adequado e incubadas por 3 dias a 30 °C foram tocadas com um palito de dente estéril de forma que a ponta ficasse coberta de bactérias. Este palito foi usado para perfurar a parte central do meio KB-ágar até o fundo do poço. Após a inoculação as bactérias foram incubadas a 30 °C por 2 dias numa câmara húmida. A zona de motilidade twitching foi visualizado usando um microscópio de fluorescência invertido Leica DMI8 com uma magnificação de 100x. Imagens de *time-lapse* também foram adquiridas em intervalos de 10 min por um lapso de 16 horas a 28 °C com uma magnificação de 40x. As imagens coletadas foram analisadas usando o software Fiji [175].

3.16.2 Ensaio de localização in vivo das proteínas de interesse em *X. citri* por microscopia de fluorescência

A localização celular das proteínas msfGFP-FimX, msfGFP-PilB e msfGFP-PilZ nas diferentes linhagens de *X. citri* produzidas neste trabalho (**Tabela 2**) foram analisadas em pads de meio KB-agarose 1.5% (onde a peptona da formula original foi substituída por 0,2 % de Casaminoácidos) suplementado com 2 mM CaCl₂. Um cultivo overnight das células de *X. citri* foi diluído 1/50 em meio LB fresco e 1 µL desta diluição foi aplicada sob o pad de meio KB-agarose e permitido secar por 2 minutos. Posteriormente foi coberto com uma lamínula de vidro (Corning cover glasses 1 ½, 2980-225) e incubado a 30 °C por 6 horas numa câmara húmida com a finalidade das bactérias possam crescer e fazer twitching. Imagens de contraste de fase e de emissão de fluorescência de msfGFP foram adquiridos com um microscópio de epifluorescência invertido Leica DMI-8. A emissão de msfGFP foi adquirido com 2,000 ms de tempo de exposição a máxima intensidade de luz de excitação. O microscópio esteve equipado com uma câmera DFC365 FX (Leica), um objetivo HC PL APO 100x /1.4 oil ph3 (Leica) e um cubo de filtro de passagem de emissão de excitação – emissão para GFP (Ex: 470/40, DC: 495, Em: 525/50; Leica). As imagens obtidas foram visualizadas e o background subtraído por rolling-ball correction usando uma região significativa livre de células usando o software Fiji [175]. Para obter o uma representação quantitativa do número de foci e a localização dos foci nas células das diferentes cepas de *X. citri*, as imagens foram analisadas usando o software MicrobeJ [176], que prove um método de detecção automático.

3.16.3 Ensaio de motilidade twitching por *time-lapse* por microscopia de fluorescência

A localização celular das proteínas msfGFP-FimX, msfGFP-PilB e msfGFP-PilZ nas cepas de *X. citri selvagens* durante a motilidade twitching foram analisadas em pads de meio KB-agarose 1.5% suplementado com 2 mM CaCl₂. Um cultivo overnight das células de *X. citri* foi diluído 1/50 em meio LB fresco, 1 µL desta diluição foi aplicada sob um pad do meio KB-agarose 1,5% e deixado secar por 2 minutos. Posteriormente foi coberto com uma lamínula de vidro (Corning cover glasses 1 ½, 2980-225) e incubado a 30 °C por 6 horas numa câmara húmida com a finalidade das bactérias possam começar a crescer e ativar a motilidade twitching. Imagens de contraste de fase e fluorescência foram adquiridas em lapsos de 15 ou 20 min por um tempo mínimo de 16 horas a 30 °C usando um microscópio de fluorescência invertido Leica DMI-8 (com as especificações descritas acima) e uma magnificação de 100x. A emissão de msfGFP foi adquirido com 100 ms de

tempo de exposição a máxima intensidade de luz de excitação As imagens coletadas foram analisadas usando o software Fiji [175].

3.17 Ensaio de infecção de *X. citri* pelo fago ΦXacm4-11

As linhagens de *X. citri* produzidas neste trabalho (**Tabela 2**) também foram avaliadas pela sua capacidade de ser infectadas pelo fago ΦXacm4-11, seguindo o protocolo estandardizado por nosso laboratório [21]. Para isto, 100 µL de um inoculo de bactérias crescidas overnight em meio 2xTY a 30 °C sob agitação foram utilizados para inocular 3 mL de meio 2xTY fresco e incubado a 30 °C sob agitação até atingir uma DO_{600nm} de 0.3. Após de ter atingido a DO, 500 µL deste cultivo foi misturado com 5 mL de meio KB-agar 0,7% suplementado com 2 mM de CaCl₂ preaquecido e deixado esfriar até uma temperatura de 30 °C, imediatamente a mistura foi espalhada acima de uma placa contendo meio KB-agar 1% suplementado com 2 mM de CaCl₂ previamente solidificado. As placas foram secadas por 10 min e sob elas foi aplicado 5 µL de uma diluição seriada da solução stock do fago ΦXacm4-11 (10⁰ - 10¹⁰) e incubadas a 30 °C por 24 horas.

3.18 Ensaio de microscopia de transmissão eletrônica (TEM)

Amostras de 15 µL (0,1 mg/mL) dos complexos proteicos PilB-PilZ (± ATPγS), PilB-PilZ-FimX (± ATPγS/c-di-GMP) e PilB-PilZ-FimX_{GGDEF-EAL} (± ATPγS/c-di-GMP) previamente purificadas por cromatografia de exclusão molecular (SEC) e do fago ΦXacm4-11 (previamente purificados a partir das placas de lise) foram aplicados sob um paraflim e sob elas foram colocados as grades de cobre cobertos de carbono (Ultrathin carbon film supporter by lacey carbon film on a 400 mesh cooper grid, TED PELLA #01824) e incubados por 1 min. Previamente as grades foram carregadas negativamente utilizando o equipamento glow discharge (PELCO easiGlow) aplicando os seguintes parâmetros: vácuo de 0,37 mBar, plasma de 14 mA e 20 seg de Glow. Após da incubação das grades com as amostras, o excesso de amostra foi retirado cuidadosamente com papel filtro (Qualy Prolab, 501.009), rapidamente lavadas duas vezes com tampão de purificação e secadas com papel filtro Qualy Prolab, 501.009) e imediatamente cobertas com uma solução de 2% de acetato de uranila por 1 min.

Para a visualização dos filamentos do pilus tipo IV em *X. citri*, 5 µL de um cultivo das diferentes cepas de *X. citri* (selvagem e mutantes) com uma D.O_{600nm} de 0,3 foram colocadas sob uma placa com meio KB-agar 1% suplementado com 2 mM de CaCl₂ e incubada por 3 dias a 30 °C. Grade de cobre cobertos com uma fina capa de carbono (CF400-Cu, Electron Microscopy Sciences), previamente carregadas como descrito acima, foram colocadas sob a borda das colônias e incubadas por 1 min, duas lavagens foram

feitas com H_2O_{mQ} , o excesso de água foi retirado cuidadosamente com papel filtro (Qualy Prolab, 501.009), e posteriormente exposta a uma solução de 2% de acetato de uranila por 1 min. Para a análise da interação bateria- fago, 200 μ L de uma cultura de cepas de *X. citri* com uma $D.O_{600nm}$ de 0.3 foram incubadas com 5 μ L de uma solução de fagos com um título de 10^5 PFU/mL por 5 min a temperatura ambiente. As grades foram montadas seguindo o protocolo descrito acima.

As imagens foram coletadas usando um microscópio de transmissão eletrônica MET JEOL JEM 2100 (IQ-USP), FEI Tecnai G20 200 Kv (ICB-USP) ou JEOL 3010 (LNNano-CNPEM). A visualização e análises das imagens adquiridas foram feitas usando o software Fiji [175].

4 Resultados

4.1 Predição dos domínios e da estrutura secundária da proteína PilB

O gene de *Xanthomonas citri* XAC3239 codifica para uma proteína de 587 aminoácidos (~62 kDa) conhecida como PilB (PilB_{XAC3239}), a ATPase responsável pela polimerização do pilus tipo IV (T4P) [137]. A predição da estrutura secundária pelo *Phyre2* [152] e dos domínios estruturais pelo *Pfam* [150] mostram que PilB é uma proteína modular e pertence a superfamília de ATPases relacionadas aos sistemas de secreção tipo II/IV (T2SS e T4SS) [177]. Similar a XpsE, ATPase do T2SS em *X. campestris* [109,178], o PilB possui 4 domínios: dois domínios N-terminal, ND0 (resíduos 13-67) e ND1 (resíduos 81-156), e dos domínios C-terminal, ND2 (resíduos 194-300) e o domínio ATPase (resíduos 316-575) (**Figura 24A**), com uma região desestruturada de aproximadamente de 30 resíduos (160 – 190) entre os domínios ND1 e ND2 (**Figura 24B**). Os domínios ND0 e ND1 em XpsE tem sido descritos como importantes para a regulação da atividade ATPase [109] e a correta função de secreção do T2SS. Estes domínios em XpsE interagem com o domínio citoplasmático de XpsL (outro componente do T2SS) [109,178]. Estes domínios podem ter um rol similar em PilB [90]. Outras ATPases do T2SS como EpsE em *V. cholera* e *V. vulnificus* carecem do domínio ND0 [179–181]. Os domínios C-terminais (ND2 e ATPase) são característicos da família AAA ATPases (ATPases associated with diverse cellular activities) [131], que usualmente funcionam como hexâmetros estimulando uma variedade de atividades celulares como motilidade, degradação de proteínas e captação de DNA exógeno [182–184]. O domínio ND2 possui argininas conservadas ou Arg fingers (**Figura 25**) que promovem a mudança conformacional entre os domínios ND2 e o domínio ATPase e a hidrólise do ATP via interação com o γ -fosfato do ATP [183,185]. O domínio ATPase possui os motivos Walker A (resíduos 337 - 344) e Walker B (resíduos 402 - 407) responsáveis pela ligação e hidrólise do ATP [186,187], respectivamente, e um conservado motivo de quatro cisteínas responsáveis pela ligação de zinco (**Figura 25**) [127,184,188]. Mutações nos resíduos conservados de cisteínas resulta na perda da atividade ATPase de EpsE e da função do T2SS em *V. cholera* [189] e na perda da motilidade tipo twitching em *T. thermophilus* [184]. Adicionalmente aos motivos Walkers A e B, o domínio ATPase de PilB também possui os motivos Asp Box (resíduo 369) e His Box (resíduos 425 e 432) [177], os quais contribuem na formação do bolso catalítico que envolve o ligante [190]. O motivo His Box também faz parte da interface de interação entre as subunidades que estabiliza o anel hexamérico da ATPase [191].

O FimX (codificado pelo gene XAC2398) é uma proteína longa com 680 resíduos de aminoácidos que contem quatro domínios conhecidos como REC, PAS, GGDEF e EAL e PilZ (codificado pelo gene XAC1133) é uma proteína pequena de 117 resíduos de aminoácidos (**Figura 15**). As estruturas secundárias e os domínios das proteínas FimX_{XAC2398} e PilZ_{XAC1133} foram previamente descritas por nosso grupo e também na introdução [135,137].

PilB_Xac_193	TPVVKFVNKVLVDIAIRRGASDIHFEPYEDDYRVRLRIDGGLKNVAKAPVKLNQRIAARLK	
PilB_Gm_181	APVVKLVNLILTDAIKRKASDIHIEPYERSFRVRYRIDGVLYEVMKPPLKLNKNAITSRIK	
PilB_Tt_506	SAAQKFVKQVIREAFLQDASDIHIEPRQNDVQVRLRIDGALRPYSTLPKGALNAVISVVK	
GpsE_Vv_117	APIIKLINAMLGAEIKEGASDIHIEFTEKILSIRFRVDGVLRDVLSPSRKLAPLLVSrvk	
EpsE_Vc_121	APIIKLINAMLGAEIKEGASDIHIEFTEKILSIRFRVDGVLREVLAPSRLKSSLLVSRVK	
	:: *::: :: :*: *****: . : * :*: * . : : : *	
PilB_Xac_253	VMSQLDIAEKRPQDGRIKLNLSTKQIDFRVSTLPTLFGEKVVLRLDGSAAKLGDIDL	Arg Fingers
PilB_Gm_241	IMAELDIAERRLPQDGRIKIKLGQQDMDYRVSVLPTLFGEKVVLRLDKNLQDMDTKL	
PilB_Tt_566	IMGGLNIAEKRLPDGRVRYREG-AIDVDLRLSTLPTVYGEKAVMRLKKASDIPEIEDL	
GpsE_Vv_177	VMAKLDIAEKRPQDGRISLRIG-GRAVDVVRVSTMPSSHGERVVMRLDKNATRLDLHSL	
EpsE_Vc_181	VMAKLDIAEKRPQDGRISLRIG-GRAVDVVRVSTMPSSHGERVVMRLDKNATRLDLHSL	
	::* .*:***.*:*****: . . : * :*:..*: .**..*:*: . : . *	
	WALKER A #####	Asp Box
PilB_Xac_313	GYEPDQQLFLEAIHKPYGMVLVTGPTGSGKTVSlyTALGILNDETRNISTAEDPVEIRL	
PilB_Gm_301	GYEPDALHYFKEAIHKPFGMVLVTGPTGSGKTVSlySALGELNKTENISTAEDPVEFNF	
PilB_Tt_625	GFAPGVFERFKEVISKPYGIFLITGPTGSGKSTTFSILKRIATPDKNQTIEDPVEYEI	
GpsE_Vv_236	GMPVNVHNDNFRHLISRPHGIIlVTGPTGSGKSTTLyAGLQELNSERNILTVEDPIEFDI	
EpsE_Vc_240	GMTAHNHDNFRRLIKRPHGIIlVTGPTGSGKSTTLyAGLQELNSSERNILTVEDPIEFDI	
	* . * * .*.*:..*:***: : : : * : * * * : *	
	WALKER B #####	His Box
PilB_Xac_373	PGVNQVQQNNKRGMTFAAALRSFLRQDPDIIMVGEIRDLETAETIAIAKAQTGHMVLSTLH	
PilB_Gm_361	AGINQVQMHEDIGLNFAAALRSFLRQDPDIIMIGEIRDFETAETIAIAKAALTGHVLVSTLH	
PilB_Tt_685	PGINQTVNPPQAGLTFARALRAFLRQDPDIIMVGEIRDSETAKIATEAALTGHVLIATLH	
GpsE_Vv_295	DGIGQTVNPKVDMTFARGLRAILRQDPDVVMVGEIRDLETAQIAVQASLTGHLVMSTLH	
EpsE_Vc_300	DGIGQTVNPRVDMTFARGLRAILRQDPDVVMVGEIRDLETAQIAVQASLTGHLVMSTLH	
	:.. : .*.** .*:*****:*** ** ** ** : * :*:..*:***	
	Cys Motif	
PilB_Xac_433	TNDAPQTIARLMNMGIAPYNITSSVTLVIAQRLARRLCNNCKRKSTLPDNALLAEGFTPA	
PilB_Gm_421	TNDAPATINRLNMGVEPFLVASAVNLITAQRLARRVCSECKQPEEIPQALIDAGVSPD	
PilB_Tt_745	TNDAAQAITRLDEMGVEPFNISAAALIGVLSQRLVRRVCEHCKVEVKPDPTLRLGLSEA	
GpsE_Vv_356	TNTAVGAIATRLRDMGIEPFLISSSLLGVLAQRLVRTLCQDCKEPEYADKEQRKLFgakkk	
EpsE_Vc_360	TNTAVGAVTRLRDMGIEPFLISSSLLGVLAQRLVRTLCQDCKEPEYADKEQRKLFDSKKK	
	** * : : ** :*: : : : : : : : : : : : : : : : . .	
	Cys Motif	
PilB_Xac_493	QLAAGIELYEAVGCDECT-EGYKGRGTGIYQVMPMTDEIGAIVLEGGNAMQIAEAAQAIGI	
PilB_Gm_481	EG-PSYVCYKGTGCVKCNNTGYKGRVGFYQVMPMLEEIRELIINGANTAEIKRESMRlGI	
PilB_Tt_805	EI-QGARLYKGMGCERCGGTGYKGRYAIHELLVVDDEIRHAIVAGKSATEIKEIARRKGM	
GpsE_Vv_416	D---ALTLYRAKGCCKCNHKGyRGRTGIHELLMVDDKVQELI-HAEAGEQAMDKYIREHT	
EpsE_Vc_420	E---PLILYRATGCPKCNHKGyRGRTGIHELLVDDALQELI-HSEAGEQAMEKHIRATT	
	: * . ** * **.*. : : : : : : : : : . :	
PilB_Xac_553	RDLRQSALMKAANGVTSLAEinRVTKD--	578
PilB_Gm_540	KTMRSGLTKLKEGVTSFEEVLRVTVADD	568
PilB_Tt_864	KTLREDGLYKALQGITTLEEVLARTIE--	890
GpsE_Vv_472	PSIRSDGLDKVLQGVTSLEEVMRVTKES-	499
EpsE_Vc_476	PSIRDDGLDKVRQGITSLEEVMRG----	499
	:*...* * :*:~:~: *	

Figura 25. Alinhamento e resíduos conservados dos domínios C-terminal na família de ATPase de PilB. O alinhamento dos domínios C-terminal (ND2-ATPase) de PilB_{XAC3239} com suas proteínas homólogas revela resíduos altamente conservados importantes para a função das proteínas. Gm: *Geobacter metallireducens* (PDB: 5TSH), Tt: *Thermus thermophilus* (PDB: 5IT5), Vv: *Vibrio vulnificus* (PDB: 4PHT) e Vc: *Vibrio cholerae* (PDB: 1P9R).

4.2 Ensaios de Duplo Híbrido

O ensaio de duplo em levedura representa um método sensível para a identificação e análise de interações proteína – proteína envolvidos em processos biológicos específicos, permitindo a rápida identificação de proteínas que interagem com a proteína específica de interesse [192]. O sistema de duplo híbrido é baseado na natureza modular dos ativadores transcricionais que estão formados por dois domínios: o domínio de interação ao DNA (DNA-binding domain, DNA-BD) e o domínio que recruta a maquinaria da transcrição (activation domain, AD). Quando isolados, estes domínios não interagem entre si e consequentemente a função de ativação da transcrição é perdida. A atividade pode ser recuperada empregando proteínas quimeras contendo domínios que interagem não covalentemente. Assim, um par de proteínas que interagem poderiam aproximar os domínios DNA-BD e AD para reconstituir o ativador transcricional. Em um experimento típico de duplo, híbrido uma proteína expressa em fusão com DNA-BD (isca) e uma proteína fusionada ao AD (presa) são co-expressadas. Quando as duas proteínas, isca e presa, interagem resulta na indução de genes repórter, neste caso, genes que conferem atividade β -galactosidase ou a capacidade de crescer na ausência de histidina e/ou adenina. [162,193].

4.2.1 PilZ interage com a região N-terminal de PilB

Previamente foi mostrado que PilZ_{XAC1133} interage com PilB_{XAC3239} por ensaio de duplo híbrido e far-Western [137]. Com a finalidade de determinar quais dos domínios estruturais de PilB_{XAC3239} (**Figura 24**) interage com PilZ_{XAC1133}, foram realizados experimentos de interação proteína – proteína por ensaios de duplo híbrido em levedura utilizando o gene de PilZ_{XAC1133} clonado no vector pOAD e três fragmentos de PilB_{XAC3239} (PilB₁₋₁₉₀, PilB₃₀₇₋₅₇₈ e PilB₁₉₀₋₅₇₈) (**Figura 24 e 26A**), clonados no vector pOBD. As células de levedura co-transformadas com os vectores PilB₁₋₁₉₀-pOBD, e PilB₃₀₇₋₅₇₈-pOBD, PilB₁₉₀₋₅₇₈-pOBD e PilZ-pOAD, foram inicialmente selecionadas em placas com o meio SC-WL (meio SC na ausência de triptofano e leucina) e posteriormente plaqueadas em meio específico para a detecção da interação SC-WHAL (meio SC na ausência de triptofano, histidina, adenina e leucina) como descrito na secção 3.12.1. Na **Figura 26B** observamos que as células de levedura co-transformadas com os vectores levando as construções PilB₁₋₁₉₀ e PilZ foram capazes de crescer em placas com meio seletivo para interação SC-WHAL, enquanto que, as células que levam as combinações PilB₃₀₇₋₅₇₈ – PilZ e PilB₁₉₀₋₅₇₈ – PilZ não foram capazes de crescer neste meio (**Figura 26B**). Estes resultados mostram que PilZ interage com a região N-terminal de PilB (resíduos 1-190). O resultado de crescimento das células no meio SC-WHLA foi confirmado por ensaios de atividade β -galactosidase detectando-se atividade

significativamente alta nas reações provenientes de células de levedura que levam a combinação PilB₁₋₁₉₀ – PilZ. Por outro lado, nas células levando as outras combinações de PilB (fragmentos PilB₃₀₇₋₅₇₈ e PilB₁₉₀₋₅₇₈) e PilZ ou levando só as construções de PilB tiveram uma atividade β -galactosidase muito baixa (**Figura 26C**). Os resultados mostram pela primeira vez que a região N-terminal de PilB_{XAC3239} (PilB₁₋₁₉₀) está envolvida na interação com PilZ_{XAC1133}.

Figura 26. PilZ interage com o a região N-terminal de PilB. **A)** Domínios de PilB_{XAC3239}, fragmentos usados como presas nos ensaios de duplo híbrido são mostrados com linhas coloreadas: PilB₁₋₁₉₀ (azul), PilB₁₅₉₋₃₀₆(vermelho) e PilB₁₅₉₋₅₇₈ (verde). **B)** Ensaio de duplo híbrido mostrando o crescimento das células de leveduras co-transformadas com os vetores pOAD (levando o inserto PilZ) e pOBD (levando os fragmentos os fragmentos de PilB como indicado) em meio seletivo para os vetores (SC-WL) e em meio seletivo para interação (SC-WHLA). Só células contendo PilZ e PilB₁₋₁₉₀ são capazes de crescer no meio seletivo para interação. **C)** Ensaio de duplo híbrido mostrando atividade β -galactosidase de células de leveduras contendo só os fragmentos de PilB (esquerda) e a combinação PilZ-PilB (direita). Só células contendo a combinação PilZ-PilB₁₋₁₉₀ mostram significativa atividade β -galactosidase.

4.2.2 FimX interage com proteínas de quimiotaxia

FimX é uma proteína que contém os domínios sensores REC e PAS, os quais poderiam estar envolvidos na resposta a sinais ambientais por interação proteína – proteína e ou na captação de moléculas de sinalização. Para testar se a região N-terminal de FimX_{XAC2398} estaria envolvido na interação com outras proteínas ainda não descritas, duas construções FimX₁₋₁₆₃ (domínio REC) e FimX₁₋₂₇₃ (domínios REC-PAS) foram clonados no vector pOBD (isca) e usados em ensaios de duplo híbrido com finalidade de detectar interações com outras proteínas da biblioteca genômica de *X. citri* clonada no vector pOAD (presa) [162]. Na **Tabela 13** se mostram os genes que foram detectados nos ensaios de interação por duplo híbrido, o número do resíduo em que a proteína de interação (presa) começa e o número de vezes que a interação foi encontrada. O fragmento FimX₁₋₁₆₃ (domínio REC) foi observado interagir com três proteínas XAC3213, XAC1996 e XAC4196, enquanto que usando o fragmento FimX₁₋₂₇₃ não foram detectados clones positivos a interação (**Tabela 13**).

Tabela 13. Presas encontradas no ensaio de duplo híbrido usando como isca FimX₁₋₁₆₃ (domínio REC)

Gene	Função	Aminoácido	Nº de vezes encontrado
XAC3213	Methyl-accepting chemotaxis protein	101/116	2
XAC4193	Two-component system sensor protein	443	1
XAC1996	Methyl-accepting chemotaxis protein	95/96	2

Segundo a base de dados KEGG [194] e *Pfam* [150], XAC3213 e XAC1996 pertence à família de proteínas quimoreceptoras conhecida como methyl-accepting chemotaxis proteins (MCPs) (**Figura 27**), que é uma família de proteínas capazes de sentir sinais intracelulares e/ou ambientais, e estão envolvidas na regulação de diversos aspectos da atividade celulares incluindo a formação de biofilme, biossínteses de flagelo, motilidade, degradação de componentes xenobióticos, produção de exopolissacáridos e toxinas [195]. XAC4193 pertence à família de proteínas do sistema de dois componentes (two-component systems) e possui um domínio sensor PAS (que pode estar envolvido com a ligação de cofatores e na interação proteína-proteína), um domínio de fosforilação ou histidine phosphotransfer (HK), um domínio de ligação de ATP (ATP-BD) e um domínio regulador

de resposta (RR) (**Figura 27**). O domínio RR pode ser fosforilado pelo domínio HK (autofosforilação) e em resposta participar na interação com DNA (reguladores transcripcionais), RNA, ligantes ou proteínas regulando vários processos celulares [196–198]. Ensaios funcionais, como formação de biofilme e motilidade twitching, com cepas nocautes de *X. citri* nos genes que codificam para XAC3213, XAC1996 e XAC4196 precisam ser feitos para avaliar as interações aqui encontradas.

Figura 27. Representação gráfica da arquitetura das presas encontradas no ensaio de duplo híbrido. **MCP:** domínio de sinalização em Methyl-accepting chemotaxis protein, **PAS:** domínio PAS, **HK:** domínio phospho-acceptor Histidine Kinase, **ATP-BD:** domínio de ligação de ATP encontrado em proteínas como histidine kinase, DNA girasse, proteína de shock térmico Hsp90 e proteína de reparo de DNA MutL, **RR:** domínio regulador de resposta.

4.3 Expressão e purificação das proteínas FimX, PilB, PilZ e seus fragmentos recombinantes

Diferentes construções das proteínas FimX, PilZ e PilB (**Figura 28**) foram feitas com a finalidade de estudar os domínios das proteínas de forma independente e aumentar as probabilidades de cristalização das mesmas. Todos os fragmentos das proteínas foram clonados nos vectores de expressão pET28a e pET3a (o vector pET28a permite inserir uma cauda de 6xhistidina na região N-terminal das proteínas). As proteínas foram expressas de forma heteróloga usando diferentes cepas de *E. coli* e purificadas como descrito na metodologia (secção 3.5). Na **Figura 29** se mostra o SDS-PAGE de algumas das construções de FimX, PilB e PilZ purificadas após a etapa de cromatografia de exclusão molecular (SEC). As diferentes construções de FimX e PilZ (**Figura 28A e B**) foram solúveis e estáveis nas condições de purificação usadas neste trabalho (**Tabela 11**) obtendo-se um pico único e homogêneo no SEC.

Por outro lado, as diferentes construções de PilB (**Figura 28C**) foram menos solúveis, observando-se que a maior quantidade da proteína ficava na fração insolúvel (pellet) após da lise celular e uma significativa perda das proteínas durante as etapas de purificação. A adição de glicerol no tampão e a purificação a uma temperatura de 10 °C (**Tabela 11**) permitiram obter um maior rendimento na produção das construções de PilB (**Figura 29**). Testes de solubilidade da proteína PilB (inteira) mostram que a proteína é insolúvel em todas as diferentes condições testadas e não conseguimos detectar o PilB na fracção solúvel após da lise celular (**Figura 36B**). As construções de PilB₁₅₆₋₅₇₈ e PilB₁₉₀₋₅₇₈, que contém os domínios ND2 e ATPase, precipitaram imediatamente depois da primeira etapa de purificação (cromatografia de afinidade) observando-se um precipitado branco no tubo de coleta cromatográfica. O PilB₃₀₇₋₅₇₈ (domínio ATPase) foi solúvel, eluindo em vários picos durante a cromatografia de exclusão molecular, indicando que a proteína poderia apresentar vários estados oligoméricos (**Figura 30**).

Figura 28. Esquema das diferentes construções das proteínas FimX, PilZ e PilB. As construções e domínios para FimX (A), PilZ (B) e PilB (C) são mostrados. FimX_{GGDEF-EAL_255-689} possui 13 resíduos a mais no seu extremo N-terminal que o fragmento FimX_{GGDEF-EAL} (resíduos 268-689) e equivale a região compreendida entre os domínios PAS e GGDEF em FimX. "Δ107-117" em PilZ_{Δ107-117} equivale a deleção dos 10 últimos resíduos de PilZ.

Figura 29. SDS-PAGE das diferentes construções das proteínas de interesse purificadas. As diferentes construções das proteínas FimX (A), PilB (B) e PilZ (C) foram purificadas por técnicas standards de cromatografia. O análises por SDS-PAGE da última etapa de purificação por cromatografia de exclusão molecular estão mostrados na figura. Em B, para PilB₁₉₀₋₅₇₈ se mostra o SDS-PAGE das fracções eluídas na cromatografia de afinidade.

Figura 30. Purificação do domínio ATPase de PilB. **A**, Cromatografia de exclusão molecular de PilB₃₀₇₋₅₇₈ numa coluna S200 26 600. **B**, SDS-PAGE das frações que eluíram em **A**. O domínio ATPase de PilB está presente em várias das frações dos picos que eluíram na cromatografia de exclusão molecular pelo que indicaria que se encontra em vários estados oligoméricos. A massa molar teórica para PilB₃₀₇₋₅₇₈ é ~32 kDa.

4.4 Co-expressão e purificação dos complexos proteicos binários FimX-PilZ e PilB-PilZ

Como indicado acima, testes iniciais de purificação de algumas das construções de PilB mostraram que as proteínas eram pouco solúveis com a maior parte da proteína encontrada no pellet após da lise celular. Sabendo que o PilZ interage com o domínio FimX_{EAL} [135] e com a região N-terminal de PilB (secção 4.2.1), foi abordada a estratégia de co-expressão de PilZ (ou PilZ_{Δ107-117}) com diferentes construções de FimX e PilB que envolvam o domínio EAL e a região N-terminal de PilB (**Tabela 10**), respectivamente, com a finalidade de obter os complexos proteicos solúveis, purificá-los e empregá-los em ensaios de cristalização. As combinações usadas na co-transformação das cepas de *E. coli* e as condições para a co-expressão das proteínas são mostradas na **Tabela 10**. Em todos os casos, uma das proteínas a ser co-expressa possui no seu extremo N-terminal uma cauda de 6xhistidina (quando clonada no vector pET28a (**Figura 19**) ou no sitio MCS1 do vector pDuet-1 (**Figura 20**)) a qual permite a co-purificação dos complexos. As metodologias seguidas para a purificação dos complexos proteicos estão descritas na **Tabela 11**. Resumidamente, a primeira etapa de purificação foi realizada por cromatografia de afinidade numa coluna HiTrap carregada com níquel acoplada a um sistema de cromatografia líquida (AKTApurifier). A eluição dos complexos ligados na coluna foi realizada por gradiente de imidazol e analisadas por SDS-PAGE. As frações mais puras foram juntadas e dialisadas frente a quatro litros do tampão de eluição (sem imidazol) e tratadas com trombina por quatro horas para a clivagem da cauda de 6xhistidina. Após a clivagem, as amostras foram submetidas a uma segunda etapa de purificação por cromatografia de exclusão molecular (**Tabela 11**).

4.4.1 Co-expressão e purificação dos complexos de FimX e PilZ e seus fragmentos

A co-expressão de diferentes combinações das construções de FimX, FimX_{GGDEF-EAL} (resíduos 268-689), FimX_{GGDEF-EAL_255-689} (possui 13 resíduos a mais no seu extremos N-terminal que a construção FimX_{GGDEF-EAL} correspondente aos aminoácidos entre os domínios PAS e GGDEF) , FimX_{PAS-GGDEF-EAL} e FimX (inteira) (**Figura 28A**), clonadas no vector pET28a e as construções de PilZ (PilZ e PilZ_{Δ107-117} (carece dos 10 últimos resíduos) (**Figura 28B**) clonados no vector pET3a [137] foram testadas. Todas as combinações FimX-PilZ co-eluíram juntas nas cromatografias de afinidade e exclusão molecular. Na **Figura 31** e **33** são apresentados os cromatogramas e as análises das frações que eluíram nas cromatografias por SDS-PAGE dos complexos FimX_{GGDEF-EAL}-PilZ e FimX_{GGDEF-EAL}-PilZ_{Δ107-117} e FimX_{13aaGGDEF-EAL}-PilZ_{Δ107-117}, onde se pode observar que os complexos são estáveis durante as etapas de purificação.

Figura 31. Purificação dos complexos FimX^{GGDEF-EAL}-PilZ e FimX^{GGDEF-EAL}-PilZ_{Δ107-117}. **A)** SDS-PAGE da purificação do complexo FimX^{GGDEF-EAL}-PilZ, M: Marcador de massa molar, NI: Não induzido, I: Induzido, 1-2: Frações que eluíram na cromatografia de afinidade, 3-5: frações que eluíram na cromatografia de exclusão molecular (S200). **B)** SDS-PAGE da purificação do complexo FimX^{GGDEF-EAL}-PilZ_{Δ107-117} por cromatografia de exclusão molecular (S200), NI: Não induzido. I: Induzido, 1-5: Frações do pico que eluíram na cromatografia de exclusão molecular.

No caso da purificação do complexo FimX-PilZ (proteínas inteiras), observamos que as proteínas eluem juntas na cromatografia de afinidade (**Figura 32**), mas na cromatografia de exclusão molecular se observa uma dissociação parcial do complexo já que se observa um pequeno pico correspondente a PilZ sozinha e um pico maior ao complexo FimX-PilZ. Isto pode ser indicativa de uma menor afinidade entre o PilZ e FimX. Uma outra possibilidade é que a dissociação é somente mais evidente neste caso, devido à maior diferença de volume de eluição entre FimX e PilZ na coluna de SEC. Todos os complexos obtidos foram concentrados e submetidos a triagens de ensaios de cristalização como descrito na secção 3.10 na presença e ausência de c-di-GMP. Somente obtivemos cristais do complexo FimX^{GGDEF-EAL₂₅₅₋₆₈₉}-PilZ_{Δ107-117} na presença de c-di-GMP (**Tabela 14 e Figura 38**).

Figura 32. Purificação do complexo FimX-PilZ. **A)** Cromatograma da purificação do complexo FimX-PilZ por cromatografia de exclusão molecular, "*" e "#" indicam os picos que eluíram durante a corrida. FimX leva uma cauda N-terminal de 6xhistidina. **B)** SDS-PAGE da purificação do complexo FimX-PilZ, M: Marcador de massa molar, NI: Não induzido, I: Induzido, 1-2: Frações que eluíram na cromatografia de afinidade, "*": Frações do primeiro pico que eluiu na cromatografia de exclusão molecular observando-se a presença de FimX e PilZ, "#": Frações do segundo pico que eluiu na cromatografia de exclusão molecular observando-se a presença PilZ.

Figura 33. Purificação do complexo FimX^{GGDEF-EAL}₂₅₅₋₆₈₉-PilZ_{Δ107-117}. **A)** Cromatograma da purificação por afinidade em coluna HiTrap de 5mL carregada com níquel, (*) indica as frações que eluíram após do início do gradiente com imidazol (linha vermelha), NI: não induzida, I: induzida, P: pellet do lisado, S: sobrenadante do lisado. **B)** Cromatograma da purificação por exclusão molecular utilizando uma coluna Superdex 75 26/600, (*) indica as frações do pico que eluíram na cromatografia, M: Marcador de massa molar.

4.4.2 Co-expressão e purificação dos complexos PilB e PilZ e seus fragmentos

As regiões gênicas que codificam para duas construções da região N-terminal de PilB contendo os domínios ND0 e ND1, PilB₁₂₋₁₆₃ (construção que carece das regiões N e C-terminal preditas para ser desestruturadas) e PilB₁₋₁₉₀ (construção usada nos ensaios de duplo híbrido), e para o PilZ (inteira) foram clonadas no vector pET28a. Como descrito acima, o gene que codifica para PilZ foi previamente clonado no vector pET3a [137]. Células de *E. coli* BL21 DE3 foram co-transformadas com ambos os vetores e as condições de expressão e purificação dos complexos estão mostrados na **Tabela 10** e **11** respectivamente. As **Figura 34** e **35** mostram os cromatogramas e as análises por SDS-PAGE das frações que eluíram nas cromatografias e indicam que ambos os complexos PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ e PilB₁₋₁₉₀-PilZ são estáveis e podem ser co-purificados por cromatografia de afinidade e posteriormente por cromatografia de exclusão molecular.

Figura 34. Purificação do complexo PilZ-PilB₁₂₋₁₆₃. **A)** Cromatograma de afinidade em coluna HiTrap de 5 mL carregada com níquel, (*) indica as frações que eluíram após do início do gradiente com imidazol (linha vermelha), M: marcador de massa molar, NI: Não induzido, I: Induzido, S: Sobrenadante, P: Pellet. **B)** Cromatograma de exclusão molecular utilizando uma coluna Superdex 200 26/600, (*) indica as frações que do pico que eluíram na cromatografia, ND: complexo PilZ-PilB₁₂₋₁₆₃ com a cauda de 6x histidina não clivada.

Figura 35. Purificação do complexo PilB₁₋₁₉₀ – PilZ. **A)** Cromatograma da purificação por afinidade em coluna HiTrap de 5mL carregada com níquel, (*) indica as frações que eluíram após do início do gradiente com imidazol (linha vermelha). PilB₁₋₁₉₀ possui no seu extremo N-terminal uma cauda de 6xhistidina. M: marcador de massa molar, NI: não induzida, I: induzida, S: sobrenadante do lisado, P: pellet do lisado. **B)** Cromatograma da purificação por exclusão molecular utilizando uma coluna Superdex 200 26/600, M: marcador de massa molecular, D: Complexo PilB₁₋₁₉₀-PilZ com a cauda 6xHis digerido com trombina overnight antes de aplicar na coluna de exclusão molecular, (*): Indica as frações do pico que eluíram na cromatografia.

Como mencionado acima, testes de solubilidade da proteína PilB (inteira) mostram que ela é insolúvel nas diferentes condições testadas (**Figura 36B**). Sabendo que PilZ pode formar um complexo estável com a região N-terminal de PilB, foi tomada a estratégia de co-expressar as proteínas para tentar obter o PilB solúvel. Na **Figura 36A** se mostra que PilB na presença de PilZ (co-expressão) é solúvel pelo que PilZ poderia ajudar na estabilidade de PilB.

Figura 36. SDS-PAGE da expressão de PilB na presença e ausência de PilZ. Observa-se que PilB é solúvel na presença de PilZ. A) Co-expressão de PilB e PilZ em *E. coli* BL21 DE3, M: Marcador de massa molecular, NI: não induzido, I: Induzido, S: Fração solúvel, P: Pellet. B) Expressão de PilB em BL21 DE3, NI: Não induzido, I: Induzido, S: Fração solúvel, P: Pellet. Temperatura de expressão em ambos os casos é 18 °C.

Para ter um melhor controle dos níveis de expressão das proteínas, PilB e PilZ foram clonados no vector de co-expressão pETDuet (**Figura 20**) e as condições de co-expressão e purificação do complexo estão mostradas na **Tabela 10** e **11**. Neste caso, a PilB é expressa com uma cauda N-terminal de 6xhistidina. Na **Figura 37** se mostra a purificação do complexo PilB-PilZ, onde se observa que as proteínas PilB e PilZ formam um complexo estável e co-eluem na cromatografia de afinidade e em seguida na de exclusão molecular.

Figura 37. Purificação do complexo PiIB – PiIZ. **A)** Cromatograma da purificação por afinidade em coluna HiTrap de 5 mL carregada com níquel, (*) indica as frações que eluíram após do início do gradiente com imidazol (linha vermelha), antes do início do gradiente a coluna foi lavada com 10% do tampão B, M: marcador de massa molar, NI: Não Induzida, I: Induzida, S: Sobrenadante do lisado, P: pellet do lisado. **B)** Cromatograma da purificação por exclusão molecular utilizando uma coluna Superose 6 10/300, M: marcador de massa molecular, 12-17: Indica as frações do pico (*) que eluíram na cromatografia, cada fração foi coletada em volumes de 1 mL em cada uma delas se observa a presença de PiIB e PiIZ.

4.5 Cristalização de proteínas

As proteínas sozinhas e em complexos previamente purificadas foram submetidas a ensaios de cristalização na ausência e na presença dos seus ligantes, c-di-GMP para FimX e ATP γ S para PilB. As triagens foram feitas pela técnica de difusão de vapor em gota sentada (*sitting drop*) usando kits de cristalização da Hampton Research (Crystal Screen 1 e 2, Index 1 e 2, SalRX e PEG/Ion HT) em placas de 24 poços e incubas a 18°C. As construções das proteínas sozinhas e em complexo que cristalizaram, assim como as suas melhores condições de cristalização estão resumidas na **Tabela 14**. Após o refinamento das condições de cristalização, os melhores cristais foram usados para obter os dados de difração de raios X. Os cristais do domínio ATPase de PilB (PilB₃₀₇₋₅₇₈) na ausência e na presença do análogo ATP γ S não produziram cristais melhores após o refinamento (**Figura 39**).

Tabela 14. Condições de cristalização e concentração das proteínas em estudo

Proteínas	Concentração	Condição de cristalização
Complexo FimX_{GGDEF-EAL_255-689}-PilZ_{Δ107-117}-c-di-GMP	10 mg/mL	Crystal Screen 20: 0.1M MÊS pH 6.5, 1.6 M Mg ₂ SO ₄
Complexo PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ	5 mg/mL	Index 5: 0,1 M Hepes pH7,5; 2,0 M Ammonium Sulfate Crystal Screen 4: 0,1 M Tris pH 8,5; 2,0 M Ammonium Sulfate.
PilB₃₀₇₋₅₇₈ (Domínio ATPase)	8 mg/mL	Index 94: 0,2 M Sodium citrate tribasic dihydrate; 20% w/v Polyethyleneglicol 3,350 Index 77: 0,2 M Lithium Sulfate monohydrate; 0,1 Bis-tris pH 5,5; 25% w/v Polyethyleneglicol 3,350
PilB₃₀₇₋₅₇₈ (Domínio ATPase) + ATPγS	8 mg/mL	PEG/Ion 44: 0,2 M Ammonium phosphate dibasic; 20% w/v Polyethyleneglicol 3,350

Figura 38. Cristais do complexo FimX_{GGDEF-EAL_255-289}-PilZ_{Δ107-117}-C-di-GMP.

Figura 39. Cristais do domínio ATPase de PilB (PilB₃₀₇₋₅₇₈). **A)** e **B)** cristais do domínio ATPase de PilB na ausência de ATP_γS. **C)** cristais do domínio ATPase de PilB na presença de ATP_γS.

Figura 40. Cristais do complexo PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ. **A)** e **B)** cristais nativos do complexo PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ. **C)** cristais do complexo PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ marcados com Se-Met.

4.6 Coleta e processamento dos dados cristalográficos

Os dados cristalográficos do complexo FimX_{GGDEF-EAL_255-689}-PilZ_{Δ107-117}-c-di-GMP (**Figura 38**) foram coletados no difratômetro do Instituto de Química –USP. O complexo foi cristalizado no grupo espacial $P4_2 2_1 2$ difratando com uma resolução de até 3,4 Å. As fases foram resolvidas por substituição molecular usando como modelos as estruturas previamente cristalizadas do complexo PilZ-FimX_{EAL}-c-di-GMP (PDB: 4FOU) [135] e o modelo gerado para o domínio GGDEF pelo Phyre2 [152].

Dados de difração para os cristais do complexo PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ (**Figura 40**) foram coletados na linha MX2 no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS – Campinas, SP). Foram coletados 2 conjuntos de dados no grupo espacial $P1 2_1 1$ e o melhor conjunto de dados difratou a 1,7 Å de resolução. As fases foram resolvidas pela técnica de single wavelength anomalous dispersion (SAD) a partir de um cristal do complexo marcado com SeMet, utilizando um comprimento de onda de 0,979 Å que corresponde ao pico máximo de sinal anômalo do Selênio. O complexo PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ possui 8 metioninas que foram substituídas por SeMet, o que foi suficiente para gerar a dispersão anômala adequada para determinar as fases. O modelo gerado do complexo PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ-SeMet foi usado para resolver as fases dos conjuntos de dados nativos do complexo por substituição molecular.

Os dados do complexo FimX_{GGDEF-EAL_255-689}-PilZ_{Δ107-117}-c-di-GMP foram processados usando o programa HKL2000 [155] e os dados do complexo PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ foram processados com o XDS [159]. Todas as substituições moleculares foram feitas utilizando o programa Phaser [157] do pacote de programas Phenix [158]. As fases do complexo PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ-SeMet foram resolvidas usando o programa Autosol [160] do pacote de programas Phenix. Os refinamentos das estruturas foram feitos com COOT e Phenix. Os resultados da coleta, processamento e refinamentos das estruturas cristalográficas estão mostrados na **Tabela 15**.

Tabela 15. Processamento e refinamento dos dados de difração de raios X dos complexos cristalizados

	<i>PilB</i> ₁₂₋₁₆₃ – <i>PilZ</i>		<i>FimX</i> _{GGDEF-EAL_255-689} – <i>PilZ</i> _{Δ107-117} – <i>c-di-GMP</i>
	<i>Native Crystal</i>	<i>SeMet Crystal</i>	<i>Native Crystal</i>
Coleta de dados			
<i>Grupo espacial</i>	P1 2 ₁ 1	P1 2 ₁ 1	P4 ₂ 2 ₁ 2
<i>Cela unitária</i>			
<i>a</i> (Å)	38,73	38,73	96,1
<i>b</i> (Å)	121,18	121,18	96,1
<i>c</i> (Å)	62,76	62,76	146,33
α (°)	90	90	90
β (°)	99	99	90
δ (°)	90	90	90
<i>Resolução</i> (Å)	50 – 2,0	50 – 1,7	50 – 3,4
<i>R_{merge}</i>	15,2 (125)	8,1 (91,2)	7,8 (55,5)
<i>I/σI</i>	10,13 (1,72)	8,78 (1,28)	11 (3,3)
<i>Completeza</i> (%)	99,5 (98,6)	94,6 (91,5)	99,9 (95)
<i>No. Reflexões</i>	226586	211040	161198
<i>Reflexões únicas</i>	44979	117377	13547
<i>Redundância</i>	5 (4,8)	1,8 (1,8)	11,8 (2,9)
<i>No. De imagens</i>	2789	599	360
<i>Comprimento de onda</i> (Å)	1,45866	0,97889	1,54178
<i>X-ray beamline</i>	W01B-MX2	W01B-MX2	IQ-USP
Refinamento			
<i>No. Reflexões</i>	39155		9962
<i>R_{work}/R_{free}</i>	0,20/024		0,22/0,27
<i>No. Resíduos ou átomos</i>			
<i>Proteína</i>	507		345
<i>Ligando</i>	0		1
<i>Água</i>	486		0
<i>Ramachandran plot</i> (%)			
<i>Favoráveis</i>	97,7		93,29
<i>Permitidas</i>	2,3		6,1
<i>Não permitidas</i>	0		0,61
<i>R.m.s deviations</i>			
<i>Comprimento da ligação</i> (Å)	0,007		0,011
<i>Ângulo da ligação</i> (°)	0,96		1,3

4.7 Estrutura do complexo FimX_{GGDEF-EAL_255-689}-PilZ_{Δ107-117}-c-di-GMP

Os cristais obtidos do complexo FimX_{GGDEF-EAL_255-689}-PilZ_{Δ107-117}-c-diGMP difrataram a 3,4 Å no grupo espacial $P4_2 2_1 2$ e as fases foram resolvidas pela técnica de substituição molecular como descrito na secção 4.6. A construção FimX_{GGDEF-EAL_255-689}, **Figura 28A**) possui os domínios GGDEF e EAL e 13 resíduos N-terminais que correspondem ao linker entre os domínios PAS e GGDEF (resíduos 255-267) predita para formar uma hélice α (Phyre2). A construção PilZ_{Δ107-117} carece dos 10 últimos resíduos (**Figura 28B**) preditos para ser desestruturados e não importantes para a interação com FimX_{EAL} [135,137]. A análise do mapa de densidade eletrônica permitiu resolver a estrutura da proteína PilZ_{Δ107-117} (resíduos 9-106) e do domínio EAL (resíduos 438-689) e seu ligante c-di-GMP. Infelizmente, não foi encontrada densidade eletrônica correspondente ao domínio GGDEF (**Figura 41**); isto provavelmente devido a flexibilidade do domínio que se pode encontrar em diferentes orientações dentro do cristal. Similar problema foi encontrado para o cristal de FimX_{GGDEF-EAL} de *P. aeruginosa* [141], onde não se encontrou densidade eletrônica para resolver a estrutura do domínio GGDEF. Considerando o peso molecular do complexo FimX_{GGDEF-EAL_255-689}-PilZ_{Δ107-117} (~60 kDa), o coeficiente Matthews do cristal é 2,77 e o conteúdo de solvente é 55,6%. Novas construções do fragmento FimX_{GGDEF-EAL} que aumentam ou diminuem a região N-terminal foram desenhadas para tentar estabilizar e fixar o domínio GGDEF. As novas construções começaram nos resíduos 233, 245, 250 e 260 (**Tabela 4**) e foram co-expressas junto com PilZ_{Δ107-117}, purificadas (**Tabela 9 e 10**) e submetidos a triagens de cristalização na presença de c-di-GMP. Infelizmente cristais não foram obtidos com estas novas construções.

Figura 41. Mapa de densidade eletrônica $2F_o - F_c$ (contornado a $1,0 \sigma$) e rede cristalina encontrado no cristal do complexo FimX_{GGDEF-EAL_255-689}-PilZ_{Δ107-117}-c-di-GMP. **A**, Densidade eletrônica da PilZ e da região N-terminal do domínio EAL, mostrando os resíduos Glu438, Glu439 e Glu440 do domínio EAL. Densidade eletrônica não foi encontrada para o domínio GGDEF. **B**, Rede cristalina mostrando em cartoon a disposição das moléculas do complexo FimX_{EAL}-PilZ (FimX_{EAL} em magenta e PilZ em amarelo). Os espaços existentes entre as unidades assimétricas do cristal devem hospedar os domínios GGDEF desordenados.

A estrutura aqui resolvida é essencialmente equivalente à estrutura cristalográfica do complexo FimX_{EAL}-PilZ-c-di-GMP previamente publicada por nosso grupo [135]. A unidade assimétrica contém uma molécula do complexo FimX_{EAL}-PilZ_{Δ107-117} com c-di-GMP ligado e a estrutura do heterodímero é mostrado na **Figura 42**. A área da interface de interação é 585 Å^2 calculado pelo software PISA [199] e os aminoácidos que fazem parte da interface de interação são mostrados na **Figura 42C**. A densidade eletrônica permitiu localizar ao ligante c-di-GMP adotando a mesma conformação *anti-syn* previamente observada nas estruturas cristalográficas dos complexos FimX_{EAL}-c-di-GMP e FimX_{EAL}-PilZ-c-di-GMP [135] (**Figura 43B**), os resíduos de FimX_{EAL} e PilZ que contribuem na ligação do c-di-GMP são mostrados na **Figura 43A**. A comparação das subunidades da estrutura cristalográficas dos complexos FimX_{EAL}-PilZ-c-di-GMP (PDB: 4FOU e a estrutura aqui resolvida) mostra que são muito similares (**Figura 44**) com um r.m.s.d. para o alinhamento de FimX_{EAL} e PilZ de $0,57 \text{ Å}$ e $0,51 \text{ Å}$, respetivamente. A principal diferença entre as estruturas é a ausência de densidade eletrônica para os resíduos 426-437 do domínio FimX_{EAL} na estrutura aqui resolvida (**Figura 41A e 44**). Estes resíduos foram observados na estrutura do complexo FimX_{EAL}-PilZ-c-di-GMP (PDB: 4FOU) os quais contribuem na interação com PilZ [135] (**Figura 44**).

Figura 42. Estrutura cristalográfica do complexo FimX_{EAL}-PilZ_{Δ107-117}. Modelo em cartoon (A) e em surface (B) do complexo FimX_{EAL}-PilZ_{Δ107-117}-c-di-GMP, mostrado FimX_{EAL} em magenta, PilZ em amarelo e c-di-GMP em vermelho. C) Resíduos encontrados na interface de interação do complexo FimX_{EAL}-PilZ_{Δ107-117}.

Figura 43. Resíduos de FimX_{EAL} e PilZ que interagem com c-di-GMP. A) Resíduos de FimX_{EAL} (magenta) e de PilZ (amarelo) que fazem parte do sítio de ligação do c-di-GMP. A maior parte dos resíduos que fazem contatos com c-di-GMP provém de FimX_{EAL} com poucas contribuições de PilZ. **B)** Mapa de densidade eletrônica 2F0-FC (contorneado a 1,0 σ) observado para c-di-GMP.

Figura 44. Superposição das estruturas cristalográficas dos complexos FimX_{EAL}-PilZ-c-di-GMP. Para o complexo FimX_{EAL}-PilZ-c-di-GMP (PDB:4FOU) as subunidades FimX_{EAL}-c-di-GMP e PilZ são mostrados em azul claro e verde, respectivamente. As subunidades do complexo FimX_{EAL}-PilZ_{Δ107-117}-c-di-GMP resolvidas a partir do cristal de FimX_{GGDEF-EAL_255-689}-PilZ_{Δ107-117}-cdiGMP são mostrados em magenta, amarelo e vermelho, respectivamente.

4.8 Estrutura do complexo PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ

O complexo PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ foi cristalizado no grupo espacial P1 2₁ 1, e a estrutura foi resolvida através da técnica SAD, usando um cristal do complexo proteico marcado com Se-Met a uma resolução de 1.7 Å como descrito na secção 4.6. A unidade assimétrica contém duas moléculas do complexo PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ (cadeias AC e BD) (**Figura 45**), e a estrutura de um dos heterodímeros do complexo e a interface de interação são mostrados em detalhe na **Figura 46**.

Figura 45. Moléculas do complexo PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ encontradas na unidade assimétrica. Na unidade assimétrica do cristal do complexo PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ foram encontradas duas moléculas deste complexo cadeia AC e BD.

A área da interface de interação é 1026 Å² e 1018 Å² calculado usando o software PISA [199] para as cadeias AC e BD do complexo PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ, respectivamente. Um alinhamento estrutural entre os dois fragmentos de PilB (cadeia A e C) e os dois PilZ (cadeia C e D) na unidade assimétrica mostram que são muito similares com um r.m.s.d. de 0,61 e 0,37 Å para os átomos dos C^α, respectivamente. A densidade eletrônica encontrada no complexo não permitiu modelar os 10 últimos resíduos de PilB (resíduos 154-163) e os primeiros 9 resíduos de PilZ. Os aminoácidos que formam parte da interface de interação são mostrados na **Figura 46C e D**. Os resíduos de PilB Asp22, Asp73, Glu132 e Arg103 fazem contatos por ponte salina com os resíduos do PilZ Arg41, Lys66, Arg79 e Met117 respectivamente. Os resíduos do PilB Asp22, Ala61, Gly68, Leu71, Asp73, Ala76, Glu132, Leu71, Asp78, Gln81, Arg103 participam em pontes de hidrogênio com os resíduos Arg41, Gln76, Thr70, Lys66, Lys30, Arg79, Ile68, Phe28, Ser110, Met117 e Thr108 do PilZ.

Figura 46. Estrutura cristalográfica do complexo PiLB₁₂₋₁₆₃-PiLZ. Modelo em cartoon (A) e em surface (B) do complexo PiLB₁₂₋₁₆₃-PiLZ. PiLB₁₂₋₁₆₃ é mostrado em verde e PiLZ em amarelo. (C) Resíduos encontrados na interface de interação do complexo PiLB₁₂₋₁₆₃-PiLZ. (D) Mapa de densidade eletrônica 2F_o-F_c (contornado a 1.0 σ), mostrando alguns dos resíduos que fazem parte da interface de interação do complexo PiLB₁₂₋₁₆₃-PiLZ (PiLB₁₂₋₁₆₃ em amarelo e PiLZ em azul).

A estrutura cristalográfica da proteína PilZ sozinha e em complexo com o domínio FimX_{EAL} foram previamente resolvidas por nosso grupo [135,137]. O alinhamento estrutural entre as estruturas das PilZ (sozinha e em complexo com FimX_{EAL}) e com a PilZ do complexo PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ são muito similares com um r.m.s.d. de 0.65 Å e 0.47 Å, respectivamente, mostrando que as interações com FimX_{EAL} e PilB₁₂₋₁₆₃ não afetam o enovelamento global da proteína exceto na sua região externa C-terminal (**Figura 47B**). A região no extremo C-terminal de PilZ formada pelos resíduos 107-117 não foi modelada nas estruturas previamente resolvidas pela ausência de densidade eletrônica (**Figura 47B**). Na estrutura cristalográfica do complexo PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ a região C-terminal de PilZ (resíduos 107-117) é claramente visível (**Figura 46D**) e se encontra fazendo contatos importantes e extensivos com PilB. Na **Figura 47A**, se mostra que a cadeia lateral do último resíduo de PilZ, a Met117, entra num sulco hidrofóbico formado principalmente por resíduos de PilB (Leu72, Phe77, Phe101, Phe108, Leu100 e Ile134) e de PilZ (Phe28 e Trp69). Isto é consistente com os resultados previamente descritos por nosso grupo que apontaram que a região C-terminal de PilZ é importante para a interação com PilB mas não com FimX [137].

Figura 47. A conservada região C-terminal de PilZ e importante para a interação com PilB₁₂₋₁₆₃. **A)** A Interface de interação do complexo PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ onde se mostra que o último resíduo de PilZ a Met117 entra num core hidrofóbico formados por resíduos hidrofóbicos de PilB₁₂₋₁₆₃ (verde) e PilZ (amarelo). **B)** Comparação das estruturas de PilZ previamente cristalizadas: PilZ sozinha (azul), PilZ do complexo PilZ-FimX_{EAL}-C-di-GMP (laranja) e PilZ do complexo PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ (amarelo), mostrando que a estrutura 3D da proteína não é afetada pela interação de FimX_{EAL} e do PilB₁₂₋₁₆₃, mas a região C-terminal de PilZ (resíduos 107-117), que não são visualizadas nas estruturas do PilZ sozinha e em complexo com FimX_{EAL} são visualizadas em complexo com PilB₁₂₋₁₆₃.

A estrutura do PilB₁₂₋₁₆₃ pode ser claramente dividida em dois domínios estruturais identificados como ND0 e ND1 (**Figura 48A**). O domínio ND0 (aminoácidos 12-68) está formado por quatro hélices α ($\alpha 1$ - $\alpha 4$) enquanto que o domínio ND1 (aminoácidos 75-163) é um domínio α/β formado por uma folha β antiparalela ($\beta 1$ - $\beta 3$) rodeada por 3 hélices α ($\alpha 5$ - $\alpha 7$) e 3 hélices curtas ($\eta 1$ - $\eta 3$) (**Figura 48**). A maioria dos resíduos que fazem parte da interface de interação com PilZ se encontram no domínio ND1 com poucas contribuições do domínio ND0 provenientes dos resíduos Arg18, Asp22, Ala61, Ala63, Val65 e Gly68 (**Figura 46** e **Tabela 16**). Os resíduos Asp22, Ala61 de PilB estão realizando pontes salinas e ligações de hidrogênio com o resíduo Arg41 do PilZ.

Figura 48. A região N-terminal de PilB está formado pelos domínios ND0 e ND1. A) Estrutura cristalográfica do PilB₁₂₋₁₆₃ mostrando presença de dois domínios estruturais ND0 (laranja) e ND1 (verde). **B)** Topologia da região N-terminal de PilB, observando-se que o domínio ND0 está formado por 4 hélices α e o domínio ND1 está formado por uma folha β (com duas paralelas e uma antiparalela) rodeada por hélices α .

Tabela 16. Resíduos encontrados na interface de interação do complexo PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ. Os resíduos foram identificados usando o servidor PISA (<http://www.ebi.ac.uk>). Em PilZ se identificam os resíduos que fazem parte dos motivos conservados na família de ortólogos de PilZ como descrito na referência [137].

Complexo PilB ₁₂₋₁₆₃ -PilZ		
Resíduos de PilZ (cadeia C)		Resíduos de PilB ₁₂₋₁₆₃ (cadeia A)
Resíduos	Motivos em PilZ	Resíduos
Tyr22	MI	Arg18
Met26	MI	Asp22
Pro27	MI	Ala61
Phe28	MI	Ala64
Val29	MI	Ala65
Lys30	MI	Gly68
Arg41	-	Met69
Met43	-	Pro70
Leu44	-	Leu71
Lys66	MII	Leu72
Ile68	MII	Asp73
Trp69	MII	Ser75
Thr70	MII	Ala76
Thr71	MII	Phe77
Pro72	MII	Asp78
Ala75	-	Gln81
Gln76	-	Leu100
Arg79	-	Phe101
Gln86	-	Arg103
Thr108	-	Gly104
Ser110	MV	Phe108
Asp111	MV	Glu132
Lys112	MV	Pro133
Pro113	MV	Ile134
Thr114	MV	
Thr116	MV	
Met117	MV	

4.9 Alinhamento estrutural de homólogos da região N-terminal de PilB

Uma procura de estruturas com topologia similar ao PilB₁₂₋₁₆₃ pelo DALI server [200] revela uma alta similaridade estrutural com a região N-terminal das ATPases associadas aos T4P e T2SS. A **Tabela 17** e a **Figura 49B** mostram que PilB₁₂₋₁₆₃ tem a mesma topologia que a região N-terminal de MshE [128], a ATPase do sistema MSHA-T4P em *V. cholerae*, com um Z score de 14,2 e um r.m.s.d. global de 3,1 Å e com XspE [109], a ATPase do T2SS, de *X. campestris*, com um Z-score de 14.1 e um r.m.s.d. global de 3.3 Å (**Figura 49B**), apesar de ter uma baixa identidade de sequência de 20% (**Figura 49A**). Outra proteína com uma topologia muito similar ao domínio ND1 do PilB é a região N-terminal do GpsE (também chamada EpsE) [181], ATPase do T2SS em *V. vulnificus*, com um Z score de 6,9 e um r.m.s.d. de 1,9 Å, mas com 8% de identidade na sequência e que carece do domínio ND0 (**Figura 49**).

Tabela 17. Proteínas com similar enovelamento à região N-terminal de PilB encontradas com DALI server

Proteína	PDB	Z score	RMSD	% Identidade
MshE _{Nt}	5HTL	14,2	3,1	20
XpsE _{Nt}	2D28	14,2	3,3	21
GspE _{Nt}	4PHT	6,9	1,9	8

A

B

Figura 49. Alinhamento estrutural da região N-terminal dos homólogos de PilB_{XAC3239}. Alinhamento de sequência (A) e das estruturas cristalográficas (B) da região N-termina de PilB (resíduos 1-156) com MshE (PDB: 5HTL), XpsE (PDB: 2D28) e GspE (PDB: 4PHT). Em B é mostrado o side view e top view.

4.10 PilBNt é uma proteína desenovelada na ausência de PilZ

Como mostrado acima, a região N-terminal de PilB apresenta a mesma topologia que o domínio N-terminal de XpsE a qual foi cristalizada em duas conformações, uma aberta (PDB: 2D27) e outra fechada (PDB: 2D28). A diferença entre as duas conformações se encontra nas duas primeiras hélices do domínio ND0 mostrando-se que a XpsE_{Nt} apresenta uma alta dinâmica talvez importante para regulação e o funcionamento do sistema [109]. Com a finalidade de saber se a região N-terminal de PilB apresenta diferentes estados conformacionais, foram feitos ensaio de RMN. Os espectros 2D de ¹H-¹⁵N HSQC adquiridos a 298 K com a proteína PilB₁₂₋₁₆₃ marcada uniformemente com ¹⁵N mostraram que ela é uma proteína parcial ou totalmente desenovelada (**Figura 50A**), pois quase todos os sinais se agrupam na região compreendida entre 8 – 8,3 ppm na dimensão ¹H [201,202]. Um fato que chama a atenção é a melhora do espectro do PilB₁₂₋₁₆₃ em temperaturas mais baixas (278 K) (**Figura 50B**), o que indica que PilB, na ausência de PilZ, experimenta uma dinâmica intermediária. Quando os espectros de ¹H-¹⁵N HSQC do PilB₁₂₋₁₆₃ (¹⁵N) foram adquiridos a 298 K na presença do PilZ (não marcada) se observa um espalhamento dos picos de PilB no espectro na dimensão de ¹H (**Figura 50C**) indicando que PilZ induz o enovelamento da mesma.

Figura 50. Espectro ^1H - ^{15}N HSQC de PilB_{NL}. **A)** Espectro de PilB₁₂₋₁₆₃ adquirido a 298 K. **B)** Espectro de PilB₁₂₋₁₆₃ adquirido a 278 K. **C)** Espectro de PilB₁₂₋₁₆₃ na presença de PilZ na proporção de 1:1,5 adquirido a 278 K. **D)** Superposição dos espectros de PilB₁₂₋₁₆₃ (**A**) e de PilB₁₂₋₁₆₃ + PilZ (**C**).

4.11 Resíduos conservados de PilZ importantes para a interação com PilB

Para determinar quais resíduos de PilZ são importantes para a formação do complexo PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ, foram feitos ensaios de interação proteína-proteína por cromatografia de exclusão molecular analítica (SEC, S200 10/300 GL) usando mutantes específicas de PilZ: PilZ_{Y22A}, PilZ_{F28A}, PilZ_{W69A}, PilZ_{M117G}, PilZ_{ΔMet117} e PilZ_{Δ107-117} (deleção dos últimos 11 aminoácidos: LTTSDKPHTM). Estes resíduos foram observados a formar parte da interface de interação com PilB na estrutura cristalográfica do complexo PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ (**Figura 46C**), além de ser resíduos conservados na família de ortólogos de PilZ [137]. O perfil das eluições junto com os SDS-PAGE das frações dos picos que eluíram na SEC são mostradas na **Figura 51**. Os mutantes PilZ_{Y22A} e PilZ_{F28A} não afetam a interação com o PilB, formando um complexo estável verificado pela observação que ambas proteínas eluem juntas na SEC (**Figura 51A e B**). Porém, a interação de PilB_{Nt} com as mutantes PilZ_{W69A}, PilZ_{M117G}, PilZ_{ΔMet117} e PilZ_{Δ107-117} foi reduzida. Como se observa na **Figura 51C-E**, estes mutantes de PilZ não co-eluem com PilB_{Nt}, mostrando que aqueles resíduos são importantes para a estabilidade da interação com PilB.

Figura 51. Análise das interações entre PilB_{Nt} e mutantes de PilZ por SEC. Análise de PilB_{Nt} (linha azul), mutantes de PilZ (linha vermelha) e a mistura de PilB_{Nt} – PilZ_{mutante} (linha preta) por SEC (S200 10/300 GL). A formação do complexo PilB_{Nt}-PilZ não foi afetada quando foram usadas as mutantes PilZ_{F28A} e PilZ_{Y22A}, como se observa em (A) e (B) respectivamente. As mutações em PilZ Δ 107-117, Δ M117 e W69A afeta drasticamente a interação de PilZ com PilB_{Nt} (C, E e F). D) A mutação M117G também afeta a interação de PilZ com PilB_{Nt}, mas no perfil de eluição se aprecia que existe uma interação fraca entre ambas proteínas. As frações obtidas de cada ensaio foram analisadas por SDS-PAGE e são mostrados do lado de cada cromatograma.

4.12 Comparação das estruturas cristalográficas dos complexos PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ e PilZ-FimX_{EAL}

A comparação das estruturas cristalográficas dos complexos PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ e PilZ-FimX_{EAL} (PDB: FOU4) [135] mostra a que PilZ compartilha a mesma interface de interação com PilB₁₂₋₁₆₃ e com FimX_{EAL} (**Figura 52**). Como mencionado acima, a principal diferença entre as duas estruturas do PilZ nos complexos PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ e PilZ-FimX_{EAL} é a presença dos 10 últimos resíduos de PilZ (resíduos 107-117) importantes para a interação com PilB₁₂₋₁₆₃ (**Figura 47**) mas não com FimX_{EAL}. A **Tabela 18** mostra os resíduos que formam parte da interface de interação em ambos complexos. Como descrito na introdução, PilZ_{XAC1133} pertence à família de ortólogos PilZ PA2960/XAC1133 que não ligam c-di-GMP, mas que apresentam cinco motivos conservados (M1 – MV) [137] (**Figura 16**). Os resíduos de PilZ que formam os motivos MI e MII se encontram em ambas interfaces de interação e o motivo MV só faz parte da interface de interação com PilB (**Tabela 18**).

Figura 52. Superposição das estruturas cristalográficas dos complexos PilZ-FimX_{EAL}-c-di-GMP e PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ. A) Estrutura cristalografica do complexo PilZ-FimX_{EAL}-c-di-GMP. **B)** Estrutura cristalografica do complexo PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ. **C)** Superposição de ambos complexos em **A** e **B** mostrando que o PilZ compartilha a mesma interface de interação com FimX_{EAL} e PilB₁₂₋₁₆₃. A proteína PilZ (laranja no complexo PilZ-FimX_{EAL} e amarelo no complexo PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ) de ambas estruturas estão similarmente orientadas.

Tabela 18. Resíduos de PilZ que formam parte da interface de interação com FimX_{EAL} e PilB₁₂₋₁₆₃. Em vermelho se mostram os resíduos de PilZ comuns em ambos complexos e (*) indica os resíduos que são importantes para a formação dos complexos.

Complexo PilZ-FimX _{EAL}		Complexo PilB ₁₂₋₁₆₃ -PilZ	
PilZ Resíduos	Motivos	PilZ Resíduos	Motivos
Lys18		Tyr22	MI
Pro19		Met26	MI
Tyr22	MI	Pro27	MI
Tyr25	MI	Phe28	MI
Met26	MI	Val29	MI
Pro27	MI	Lys30	MI
Phe28*	MI	Arg41	
Va29	MI	Met43	
Lys30	MI	Leu44	
Leu44		Lys66	MII
Gly45		Ile68	MII
Val67	MII	Trp69*	MII
Ile68	MII	Thr70	MII
Trp69	MII	Thr71	MII
Thr70	MII	Pro72	MII
Thr71	MII	Ala75	
Pro72	MII	Gln76	
Gln86		Arg79	
Leu104	MIV	Gln86	
Ala105		Thr108	
Gly106		Ser110*	MV
		Asp111*	MV
		Lys112*	MV
		Pro113*	MV
		Thr114*	MV
		Thr116*	MV
		Met117*	MV

4.13 O ATP induz uma mudança conformacional no complexo PilB-PilZ

Como mostrado acima, tivemos sucesso na expressão e purificação de PilB (inteira) de forma solúvel quando co-expressa com PilZ (**Figura 36**). O PilB_{XAC3239} é a ATPase responsável pela polimerização do T4P e é predita para ser uma proteína hexamérica como foi descrito para outras ATPases homologas como EpsE em *V. cholerae* [203], XpsE em *X. campestris* [178] e PilB em *T. thermophilus* [188]. Essas ATPases possuem os motivos Walker A (GPTGSKT, resíduos 337 – 344) e Walker B (IIMVGE, resíduos 402 – 407) responsáveis pela ligação e hidrólise do ATP, respectivamente [190] (**Figura 25**).

Ensaio de SEC analítica utilizando uma coluna de Superose 6 GL 10/300 (GE Healthcare) mostraram que na presença de um análogo não hidrolisável de ATP (ATP γ S) o perfil do pico de eluição do complexo PilB-PilZ tem um deslocamento para esquerda em comparação com o perfil de eluição na ausência do ATP γ S (**Figura 53**). Este deslocamento no pico de eluição pode nos indicar que a ligação do ATP γ S induz uma mudança conformacional no complexo PilB-PilZ e/ou uma estabilização do complexo.

Figura 53. O ATP induz uma mudança conformacional no complexo PilB-PilZ. **A)** Análise por SEC do complexo PilB-PilZ (50 μ M) na ausência (linha preta) e na presença (linha vermelha) de 100 μ M ATP γ S, onde se observa um deslocamento para esquerda no pico de eluição do complexo PilB-PilZ. **B)** Análise por SDS-PAGE das frações (12-17) dos picos que eluíram na cromatografia de exclusão molecular na ausência e na presença de ATP γ S. Cada fração foram coletadas em volume de 1 mL.

Uma dupla mutante do PilB nos motivos Walker A (K343A) e no Walker B (E407A) foi produzida como descrita na secção 3.4 e co-expressa com PilZ. As mutações nos sítios de ligação e hidrólises do ATP no PilB não afeta a interação com o PilZ como esperado já que ambas proteínas podem ser co-purificadas seguindo a metodologia descrita na **Tabela 11**. Porém, os ensaios de SEC analítica com o complexo PilB_{K343A/E407A}-PilZ mostram que a presença do análogo do ATP (ATP γ S) não induz uma mudança observável no perfil de eluição do complexo (**Figura 54**).

Figura 54. O ATP não induz uma mudança conformacional no complexo PilB_{K343A_E407A}-PIZ. Análise por SEC do complexo PilB_{K343A_E407A}-PilZ (50μM) na ausência (linha preta) e na presença (linha vermelha) de 100μM ATP γ S observando-se que o ATP γ S não produz uma mudança no perfil de eluição no complexo PilB_{K343A_E407A}-PilZ. No lado esquerdo o análises por SDS-PAGE das frações (13-19) dos picos que eluíram na cromatografia de exclusão molecular na ausência e na presença de ATP γ S. Cada fração foram coletadas em volume de 1 mL.

4.14 FimX, PilZ e PilB formam um complexo ternário *in vitro*

Previamente, nosso grupo mostrou por ensaios de far-Western que PilB, PilZ e uma construção de FimX que contem aos domínios GGDEF e EAL (FimX_{GGDEF-EAL}) podem interagir formando um complexo ternário [137]. Com a comparação das estruturas cristalográficas dos complexos PilZ-FimX_{EAL} e PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ mostrados na secção 4.12, onde se observa que PilZ compartilha a mesma interface de interação com PilB₁₂₋₁₆₃ e com FimX_{EAL} (**Figura 52**), aquela observação da formação do complexo ternário PilB-PilZ-FimX_{GGDEF-EAL} poderia ser difícil de raciocinar. Para investigar este fenômeno em mais detalhe, foram feitos ensaios de interação proteína – proteína por SEC usando diferentes construções de PilB em complexo com o PilZ misturadas com diferentes construções do FimX em concentrações equimolares.

Inicialmente foram testadas as duas construções de PilB_{Nt} em complexo com PilZ, PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ e PilB₁₋₁₉₀-PilZ, e duas construções de FimX, FimX_{EAL} e FimX_{GGDEF-EAL}. As proteínas previamente purificadas foram misturadas em concentrações equimolares (100 µM), incubadas por 30 min no gelo e aplicadas numa coluna S200 10/300 GL equilibrada com 50 mM de Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 1 mM de MgCl₂, 1 mM β-mercaptoetanol. As **Figura 55 e 56** mostram que FimX_{EAL} e FimX_{GGDEF-EAL} podem interagir com os complexos PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ e PilB₁₋₁₉₀-PilZ formando um complexo ternário estável co-eluído na SEC. Não foi observada alguma influência na formação do complexo ternário PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ-FimX_{EAL} pela presença de c-di-GMP (**Figura 55A**). Após a observação da formação dos complexos ternários, surgiu a dúvida se outras construções maiores de FimX que contém também os domínios REC de PAS também poderiam interagir com o complexo PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ. Interessantemente, na **Figura 57** se mostra que as construções de FimX (inteira) e FimX_{PAS-GGDEF-EAL} não formariam um complexo ternário estável com PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ tanto na ausência e na presença de c-di-GMP.

Figura 55. Complexo ternário $\text{PilB}_{\text{NT}}\text{-PilZ-FimX}_{\text{EAL}}$. Análise por SEC (S200 10/300 GL) da formação do complexo ternário $\text{PilB}_{12-163}\text{-PilZ-FimX}_{\text{EAL}}$ (**A**) e $\text{PilB}_{1-190}\text{-PilZ-FimX}_{\text{EAL}}$ (**B**). A linha azul corresponde aos complexos binários $\text{PilB}_{12-163}\text{-PilZ}$ (**A**) e $\text{PilB}_{1-190}\text{-PilZ}$ (**B**). A linha vermelha corresponde a mistura de FimX_{EAL} com o complexo $\text{PilB}_{12-163}\text{-PilZ}$ (**A**) e a mistura de FimX_{EAL} com o complexo $\text{PilB}_{1-190}\text{-PilZ}$ (**B**), onde se observa um deslocamento no pico de eluição na cromatografia de exclusão molecular. A linha preta em **A** corresponde a mistura de FimX_{EAL} com o complexo $\text{PilB}_{12-163}\text{-PilZ}$ na presença de c-di-GMP, onde não se observa mudanças no pico de eluição do complexo ternário. A linha verde em **A** e **B** corresponde ao domínio FimX_{EAL} sozinho. No lado direito de cada cromatograma se mostra o SDS-PAGE das frações que eluíram na cromatografia de exclusão molecular mostrando que as proteínas $\text{PilB}_{12-163}\text{-PilZ-FimX}_{\text{EAL}}$ e $\text{PilB}_{1-190}\text{-PilZ-FimX}_{\text{EAL}}$ co-eluem e formam um complexo ternário estável.

Figura 56. Complexo ternário PilB_{Nt}-PilZ-FimX_{GGDEF-EAL}. Análise por SEC (S200 10/300 GL) da formação do complexo ternário PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ-FimX_{GGDEF-EAL} (**A**) e PilB₁₋₁₉₀-PilZ-FimX_{GGDEF-EAL} (**B**). A linha vermelha corresponde aos complexos binários PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ (**A**) e PilB₁₋₁₉₀-PilZ (**B**). A linha azul corresponde a FimX_{GGDEF-EAL} em A e B. A linha preta corresponde a mistura de FimX_{GGDEF-EAL} com o complexo PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ (**A**) e a mistura de FimX_{GGDEF-EAL} com o complexo PilB₁₋₁₉₀-PilZ, onde se observa um deslocamento no pico de eluição na cromatografia de exclusão molecular. No lado direito de cada cromatograma se mostra o SDS-PAGE das frações que eluíram na cromatografia de exclusão molecular mostrando que as proteínas PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ-FimX_{GGDEF-EAL} e PilB₁₋₁₉₀-PilZ-FimX_{GGDEF-EAL} co-eluem e formam um complexo estável

Figura 57. O Complexo PilB_{NI}-PilZ não forma um complexo ternário estável com FimX e FimX_{PAS-GGDEF-EAL}. Análise por SEC (S200 10/300 GL) da formação do complexo ternário entre o complexo PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ e FimX_{PAS-GGDEF-EAL} e com FimX (inteira) na presença e ausência de c-di-GMP. A linha vermelha corresponde ao perfil de eluição de FimX_{PAS-GGDEF-EAL} (A e B) e FimX (inteira) (C e D). A linha azul em todos os cromatogramas corresponde ao perfil de eluição do complexo PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ (A – D). A linha preta corresponde a mistura equimolar de FimX_{PAS-GGDEF-EAL} com o complexo PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ (A) e de FimX (inteira) com o complexo PilB₁₋₁₉₀-PilZ (C). A linha verde corresponde a mistura equimolar de FimX_{PAS-GGDEF-EAL} com o complexo PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ (B) e de FimX (inteira) com o complexo PilB₁₋₁₉₀-PilZ (D) na presença de 200 μ M de c-di-GMP. Em E e F se mostra o análises por SDS-PAGE das frações que eluíram nos cromatogramas B e D respectivamente onde se observa que as proteínas não co-eluem pelo que não formam um complexo estável como observado com as construções menores de FimX (FimX_{EAL} e FimX_{GGDEF-EAL}).

Com os resultados observados acima nos perguntamos se os domínios REC e PAS de FimX são importantes para a formação do complexo ternário. Ensaio de interação proteína – proteína para a obtenção do complexo ternário foram feitos usando o complexo PilB-PilZ (proteínas inteiras) e três construções de FimX: FimX_{EAL}, FimX_{GGDEF-EAL} e FimX (inteira) previamente purificadas como descrito na **Tabela 11**. Dado que o PilB só é solúvel na presença do PilZ (**Figura 36**), as duas proteínas foram co-expressas e purificadas como descrito na **Tabela 10 e 11**. A FimX (inteira) e o complexo PilB-PilZ foram misturados em concentrações equimolares (30 μ M) num volume final de 600 μ L e incubada no gelo por 30 min. Um volume de 500 μ L desta mistura foi aplicada numa coluna de exclusão molecular Superose 6 10/300 GL equilibrada com 20 mM Tris-HCl pH 7,0, 50 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM β -mercaptoetanol. Na **Figura 58** pode se observar que o complexo PilB-PilZ pode interagir com FimX formando um complexo ternário PilB-PilZ-FimX. Observamos a eluição de um pico na cromatografia de exclusão num volume menor que o volume de eluição das proteínas FimX e o complexo PilB-PilZ não misturadas. A análise por SDS-PAGE das frações que contém os picos que eluíram na cromatografia mostra que o pico principal (maior) contém as três proteínas PilB, PilZ e FimX, as quais co-eluem formado um complexo ternário PilB-PilZ-FimX. A presença do ATP γ S e c-di-GMP induz um deslocamento para esquerda (menor volume) no pico de eluição do complexo ternário (**Figura 58**) o que poderia indicar uma mudança conformacional ou a estabilização do complexo ternário pela presença dos ligantes.

Figura 58. Complexo ternário PilB-PilZ-FimX. **A)** Análise por SEC do complexo ternário PilB-PilZ-FimX na presença e na ausência do ATP γ S / c-di-GMP. As linhas roxa e preta correspondem ao complexo PilB-PilZ obtido previamente por co-expressão e ao FimX respectivamente. As linhas vermelha e azul correspondem ao complexo ternário PilB-PilZ-FimX na ausência e na presença de ATP γ S e c-di-GMP, respectivamente, obtido pela mistura do complexo PilB-PilZ e FimX na proporção 1:1 (30 μ M cada proteína), onde se observa que a presença do ATP γ S e c-di-GMP (100 μ M de cada ligante) desloca o pico de eluição do complexo ternário para a esquerda. **B)** SDS-PAGE das frações dos picos eluídos no SEC (**A**) do complexo PilB-PilZ-FimX $\pm$ ATP γ S / c-di-GMP. Cada fração foi coletada em volumes de 1 mL.

Outras construções de fragmentos menores de FimX (FimX_{EAL} e FimX_{GGDEF-EAL}) também foram testadas na formação do complexo ternário com PilB-PilZ por SEC. As proteínas foram misturadas em concentrações equimolares como descrito acima. Nas **Figura 59** e **60** se observa que FimX_{GGDEF-EAL} e FimX_{EAL} podem interagir com o complexo PilB-PilZ, mas estes complexos ternários são instáveis tanto na presença ou na ausência dos seus ligantes ATP γ S/c-di-GMP. Este resultado pode nos indicar que outros contatos dos domínios REC e/ou PAS de FimX com PilB e/ou PilZ poderiam estar envolvidos na formação e estabilidade do complexo ternário.

Figura 59. Complexo ternário PilB-PilZ-FimX_{GGDEF-EAL}. **A)** Análise por SEC do complexo PilB-PilZ-FimX_{GGDEF-EAL} na presença de 100 μ M ATP γ S / c-di-GMP e a sua comparação com os perfis de eluição de PilB-PilZ $\pm$ ATP γ S e FimX_{GGDEF-EAL}. **B)** SDS-PAGE das frações que eluíram da mistura de PilB-PilZ e FimX_{GGDEF-EAL}.

Figura 60. O Domínio FimX_{EAL} não forma um complexo ternário estável com o complexo PilB-PilZ. A) Análise por SEC (S6 10/300 GL) da mistura (1:1) do complexo PilB-PilZ (30 μ M) com FimX_{EAL} (30 μ M) na presença (linha vermelha) e na ausência (linha preta) de ATP_γS e c-di-GMP (100 μ M de cada ligante), cada fração foi coletada em volumes de 1 mL. **B)** SDS-PAGE das frações que eluíram no SEC (**A**) mostrando-se que o domínio FimX_{EAL} não forma um complexo ternário estável com o complexo PilB-PilZ na presença e na ausência de ATP_γS e c-di-GMP, já que as três proteínas não co-eluíram.

As proteínas PilB, PilZ (ambas as proteínas inteiras) e os fragmentos de FimX (FimX_{EAL}, FimX_{GGDEF-EAL} e FimX (inteira), também foram co-expressas e purificadas (**Tabela 10 e 11**) com a finalidade de obter os complexos ternários diretamente do lisado das células de *E. coli* e avaliar a sua estabilidade. Os fragmentos de FimX possuem uma cauda de 6xhistina no seu extremo N-terminal. Na **Figura 61A** observamos que as proteínas PilB-PilZ e FimX_{GGDEF-EAL} podem ser co-purificadas na cromatografia de afinidade (primeira etapa de purificação), mas após a sua aplicação na coluna de exclusão molecular (Superose 6 10/300 GL) o complexo parece ser desmontado observando-se uma separação das proteínas PilB, PilZ e FimX_{GGDEF-EAL} (**Figura 61B**). Por outro lado, na **Figura 61C e D** observamos que o complexo obtido pela co-expressão de PilB, PilZ e FimX (inteira) é mais estável após as etapas de purificação por cromatografia de afinidade

(Figura 61C) e de exclusão molecular (Figura 61D). O complexo ternário PilB-PilZ-FimX parece ser ainda mais estável na presença dos ligantes c-di-GMP-FimX. Quando a co-expressão foi feita com o fragmento FimX_{EAL}, PilB e PilZ não co-eluem junto com FimX_{EAL} na cromatografia de afinidade (dados não mostrados). Estes resultados podem fortalecer a ideia de que contatos entre os domínios REC, PAS e GGDEF e PilB e/ou PilZ poderiam ser importantes para a formação do complexo ternário.

Figura 61. Co-expressão e purificação do complexo ternário PilB-PilZ-FimX. As proteínas PilB, PilZ e o fragmento FimX_{GGDEF-EAL} foram co-expressão e purificadas por cromatografia de afinidade (A) e exclusão molecular (B) na presença e ausência ATP_γS/c-di-GMP. As proteínas PilB, PilZ e o FimX (inteira) foram co-expressão e purificadas por cromatografia de afinidade (C) e exclusão molecular (D) na presença e ausência ATP_γS/c-di-GMP. Observa-se que o complexo PilB-PilZ-FimX é mais estável durante as etapas de purificação que o complexo PilB-PilZ-FimX_{GGDEF-EAL}.

Na **Figura 62**, observamos que mutações nos resíduos conservados K343A (Walker A) e E407A (Walker B) do domínio ATPase de PilB não afetam as interações do complexo PilB-PilZ com FimX (inteira), e a presença de c-di-GMP tem um efeito no perfil de eluição da mistura PilB-PilZ-FimX possivelmente pelo efeito sobre FimX como descrito na secção 4.19 (**Figura 73A**) Uma comparação dos perfis de eluição dos complexos ternários PilB-PilZ-FimX (**Figura 58A**) e PilB_{K343A/E407A}-PilZ-FimX (**Figura 62A**), sugere que as mutações K343A e E407A poderiam afetar a oligomerização do complexo PilB-PilZ-FimX (**Figura 63**) e que a presença de FimX poderia ser também importante para isto.

Figura 62. Mutações pontuais nos sítios de ligação e hidrólises do ATP do PilB afeta a oligomerização do complexo ternário. A) Análise por SEC (S6 10/300 GL) da mistura (1:1) do complexo PilB_{K343A/E407A}-PilZ (30 μ M) com FimX (30 μ M) na presença (linha preta) e na ausência (linha vermelha) de c-di-GMP (100 μ M). Mostrando que FimX e PilB_{K343A/E407A}-PilZ interagem e foram um complexo ternário estável. As linhas verde e azul correspondem ao perfil de eluição do complexo PilB_{K343A/E407A}-PilZ (na presença de 50 μ M de ATP γ S) e do FimX respectivamente. **B)** SDS-PAGE das frações que eluíram no SEC (**A**) observando-se que as proteínas PilB_{K343A/E407A}, PilZ e FimX co-eluem formando um complexo ternário. As frações foram coletados em volume de 1 mL.

Figura 63. Comparação do perfil de eluição dos complexos PilB-PilZ-FimX e PilB_{K343A/E407A}-PilZ-FimX. Comparação dos perfis de eluição da cromatografia de exclusão molecular dos complexos PilB-PilZ-FimX e PilB_{K343A/E407A}-PilZ-FimX na presença dos seus ligantes (c-di-GMP e ATP γ S), mas as mutações no PilB poderiam estar afetando a sua oligomerização.

4.15 FimX e PilB não interagem na ausência de PilZ

Na secção 4.14 demosmos que PilB, PilZ e FimX podem interagir formando um complexo ternário estável, mas a natureza específica dessas interações ainda é difícil de compreender na luz das comparações das estruturas cristalográficas dos complexos PilZ-FimX_{EAL} e PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ onde a interface de interação do PilZ com FimX_{EAL} e PilB₁₂₋₁₆₃ é a mesma (**Figura 52**). Uma possível hipótese é que há outros contatos entre FimX e PilB e/ou PilZ envolvendo os outros domínios de FimX (REC, PAS e GGDEF). Para responder se FimX e PilB poderiam interagir diretamente analisamos as interações de PilB₁₂₋₁₆₃ com dois fragmentos de FimX (FimX_{EAL} e FimX_{GGDEF-EAL}) por SEC. As proteínas PilB₁₂₋₁₆₃ – FimX_{EAL} e PilB₁₂₋₁₆₃ – FimX_{GGDEF-EAL} foram misturados em proporções equimolares (100 μ M) em um volume final de 150 μ L e incubados no gelo por 30 min. Desta mistura, 100 μ L foram aplicados numa coluna Superdex 200 10/300 equilibrada com 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 1 mM de MgCl₂, 1 mM β -mercaptoetanol. Na **Figura 64** se mostra o perfil de eluição da mistura das proteínas e das proteínas sozinhas junto com o análise por SDS-PAGE das frações que eluíram em cada corrida, onde se pode observa que as combinações testadas PilB₁₂₋₁₆₃ – FimX_{EAL} e PilB₁₂₋₁₆₃ – FimX_{GGDEF-EAL} não interagem na ausência de PilZ nas as condições testadas. Experimentos futuros devem ser feitas empregando a FimX inteira e o domínio ATPase de PilB.

Figura 64. PilB e FimX não interagem na ausência de PilZ. **A)** Análise por SEC da interação entre PilB₁₂₋₁₆₃ e FimX_{EAL} por SEC (S200 10/300 GL). As linhas vermelhas e azul mostram o perfil de eluição de PilB₁₂₋₁₆₃ e FimX_{EAL} respectivamente. A linha preta mostra o perfil de eluição da mistura (1:1) de PilB₁₂₋₁₆₃ e FimX_{EAL}. **B)** Análise por SEC da interação entre PilB₁₂₋₁₆₃ e FimX_{GGDEF-EAL} por SEC (S200 10/300 GL). As linhas vermelhas e azul mostram o perfil de eluição de PilB₁₂₋₁₆₃ e FimX_{GGDEF-EAL}. A linha preta mostra o perfil de eluição da mistura (1:1) de PilB₁₂₋₁₆₃ e FimX_{GGDEF-EAL}. **C)** SDS-PAGE das frações que contém os picos que eluíram nos cromatogramas **A** e **B** tanto das proteínas sozinhas e as misturas. Não interações foram observadas entre PilB₁₂₋₁₆₃ e FimX_{EAL} ou FimX_{GGDEF-EAL}. Cada fração foi coletada em volume de 1 mL.

4.16 Efeito de duas mutações pontuais em PilZ na formação do complexo ternário

PilZ apresenta vários resíduos altamente conservados (**Figura 16**) e alguns deles tem sido reportados como importantes para a interação com FimX e a função do T4P [21,135,137]. Uma mutação no resíduo F28 (MI) de PilZ afeta a interação com FimX_{EAL} [135] mas não afeta a interação com PilB (**Figura 51**). Por outro lado, uma mutação no resíduo W69 (MII) de PilZ não afeta a interação com FimX_{EAL} [135] mas sim afeta a interação com PilB (**Figura 51**). Ambos os resíduos F28 e W69 se encontram na mesma interface de interação com FimX_{EAL} e PilB₁₂₋₁₆₃ (**Figura 46C** e **Tabela 18**). Com a finalidade de saber se estas mutantes afetam a formação do complexo ternário observado na **Figura 56**, foram feitos ensaio de interação proteína - proteína por SEC. Para isto, as proteínas PilZ_{F28A}, PilZ_{W69A}, PilB₁₋₁₉₀ e FimX_{GGDEF-EAL} foram purificadas separadamente seguindo o protocolo descrito na **Tabela 11**. As proteínas foram misturadas em concentrações equimolares (100 µM) e a mistura foi aplicada numa coluna S200 10/300 GL equilibrada 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM β-mercaptoetanol. A **Figura 65** mostra que a mutante PilZ_{F28A} não afeta a formação do complexo ternário PilB₁₋₁₉₀-PilZ-FimX_{GGDEF-EAL} (**Figura 65A**), mas a mutante PilZ_{W69A} afeta a estabilidade do complexo ternário (**Figura 65B**). Estes resultados podem indicar que no contexto do complexo ternário a interface de interação entre PilB e PilZ poderia ser mantida e novos contatos entre PilZ e FimX (não observados na estrutura cristalográfica PilZ-FimX_{EAL}) e entre PilB e FimX poderiam ser formados.

Figura 65. Resíduos conservados do PilZ importantes para a estabilidade do complexo ternário. Análise por SEC (S200 10/300 GL) da formação do complexo ternário de dois resíduos conservados de PilZ F28 e W69 importantes para a interação com FimX e PilB respectivamente. **A)** SEC do complexo ternário PilB₁₋₁₉₀-PilZ_{F28A}-FimX_{GGDEF-EAL}, observando-se que a mutação F28A no PilZ não afeta a estabilidade do complexo ternário. No lado esquerdo o SDS-PAGE das frações que eluíram no SEC observando-se que as três proteínas co-eluem. **B)** SEC da mistura PilB₁₋₁₉₀-PilZ_{W69A}-FimX_{GGDEF-EAL}, observando-se que a mutação W69A no PilZ afeta a estabilidade do complexo ternário. No lado esquerdo o SDS-PAGE das frações que eluíram no SEC observando-se que as três proteínas não co-eluem. Cada fração foi coletada em volume de 1 mL.

4.17 Analisando as interações de PilB-PilZ-FimX por RMN

Espectros de ^1H - ^{15}N HSQC foram realizados empregando PilZ (^{15}N) na presença e na ausência de PilB₁₂₋₁₆₃ e FimX_{EAL} não marcados (^{14}N). Para a aquisição dos espectros na presença de FimX_{EAL} e PilB₁₂₋₁₆₃, as proteínas foram misturadas na mesma proporção (1:1) e purificados por cromatografia de exclusão molecular (S200) em tampão 20 mM Tris-HCl pH 7,0, 50 mM NaCl, 1 mM MgCl₂.

A comparação das estruturas cristalográficas de PilZ sozinha e em complexo com FimX_{EAL} e PilB₁₂₋₁₆₃ mostra que o PilZ não sofre uma variação brusca de conformação quando em complexo exceto pela interação da região C-terminal de PilZ com PilB (**Figura 47B**). Na **Figura 66** se mostra o espectro de PilZ marcada isotopicamente com ^{15}N (**Figura 66A**) na ausência e na presença de FimX_{EAL} (**Figura 66B**) e PilB₁₂₋₁₆₃ (**Figura 66C**) não marcadas (^{14}N), onde se observa que ocorrem mudanças substanciais no espectro da mesma quando em complexo com PilB₁₂₋₁₆₃ (**Figura 66E**) e com FimX_{EAL} (**Figura 66D**). Um detalhe a ser notado é o aparecimento do sinal $^1\text{H}_{\epsilon 1}$ do único triptofano de PilZ (W69) na presença de PilB₁₂₋₁₆₃ (**Figura 66C e E**), além de ser observado deslocamentos em vários dos picos do espectro. Ao correlacionarmos este fato com a estrutura cristalográfica do complexo PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ (**Figura 46**) pode-se justificar o seu aparecimento pelo fato de que a cadeia lateral do triptofano de PilZ encontrasse na interface de interação formado um sulco hidrofóbico (**Figura 47**). O espectro de PilZ na presença de FimX_{EAL} (**Figura 66B e D**) é caracterizada pelo desaparecimento de vários dos picos observados no espectro de PilZ sozinha (**Figura 66A**). A comparação dos espectros adquiridos dos complexos PilZ(^{15}N)-PilB₁₂₋₁₆₃(^{14}N) e PilZ(^{15}N)-FimX_{EAL}(^{14}N) mostram significativas diferenças entre ambos os espectros (**Figura 66F**).

Figura 66. Espectro ^1H - ^{15}N HSQC de PilZ na presença de FimX_{EAL} e PilB₁₂₋₁₆₃. **A**, Espectro ^1H - ^{15}N HSQC de PilZ (300 μM) adquirido a 298 K. **B**, Espectro ^1H - ^{15}N HSQC do complexo PilZ-FimX_{EAL}. **C**, Espectro ^1H - ^{15}N HSQC do complexo PilZ-PilB₁₂₋₁₆₃. **D**, Superposição dos espectros de PilZ (A) e do complexo PilZ-FimX_{EAL} (B). **E**, Superposição dos espectros de PilZ (A) e do complexo PilZ-PilB₁₂₋₁₆₃ (C). **F**, Superposição dos espectros adquiridos do complexo PilZ-FimX_{EAL} (B) e do complexo PilZ-PilB₁₂₋₁₆₃ (C). Os complexos PilZ(^{15}N)-FimX_{EAL}(^{14}N) e PilZ(^{15}N)-PilB₁₂₋₁₆₃(^{14}N) foram misturados na proporção 1:1 e purificados por SEC.

Como foi mostrado acima, PilZ pode interagir com PilB e com FimX formando complexos binários estáveis, além de se observar a formação do complexo ternário FimX-PilZ-PilB por experimentos de exclusão molecular. No entanto, a sobreposição das estruturas cristalográficas não deixa claro como PilZ interage com as duas proteínas PilB e FimX, uma vez que o PilZ compartilha a mesma interface de interação nas duas estruturas cristalográficas. Experimentos com a adição de diferentes concentrações FimX_{EAL}(¹⁴N) ao complexo PilZ(¹⁵N)-PilB₁₂₋₁₆₃(¹⁴N) co-purificado foram adquiridos. Como podemos observar na **Figura 67**, vários picos do espectro de ¹H-¹⁵N HSQC do complexo PilZ(¹⁵N)-PilB₁₂₋₁₆₃(¹⁴N) desaparecem (provavelmente pela formação de um complexo de 54kDa) e alguns sofrem deslocamentos na presença de FimX_{EAL} (**Figura 67D**).

Figura 67. Espectro ¹H-¹⁵N HSQC do complexo PilZ (¹⁵N)-PilB₁₂₋₁₆₃ na presença de FimX_{EAL}. Espectro ¹H-¹⁵N HSQC do complexo PilZ(¹⁵N)-PilB₁₂₋₁₆₃(¹⁴N) na presença de 20 μM (A) e 40 μM (B) e 300 μM (C) de FimX_{EAL} (1:1) não marcado (¹⁴N). (D) Zoom de uma região do espectro em C, onde se podem observar os desaparecimentos e deslocamentos dos picos. As proteínas PilZ (¹⁵N) e PilB₁₂₋₁₆₃ (¹⁴N) foram misturados e purificados por SEC. Concentração do complexo PilZ(¹⁵N)-PilB₁₂₋₁₆₃(¹⁴N) é 300 μM.

Espectros de ^1H - ^{15}N HSQC empregando PilB₁₂₋₁₆₃ marcada com ^{15}N complexada com PilZ não marcada (^{14}N) também foram adquiridos. Na **Figura 68** se mostra o espectro do complexo PilB₁₂₋₁₆₃(^{15}N)-PilZ(^{14}N) na ausência e na presença de FimX_{EAL} (proporção 1:1), onde se observa uma mudança significativa no espectro na presença de FimX_{EAL} com desaparecimentos (provavelmente pela formação de um complexo de 54 kDa) e deslocamentos de vários picos no espectro.

Figura 68. Espectros ^1H - ^{15}N HSQC do complexo PilB₁₂₋₁₆₃(^{15}N)-PilZ na presença e ausência de FimX_{EAL}. Comparação dos espectros ^{15}N HSQC do complexo PilB₁₂₋₁₆₃(^{15}N)-PilZ(^{14}N) na presença e na ausência de 180 μM de FimX_{EAL}(^{14}N) (A). B, C e D são zoom de algumas das regiões do espectro em A. O complexo PilZ(^{15}N)-PilB₁₂₋₁₆₃(^{14}N) foi purificado por SEC e a concentração usada para adquirir os espectros foi de 180 μM .

4.18 Monitoramento dos complexos PilB₁₋₁₉₀-PilZ e PilZ-FimX_{EAL} por fluorescência do 5-hidroxytriptofano (5OHW)

O 5-hidroxytriptofano (5OHW) é um análogo do triptofano (W) que pode ser incorporado em proteínas recombinantes e é particularmente útil em estudos de sistemas biológicos que envolve mais de uma proteína. A seletiva excitação do 5OHW entre 295nm e 320nm (mínima em W) permite o estudo de uma única proteína (marcada com 5OHW) componente de um sistema contendo várias proteínas com resíduos de triptofano, permitindo o estudo das interações e mudanças conformacionais [204].

A proteína PilZ (apresenta um único resíduo de triptofano na posição 69) foi expressa e marcada com 5OHW (PilZ_{5OHW}) como descrito na secção 3.8. Uma comparação do espectro de excitação e emissão do PilZ_{5OHW} e PilZ (não marcada com 5OHW) é mostrado na **Figura 69**, onde se observa que o espectro de excitação de PilZ_{5OHW} apresenta um ombro entre 295 nm e 320 nm ausente no espectro de excitação de PilZ (**Figura 69A**). Por outro lado, a emissão de fluorescência pelo PilZ é mínima comparado com a de PilZ_{5OHW} quando excitado a 310 nm (**Figura 69B**).

Figura 69. Espectro de fluorescência da excitação e emissão de PilZ e PilZ_{5OHW}. A, Espectro de excitação de PilZ (linha vermelha) e PilZ_{5OHW} (linha preta). A incorporação de 5-hidroxytriptofano (5OHW) em PilZ_{5OHW} poder ser confirmada pela presença de um ombro no espectro, ausente em PilZ. B, Comparação do espectro de emissão ($\lambda_{Ex}=310nm$) de PilZ (linha vermelha) e PilZ_{5OHW} (linha preta).

Todas as titulações foram feitas com 1 μM de proteína marcada (sozinha e em complexo) e diluídas em tampão 50 mM Tris-pH 8,0, 50 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM β -mercaptoetanol (secção 3.13). PilZ_{50HW} titulada com PilB₁₋₁₉₀ e FimX_{EAL} produz um aumento na intensidade da fluorescência pela formação dos complexos PilZ_{50HW}-PilB₁₋₁₉₀ e PilZ_{50HW}-FimX_{EAL}. Isso permitiu construir curvas de titulação que foram usadas para calcular as constantes de dissociação (K_d) para a formação destes complexos. Na **Figura 70** se mostra que o PilZ possui maior afinidade por PilB₁₋₁₉₀ (**Figura 70A**) que por FimX_{EAL} (**Figura 70B**) com K_d s de 4,1 nM e 200 nM, respectivamente.

Figura 70. Curva de titulação de PilZ_{50HW}. **A)** Curva de titulação de PilZ_{50HW} contra PilB₁₋₁₉₀, onde se observa uma constante de afinidade de 4,1 nM. **B)** Curva de titulação de PilZ_{50HW} contra FimX_{EAL}, onde se observa uma constante de afinidade de 0,2 μM . Os quadrados pretos representam as curvas experimentais e a linha contínua em vermelho representa as curvas teóricas.

Como mostrado na **Figura 55**, PilZ pode interagir com a região N-terminal de PilB e com FimX_{EAL} formando um complexo ternário estável (quando usado estes fragmentos), apesar de que as estruturas cristalográficas dos complexos binários PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ e PilZ-FimX_{EAL} compartilham a mesma interface de interação (**Figura 52**). O único triptofano que apresenta o PilZ (W69) se encontra na interface de interação para ambas proteínas (**Tabela 18**) e é importante para a estabilidade do complexo ternário (**Figura 65A**). Tomando vantagem disso e com a finalidade de obter informação sobre a natureza dessas interações, os complexos PilB₁₋₁₉₀-PilZ_{50HW} e PilZ_{50HW}-FimX_{EAL} foram obtidos por SEC utilizando uma coluna S200 10 300 GL (GE, Healthcare) e foram submetidos a ensaios de titulação com FimX_{EAL} e PilB₁₋₁₉₀, respectivamente. Na **Figura 71** se mostram os possíveis eventos que poderiam acontecer na titulação do complexo PilB₁₋₁₉₀-PilZ_{50HW} com FimX_{EAL} (**Figura 71A**) e na titulação do complexo PilZ_{50HW}-FimX_{EAL} com PilB₁₋₁₉₀ (**Figura 71B**). Uma possibilidade é que a formação do complexo ternário poderia envolver uma competição

entre o PilB e FimX pela interface de interação com PilZ observadas nas estruturas cristalográficas, a interface de interação com maior afinidade poderia ser mantida no complexo ternário e novos contatos ainda não observados poderiam ser formados no complexo ternário. Então, se a interface de interação entre PilZ_{50HW} e PilB₁₋₁₉₀ é mantida após a adição de FimX_{EAL} mudanças na fluorescência de PilZ_{50HW} não seriam observadas. Por outro lado, se FimX_{EAL} causa deslocamento de PilB e entra a ocupar a mesma interface de interação mudanças na fluorescência de PilZ_{50HW} seriam observadas (**Figura 71A**). A mesma hipótese seria aplicada para o complexo PilZ_{50HW}-FimX_{EAL} após adição de PilB₁₋₁₉₀ (**Figura 71B**).

Figura 71. Modelos da interação entre PilZ, PilB₁₋₁₉₀ e FimX_{EAL}. **A**, Modelo da formação do complexo ternário entre PilZ_{50HW}-PilB₁₋₁₉₀ após adição de FimX_{EAL}. **B**, Modelo da formação do complexo ternário entre PilZ_{50HW}-FimX_{EAL} após adição de PilB₁₋₁₉₀. PilZ_{50HW} (Z), PilB₁₋₁₉₀ (B) e FimX_{EAL} (X). Em verde se mostra a representação gráfica da posição do resíduo 50HW em PilZ.

Na **Figura 72** se mostra as curvas de titulação entre os complexos PilB₁₋₁₉₀-PilZ_{50HW} e PilZ_{50HW}-FimX_{EAL} com FimX_{EAL} e PilB₁₋₁₉₀, respectivamente. Quando, 1 μ M do complexo PilZ_{50HW}-FimX_{EAL} foi titulado com PilB₁₋₁₉₀ na presença e ausência de c-di-GMP (10 μ M), a adição de PilB₁₋₁₉₀ induz um aumento na fluorescência permitindo-nos construir uma curva de titulação que foi usada para calcular o K_d da interação na presença e na ausência de c-di-GMP. O K_d calculado para ambos os casos foi de 2,4 nM (na ausência de c-di-GMP) (**Figura 72A**) e 6,9 nM (na presença de c-di-GMP) (**Figura 72B**) valores muito próximos ao K_d calculado para a interação entre PilZ_{50HW} e PilB₁₋₁₉₀ de 4,1 nM (**Figura 70A**). Por outro lado, a titulação do complexo PilB₁₋₁₉₀-PilZ_{50HW} com FimX_{EAL} não foram observadas mudanças na fluorescência pela adição de FimX_{EAL} (**Figura 72C**). Estes resultados poderiam nos indicar que, no contexto do complexo ternário, a interface de interação entre PilZ e PilB observada na estrutura cristalográfica é mantida pela maior afinidade entre ambas proteínas. Uma possibilidade é que FimX poderia fazer novos contatos com PilZ e/ou PilB, sem alterar o entorno químico onde se encontra o resíduo W69 de PilZ, permitindo a estabilidade no complexo ternário. Esta hipótese será consistente com o resultado mostrado na **Figura 62B**, onde se observa que a mutação no resíduo W69 de PilZ (resíduo importante para a interação com PilB, mas não com FimX) reduz drasticamente a estabilidade do complexo ternário. Outra possibilidade é que, nas condições e concentrações (1 μ M de cada proteína) testadas o complexo PilB₁₋₁₉₀-PilZ e formado pela alta afinidade entre elas, mas o complexo ternário PilB₁₋₁₉₀-PilZ-FimX_{EAL} não seria formado.

Figura 72. Curva de titulação dos complexos $PilZ_{50HW}$ - $PilB_{1-190}$ e $PilZ_{50HW}$ - $FimX_{EAL}$. **A)** Curva de titulação do complexo $PilZ_{50HW}$ - $PilB_{1-190}$ contra $FimX_{EAL}$, onde se observa uma constante de afinidade de 2,4 nm. **B)** Curva de titulação do complexo $PilZ_{50HW}$ - $PilB_{1-190}$ contra $FimX_{EAL}$ na presença de 10 μM de c-di-GMP com uma constante de afinidade de 6,9 nm. **C)** Curva de titulação do complexo $PilZ_{50HW}$ - $PilB_{1-190}$ contra $FimX_{EAL}$, onde não se observa mudança na fluorescência inicial após a adição de $FimX_{EAL}$. Os quadrados representam as curvas experimentais e a linha contínua em vermelho representa as curvas teóricas.

4.19 Determinação da massa molar das proteínas de PilB, PilZ e FimX e de seus complexos por SEC-MALS

Para determinar a massa molar e o estado oligomérico das proteínas de interesse foram feitas análises por cromatografia de exclusão molecular (detalhes na secção 3.12.4) acoplada a um detector de espalhamento de luz em múltiplos ângulos (SEC-MALS). A massa molar teórica de cada uma das proteínas foi calculada pelo software ProtParam [205] usando a sequência de aminoácidos para cada uma das construções (**Tabela 19**). Na **Figura 73** se mostra a distribuição da massa molar ao longo do pico de eluição de três fragmentos de FimX na ausência e na presença de c-di-GMP. O FimX (inteira) se encontra na forma dimérica apresentando uma massa molar de 147 e 145 kDa na presença e na ausência de c-di-GMP, respectivamente, o que seria o dobro da massa molar esperada para um monômero de 76 kDa. Além disso, observamos que na presença de c-di-GMP, o pico de eluição do FimX apresenta um tempo de retenção menor (**Figura 73A**), indicando que o c-di-GMP induz uma mudança conformacional no FimX. As construções de FimX_{PAS-GGDEF-EAL} e FimX_{GGDEF-EAL} eluíram como monômeros na presença e na ausência de c-di-GMP com as massas molares experimentais próximas as teóricas de 60 e 46 kDa (**Figura 73B e C e Tabela 19**), respectivamente. O c-di-GMP não induz alguma mudança no tempo de retenção no pico de eluição de FimX_{PAS-GGDEF-EAL} e FimX_{GGDEF-EAL}. Estes resultados são consistentes com a hipótese que a ligação de c-di-GMP no domínio EAL de FimX tem um efeito na região N-terminal da proteína (domínio REC), domínio que é responsável pela dimerização de FimX [125,141].

Figura 73. Determinação da massa molar das construções de FimX por SEC-MALS. Aliquotas de 100 μ L (5 g/L) das diferentes construções de FimX na ausência (linha vermelha) e na presença (linha preta) de c-di-GMP (200 μ M) foram aplicadas numa coluna Superdex 200 7,8/300 (Wyatt Technology). As linhas contínuas representam o índice de refração (dRI) normalizado das proteínas eluídas e os círculos vazios representam a distribuição da massa molar (g/mol) ao longo do pico eluído. **(A)** FimX eluiu como um dímero apresentando uma massa molar de 145 kDa na ausência (vermelho) e 147 kDa na presença (preta) de c-di-GMP que seria o dobro da massa teórica esperada de 76 kDa, também se observa que a presença de c-di-GMP induz uma mudança para a esquerda no pico de eluição indicando uma mudança conformacional no FimX. **(B)** FimX_{GGDEF-EAL} apresento uma massa molar de 47 e 45 kDa na ausência e na presença de c-di-GMP, respectivamente, similar à massa teórica de 46 kDa. **(C)** FimX_{PAS-GGDEF-EAL} apresento uma massa de 65 e 61 kDa na ausência e na presença de c-di-GMP, respectivamente, próximo à massa teórica de 60 kDa. Em FimX_{GGDEF-EAL} e FimX_{PAS-GGDEF-EAL} não foi observado alguma mudança no pico de eluição das proteínas pela presença de c-di-GMP.

Inicialmente para determinar a massa molar das duas construções da região N-terminal de PilB (PilB₁₋₁₉₀ e PilB₁₂₋₁₆₃) por SEC utilizando uma coluna S200 10/300 GL (GE Healthcare) pre-calibrada com proteínas globulares de massa conhecida indicavam que as construções de PilB₁₋₁₉₀ (MW_{teórico} ~20 kDa) e PilB₁₂₋₁₆₃ (MW_{teórico} ~16,6 kDa) apresentavam massas aparentes de 84 e 47 kDa, respectivamente (dados não mostrados). Na **Figura 74A e B** observamos que nos resultados de SEC-MALS, PilB₁₋₁₉₀ e PilB₁₂₋₁₆₃ são monômeros com uma distribuição da massa molar de 22 e 17,4 kDa, respectivamente, valores próximos as massas teóricas de 20 e 16,6 kDa, respectivamente. Por outro lado, esses fragmentos em complexo com PilZ, PilB₁₋₁₉₀-PilZ e PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ, formam heterodímeros com massas molares de 33 e 29.5 kDa respectivamente (**Figura 74C e D**), valores próximos as massas teóricas correspondentes ao complexo binário formado por uma molécula de PilB_{Nt} e PilZ de 32,5 e 29 kDa

Figura 74. Determinação da massa molar da região N-terminal de PilB e do complexo PilB_{Nt}-PilZ por SEC-MALS. Aliquotas de 100 μ L (9 g/L) das construções da região N-terminal do PilB, PilB₁₋₁₉₀ (A) e PilB₁₂₋₁₆₃ (B) e de seus complexos com PilZ, PilB₁₋₁₉₀-PilZ (C) e PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ (D) foram aplicadas numa coluna SEC Wyatt Technology WTC-015S5 (5 μ m, 150 Å, 7,8/300). As linhas contínuas representam o índice de refração (dRI) normalizado das proteínas eluídas e os círculos vazios representam a distribuição da massa molar (g/mol) ao longo do pico de eluição. A massa molar encontrada para PilB₁₋₁₉₀ e PilB₁₂₋₁₆₃ foi de 22 e 17.4 kDa valores próximos as massas teóricas de 20 e 16,6 kDa respectivamente, e dos complexos PilB₁₋₁₉₀-PilZ e PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ foi de 33 e 29.5 kDa valores próximos as massas teóricas de 32,5 e 29 kDa respectivamente.

O PilB_{XAC3239} pertence a uma família de ATPases hexaméricas envolvidas em diversas funções biológicas. Como mostrado acima, PilB (inteira) na presença de PilZ forma um complexo solúvel e estável (**Figura 36 e 37**). A massa molar teórica para os monômeros PilB e PilZ é 62,5 e 12,4 kDa, respectivamente, sendo que um complexo PilB-PilZ (heterodímero) terá massa de 74,9 kDa e o complexo hexamérico do heterodímero PilB-PilZ massa de 449 kDa.

A massa molar para o complexo PilB-PilZ na presença e na ausência de ATP_γS foi determinado por SEC-MALS utilizando uma coluna de exclusão molecular analítica Wyatt Technology WTC-050S5 (5 μm, 500 Å, 7,8/300) com um volume de 15 mL equilibrada com 20 mM Tris-HCl pH 7,0, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM β-mercaptoetanol (secção 3.12.4). A **Figura 75** mostra a distribuição da massa molar ao longo do pico de eluição principal do complexo PilB-PilZ na presença e na ausência de ATP_γS, apresentando uma massa de 149 e 132 kDa, respectivamente. Estes valores correspondem a um dímero do complexo (PilB-PilZ)₂ de 149,8 kDa. Na amostra PilB-PilZ na presença de ATP_γS, se observa a eluição de um pequeno pico com uma distribuição da massa molar aproximada de 438 kDa (entre 345 e 600 kDa) próximo ao peso teórico de um hexâmero do complexo PilB₆-PilZ₆. Estes resultados nos indicariam que o complexo PilB-PilZ se encontra principalmente na forma de dímero de heterodímeros (PilB-PilZ)₂ nas condições testadas e que o ATP_γS estabiliza a formação deste complexo PilB-PilZ, podendo induzir a formação de hexâmeros. Um comportamento similar foi observado para XpsE (ATPase do T2SS) em *X. campestris* [178]. Algumas ATPases como PilB do T4P em *C. perfringens*, o PilF do sistema de autotransformação em *T. thermophilus* e GspE do T2SS em *Archaeoglobus fulgidus* formam hexâmeros na ausência de ATP [65,127,191]. Outras ATPases como PilB de *M. xanthus* e GspE de *V. cholerae* são purificados como monômeros [180,206].

Figura 75. Determinação da massa molar do complexo PilB-PilZ por SEC-MALS. Aliquotas de 100 μ L (2 mg/mL ou 25 μ M) do complexo PilB-PilZ na ausência (linha vermelha) e presença (linha preta) do ATP γ S (análogo não hidrolisável do ATP) foram aplicadas em uma coluna SEC analítica Wyatt Technology WTC-050S5 (5 μ m, 500 Å, 7,8/300). As linhas contínuas representam o índice de refração (dRI) normalizado do complexo eluído e os círculos vazios representam a distribuição da massa molar (g/mol) ao longo do pico eluído. A massa molar encontrada para o complexo PilB-PilZ na ausência de ATP γ S foi de 132 kDa. No cromatograma do complexo de PilB-PilZ na presença de ATP γ S (50 μ M) se observa a eluição de dois picos com as massas de 438 e 149 kDa os quais corresponderiam à forma hexamérica e à forma heterodimérica do complexo PilB-PilZ. As massas molares teóricas para o PilB é 62,5 kDa e para o PilZ é 12,4 kDa.

Na **Figura 58** foi mostrado que o complexo PilB-PilZ pode interagir com FimX (inteira). O complexo PilB-PilZ e o FimX foram misturados na proporção 1:1 (25 μ M) na presença e na ausência dos ligantes ATP γ S e c-di-GMP. Uma alíquota de 100 μ L desta mistura foi aplicada em uma coluna SEC Wyatt Technology WTC-050S5 (5 μ m, 500 Å, 7,8/300) equilibrada com 20 mM Tris-HCl pH 7,0, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM β -mercaptoetanol. Na **Figura 76** se mostra a superposição dos cromatogramas da mistura PilB-PilZ-FimX na presença e na ausência de ATP γ S/c-di-GMP. Na ausência de ATP γ S/c-di-GMP se observa a eluição de 3 picos (pico 1, pico 2 e pico 3) com uma distribuição média da massa molar ao longo de cada pico de 590 kDa, 236,6 kDa e 140 kDa, respectivamente. Na presença de ATP γ S/c-di-GMP se observa a eluição principalmente do pico 1 e em menor proporção os picos 2 e 3, com as massas molares de 605 kDa, 268 kDa e 145 kDa. A massa do pico 3 corresponde à do dímero do complexo PilB-PilZ como observado na **Figura 75** e **76B** (frações F5 e F6). A massa do pico 2 corresponde à massa do complexo PilB-PilZ-FimX com uma estequiometria não determinada. O pico 1 apresenta uma massa molar média de 605 kDa (na presença de ATP γ S/c-di-GMP) e 590 kDa (na ausência de ATP γ S/c-di-GMP) que é muito próximo à massa esperada para um complexo formado por 6PilB:6PilZ:2FimX ($MW_{teórico} = 601,4$ kDa). Esta hipótese é consistente com as

observações que i) PilB pode formar hexâmeros (**Figura 75**) assim como outras ATPase da família que pertence, ii) uma molécula de PilZ interage com uma molécula de PilB (**Figura 46 e 74**) e iii) que o FimX é um dímero (**Figura 73A**).

Figura 76. Determinação da massa molar do complexo PilB-PilZ-FimX por SEC-MALS. A) Aliquotas de 100 μ L da mistura do complexo PilB-PilZ e do FimX na proporção 1:1 (25 μ M) na ausência (em preto) e na presença (em vermelho) de 50 μ M de ATP γ S e c-di-GMP foi aplicada numa coluna SEC analítica Wyatt Technology WTC-050S5 (5 μ m, 500 Å, 7,8/300) e monitorado pelo índice de refração (dRI). O cromatograma da mistura do complexo PilB-PilZ e FimX na ausência de ATP γ S e c-di-GMP (em preto) mostra a eluição de 3 picos com as massas molares de 590 kDa (Pico 1), 263,6 kDa (Pico 2) e 140 kDa (Pico 3). O cromatograma da mistura do complexo PilB-PilZ e FimX na presença de ATP γ S e c-di-GMP (em vermelho) mostra a eluição de um pico principal de 605 kDa (Pico 1) e dois picos em menores e com as massas molares de 590 kDa (Pico 1), 263,6 kDa (Pico 2) e 140 kDa (Pico 3). **B)** SDS-PAGE das frações que eluíram em **A**.

Tabela 19. Massa molar das proteínas de interesse determinado por SEC-MALS

Proteína	Ligante	Conc. (g/L)	Massa Molar ^{Teórica} (kDa)	Massa Molar ^{Exp.} (kDa)	Estado Oligomérico
FimX	---	5	76	145 ± 0,3	Dímero
	c-di-GMP	5		147 ± 0,6	Dímero
FimX_{GGDEF-EAL}	---	5	46	47 ± 0,23	Monômero
	c-di-GMP	5		45 ± 0,36	Monômero
FimX_{PAS-GGDEF-EAL}	---	5	60	65 ± 0,19	Monômero
	c-di-GMP	5		60 ± 0,24	Monômero
PilB₁₂₋₁₆₃	---	9	16,6	17,4 ± 0,05	Monômero
PilB₁₋₁₉₀	---	9	20	22 ± 0,15	Monômero
PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ	---	5	29	29,5 ± 0,11	Heterodímero
PilB₁₋₁₉₀-PilZ	---	5	32,5	33 ± 0,09	Heterodímero
PilB-PilZ	---	2	74,9	132 ± 0,9	Heterodímero
	ATP _γ S	2	74,9	438 ± 13 (pico 1)	Hexâmero de heterodímeros
				149 ± 1,2 (pico 2)	Dímero de Heterodímero (PilB ₂ -PilZ ₂)
	---	2		590 ± 3,5 (pico 1)	PilB ₆ :PilZ ₆ :FimX ₂
				263,6 ± 1 (pico 2)	Indeterminado
				140 ± 1,12 (pico 3)	Dímero de Heterodímero
PilB-PilZ-FimX	ATP _γ S / c-di-GMP	2		605 ± 1,8 (pico 1)	PilB ₆ :PilZ ₆ :FimX ₂
				268 ± 5,2 (pico 2)	Indeterminado
				145 ± 3,2 (pico 3)	Dímero de Heterodímero (PilB ₂ -PilZ ₂)

4.20 Determinação da atividade ATPásica de PilB

A atividade enzimática do complexo PilB-PilZ foi determinada pela detecção direta de fosfato inorgânico (Pi) através do ensaio de verde malaquita como descrito na secção 3.14. Em tentativas iniciais não se teve sucesso na determinação de atividade de PilB quando o experimento foi feito em tempos curtos (intervalos de 5 a 15 min). Os experimentos foram feitos no tampão onde o complexo PilB-PilZ (1 μ M) se mostrou a ser mais estável 25 mM Tris-HCl pH 7,0, 50 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 2 mM β -mercaptoetanol e 1 mM de ATP e incubadas a 30 °C por 12 horas como descrito na secção 3.14. Uma curva padrão de diferentes concentrações de Pi (KH_2PO_4) foi obtida na faixa de 0 a 150 μ M de Pi com uma correlação de $R^2=0,97$ nas condições testadas (**Figura 77A**). A velocidade de hidrólise do ATP pelo complexo PilB-PilZ utilizando este ensaio foi calculado de ser 0,82 $nM\ min^{-1}\ mg^{-1}$. Interessantemente, na presença de FimX (proporção de 1:1) a atividade do complexo PilB-PilZ aumenta para 2,1 $nM\ min^{-1}\ mg^{-1}$, aproximadamente 3 vezes maior que do observada para o complexo PilB-PilZ na ausência de FimX (**Figura 77B**). A atividade ATPase reportado para PilB de *M. xanthus*, *C. perfringens* e *P. aeruginosa* foi entre 3 e 11 $nM\ min^{-1}\ mg^{-1}$ [127,190,206]. Na presença de construções menores de FimX: FimX_{GGDEF-EAL} e FimX_{EAL} a atividade do complexo PilB-PilZ foi observada para ser 1,25 e 1,32 $nM\ min^{-1}\ mg^{-1}$ respectivamente, aproximadamente 1,5 vezes maior que do complexo PilB-PilZ. As mutações nos resíduos conservados K334A (Walker A) e E407A (Walker B) no domínio ATPase de PilB abolem a atividade ATPase do complexo PilB-PilZ (**Figura 77B**). A atividade ATPase do complexo PilB-PilZ na presença de FimX não foi afetada pela adição do c-di-GMP como se mostra na (**Figura 78**). Um homólogo de PilB que liga c-di-GMP diretamente também tem atividade independente da presença deste ligante [127].

Figura 77. FimX estimula a atividade ATPásica do complexo PiIB-PilZ. A) Curva padrão onde K_2HPO_4 foi utilizado como fonte de fosfato inorgânico (Pi) na faixa de 2 a 150 μM , as reações foram preparadas em volumes de 50 μL por triplicata para cada leitura. **B)** A hidrólise de ATP pelo complexo PiIB-PilZ (amarelo) foi monitorado pelo ensaio de verde malaquita na presença na proporção de 1:1 de diferentes construções de FimX: FimX (Azul), FimX_{GGDEF-EAL} (cinza) e FimX_{EAL} (verde). Uma dupla mutante de PiIB nos resíduos conservados K343 (Walker A) e E407 (Walker B) afeta drasticamente a atividade ATPase na ausência (azul claro) e na presença (laranja) de FimX. A concentração das proteínas utilizadas nas reações foi de 1 μM e o tempo de reação 12 horas.

Previamente foi mostrado que a atividade ATPase do complexo EpsE-EpsL (homólogos a PilB e PilM respectivamente) do T2SS em *V. cholerae* é fortemente estimulada pela presença de cardiolipina [207]. Com a finalidade de testar se a cardiolipina tem algum efeito na atividade ATPase do complexo PilB-PilZ, foram feitas reações para determinar a atividade ATPase do complexo PilB-PilZ na presença de 50 μ M de cardiolipina. A **Figura 78** mostra que a cardiolipina não tem um efeito observável na atividade ATPase do complexo PilB-PilZ ou PilB-PilZ-FimX.

Figura 78. Efeito de c-di-GMP e cardiolipina na atividade ATPásica do complexo PilB-PilZ. **A)** Efeito da presença de FimX e c-di-GMP na atividade ATPásica do complexo PilB-PilZ. Onde se observa que a presença de FimX (proporção 1:1) resulta num aumento da atividade ATPase de PilB e a presença de c-di-GMP (20 μ M). **B)** Efeito da cardiolipina na atividade ATPase do complexo PilB-PilZ na presença de FimX e c-di-GMP (20 μ M). A concentração das proteínas utilizadas nas reações foi de 1 μ M e o tempo de reação 12 horas.

4.21 Observação da motilidade twitching nas cepas de *X. citri*

A motilidade twitching é dependente da extensão e retração coordenada do T4P em resposta a sinais ambientais [37,39,146]. Em *Xanthomonas* e em outras espécies bacterianas a motilidade twitching pode ser observada na superfície intersticial entre o ágar e a superfície do vidro, onde a borda da zona de twitching (borda da colônia) está formado por células individuais ou em pequenos grupos se afastando de corpo principal da colônia [21,208,209]. As cepas mutantes de *X. citri* produzidas durante este trabalho (**Tabela 2**) foram testadas pela sua capacidade de realizar motilidade twitching em meio KB-ágar (**Tabela 1**) suplementado com 2 mM CaCl_2 e incubado a 30 °C por 48 horas (secção 3.16.1). Na **Figura 79** se mostra a zona de twitching para a cepa *X. citri* selvagem (*Xac_Wt*), onde se observa uma borda da colônia desagregada com bactérias isoladas o em pequenos grupos característico deste tipo de motilidade. Por outro lado, as cepas nocautes de algum dos componentes da maquinaria do T4P, $\Delta pilA$, $\Delta fimX$, $\Delta pilB$, $\Delta pilM$ e $\Delta pilC$, apresentam uma borda de colônia uniforme e bem definida (**Figura 79**), indicando que estas cepas não realizam motilidade twitching.

Figura 79. Motilidade twitching em cepas de *X. citri*. Imagens da zona intersticial entre o ágar e a base de vidro da câmara de microscopia. A motilidade twitching foram avaliados em cepas de *X. citri* selvagem (*Xac_Wt*) e nocautes de alguns dos genes que compõem a maquinaria de biossíntese do T4P ($\Delta pilA$, $\Delta fimX$, $\Delta pilB$, $\Delta pilM$ e $\Delta pilC$). A zona de twitching em *Xac_Wt* tem uma aparência desagregada com um borde irregular e não definido com células individuais e em pequenos grupos, por outro lado, as cepas de *X. citri* nocautes apresentaram um borde mais uniforme e homogêneo. Imagens de microscopia de contraste de fase foram coletadas uma magnificação de 100x.

Com a finalidade de determinar a localização celular das proteínas FimX, PilZ e PilB (secção 4.22) foi inserido no genoma de *X. citri* selvagem a sequência codificadora para msfGFP (monomeric super folding Green Fluorescent Protein) [172] no extremo N-terminal de cada uma das regiões codificantes das proteínas (depois do ATG de cada gene) seguido por 15 pb que codifica para um pequeno linker (GGGGS). Estas fusões gênicas nos permitiram obter as cepas *Xac_msfGFP-FimX_Wt*, *Xac_msfGFP-PilZ_Wt* e *Xac_msfGFP-PilB_Wt* (**Tabela 2**). Para saber se a fusão de msfGFP não afeta a função das proteínas, as obtidas foram testadas por a sua capacidade de realizar motilidade twitching. Na **Figura 80** se mostra a motilidade twitching das cepas *Xac_msfGFP-FimX*, *Xac_msfGFP-PilZ* e *Xac_msfGFP-PilB* selvagens e as mutantes em outros componentes do T4P produzidas a partir destas cepas. As cepas de *X. citri* selvagens expressando a fusão com msfGFP, *Xac_msfGFP-FimX_Wt*, *Xac_msfGFP-PilZ_Wt* e *Xac_msfGFP-PilB_Wt*, não foram afetadas na capacidade de realizar twitching. A deleção de alguns dos domínios de FimX (Δ REC e Δ PAS) e de PilB (Δ NtDomain, resíduos 12-165) e deleções de alguns dos genes de outros componentes do T4P acaba com a motilidade tipo twitching (**Figura 80**). Por outro lado, uma mutação pontual no resíduo R534A de FimX, descrita para afetar ligação c-di-GMP e como importante para a interação com PilZ *in vitro* [135], não afetou a motilidade twitching na cepa *Xac_msfGFP-FimX_{R534A}* (**Figura 80A**).

Figura 80. Motilidade twitching em cepas *X. citri* expressando as quimeras msfGFP-FimX, msfGFP-PilZ e msfGFP-PilB. A fusão de msfGFP no extremo N-terminal de FimX (A), PilZ (B) e PilB (C) não afeta a motilidade twitching nas cepas *X. citri* selvagem (Wt). Nocautes nos genes de qualquer um dos componentes do T4P como Δ *pilZ*, Δ *pilM*, Δ *fimX*, Δ *pilB* e Δ *pilC* acaba com a motilidade twitching. Deleções dos domínios REC (*Xac*_msfGFP-FimX Δ REC) e PAS (*Xac*_msfGFP-FimX Δ PAS) de FimX e da região N-terminal de PilB (resíduos 12-165, domínios ND0-ND1) afeta a motilidade twitching. A mutação no resíduo R534A em FimX não afeta motilidade twitching em *Xac*_msfGFP-FimX_{R534A}. Imagens de microscopia de contraste de fase foram coletadas uma magnificação de 100x.

A motilidade twitching em *X. citri* também foi observada pela aquisição de imagens em períodos de 10 min (*time-lapse*) por um tempo total de 16 horas a 30 °C utilizando um microscópio de contraste de fase com uma magnificação de 40x. Na **Figura 81** se mostra o ensaio de motilidade twitching por *time-lapse* das cepas *X. citri* selvagem (*Xac_Wt*) e a mutante de *X. citri* nocaute no gene *fimX* (*Xac_ΔfimX*). Na **Figura 81A** se mostra a zona de twitching (borda de colônia) da cepa *Xac_Wt*, onde se observa bactérias isoladas o em pequenos grupos movimentando-se e se afastando do corpo da colônia característico de twitching (**Vídeo 1 e 2**). Por outro lado, na cepa *Xac_ΔfimX* (**Figura 81B**) não se observam bactérias isoladas se afastando do corpo principal da colônia apresentado uma borda mais uniforme (**Vídeo 3**). A motilidade twitching por *time-lapse* também foi observada nas cepas *Xac_msfGFP-FimX_WT* (**Figura 82A e Vídeo 4**), *Xac_msfGFP-PilZ_WT* (**Figura 82B e Vídeo 5**) e *Xac_msfGFP-PilB_WT* (**Figura 82C e Vídeo 6**).

A velocidade média da motilidade twitching também foi calculada usando os vídeos de *time-lapse* da cepa *Xac_Wt* (**Vídeo 1 e 2**). Nas condições testadas (meio KB-ágar suplementado com 2 mM de CaCl₂ a 30 °C) a velocidade calculada foi de $0,2 \pm 0,02 \mu\text{m min}^{-1}$, menor do que foi observado para *P. aeruginosa* ($3 \mu\text{m min}^{-1}$) [36].

Figura 81. Motilidade twitching por *time-lapse* em cepas de *X. citri*. Visualização por *time-lapse* da motilidade twitching em *X. citri* selvagem (*Xac_Wt*) (**A**) e na mutante *Xac_ΔfimX* (**B**). As imagens foram adquiridas usando um microscópio de contraste de fase Leica DMI8 com uma magnificação de 40x e o número em cada imagem indica o tempo em horas.

Figura 82. Motilidade twitching por *time-lapse* em cepas quimeras de *X. citri*. Cepas de *X. citri* selvagens expressando as quimeras msfGFP-FimX (**A**), msfGFP-PilZ (**B**) e msfGFP-PilB (**C**). A inserção de msfGFP no extremo N-terminal de FimX, PilZ e PilB não afeta o fenótipo de motilidade twitching das cepas. As imagens foram adquiridas como descrito em materiais e métodos e o número em cada imagem indica o tempo em horas. A barra de escala 20 μ m. **D.** Sequência do gene *msfgfp* que codifica para a proteína fluorescente msfGFP (verde) e no seu extremo C-terminal o linker (em cinza) que conecta a msfGFP com o extremo N-terminal das proteínas FimX, PilZ e PilB.

4.22 Localização subcelular de msfGFP-FimX, msfGFP-PilZ e msfGFP-PilB por microscopia de fluorescência

Como mostrado acima, a fusão de msfGFP no extremo N-terminal de FimX, PilZ e PilB não afeta significativamente a função das proteínas na motilidade twitching como foi verificado por experimentos de *time-lapse* (**Figura 82**) e da análise das zonas de twitching depois de 48 horas de incubação (**Figura 80**). A localização subcelular das proteínas msfGFP-FimX, msfGFP-PilZ e msfGFP-PilB foi monitorada em células de diversas cepas *X. citri* (**Tabela 2**) sobre pads de meio KB-agarose 1,5% suplementado com 2 mM de CaCl₂ previamente incubadas a 30 °C por 6 horas utilizando um microscópio de fluorescência com uma magnificação 100x como descrito em Materiais e Métodos (secção 3.16.2).

Na **Figura 83** se observa que a localização de msfGFP-FimX é unipolar, como foi observado para seu homólogo em *P. aeruginosa* [40,145,146]. Das células analisadas, em 53,7 % delas foram encontrados foci correspondente a msfGFP-FimX (**Tabela 20**). Deleção dos seus domínios Δ REC (msfGFP-FimX Δ REC) e Δ PAS (msfGFP-FimX Δ PAS) afeta drasticamente a localização polar de FimX, não sendo observados foci nas células analisadas. A mutação pontual no resíduo R534A de FimX (msfGFP-FimX_{R534A}) não afeta a localização unipolar de FimX, mas a frequência dos foci observados foi reduzido levemente para 40,7% (**Figura 86**) podendo indicar que a localização de FimX não é dependente da ligação de c-di-GMP ou que está mutação não é suficiente para afetar a ligação de c-di-GMP e a interação com PilZ *in vivo*. Interessantemente, nocautes dos genes *pilZ*_{XAC1133} (msfGFP-FimX Δ *pilZ*) e *pilB*_{XAC3239} (msfGFP-FimX Δ *pilB*) afeta drasticamente a localização polar de FimX (**Figura 83**). A frequência dos foci de msfGFP-FimX encontrados nestas cepas foi de 3,97% e 4,40% (**Tabela 20 e Figura 86**), respectivamente, indicando que a localização de FimX é dependente de PilZ e PilB. Este resultado é similar ao que foi previamente observado em *P. aeruginosa*, onde a localização subcelular de FimX é dependente de PilB [145]. O nocaute do gene *pilM*_{XAC3385} (msfGFP-FimX Δ *pilM*) também reduz levemente a frequência de foci de FimX observados nas células analisadas para 32% (**Tabela 20 e Figura 86**).

Figura 83. Localização subcelular de FimX. Efeito na localização subcelular de msfGFP-FimX em diferentes cepas de *Xac*_msfGFP-FimX: selvagem (WT), nocautes nos genes *pilM*_{XAC3385} ($\Delta pilM$), *pilZ*_{XAC3111} ($\Delta pilZ$) e *pilB*_{XAC3239} ($\Delta pilB$). A localização de FimX também foi avaliada em uma mutante pontual no resíduo R534 (R534A) e na deleção dos domínios REC (ΔREC) e PAS (ΔPAS). O gráfico ao lado de cada imagem representa o número total de foci observado e em todas as células analisadas. As imagens foram tomadas em cinco campos diferentes de pelo menos três experimentos independentes. A figura mostra exemplos representativos e uma representação gráfica do número total dos foci encontrados. Imagens foram adquiridas com um microscópio invertido de fluorescência Leica DMI8 com uma magnificação de 100x.

A localização de msfGFP-PilZ também foi observada ser unipolar (**Figura 84**) e a frequência dos foci encontrados nas células analisadas foi de 32% (**Tabela 20**). A localização unipolar de PilZ não foi afetada pela deleção do gene *pilM*_{XAC3385} (msfGFP-PilZ_Δ*pilM*) (**Figura 84 e 86**). Por outro lado, a deleção dos genes *fimX*_{XAC2398} e *pilB*_{XAC3239} afeta significativamente a localização de msfGFP-PilZ. Detectamos somente alguns foci de msfGFP-PilZ com localização polar e não polar na ausência de FimX e não foi detectado foci na ausência de PilB (**Figura 84**).

Figura 84. Localização celular de PilZ. Efeito na localização subcelular de msfGFP-PilZ em diferentes cepas de *Xac*_msfGFP-PilZ: selvagem (WT), nocautes nos genes *pilM*_{XAC3385} (Δ*pilM*), *fimX*_{XAC2398} (Δ*fimX*) e *pilB*_{XAC3239} (Δ*pilB*). O gráfico ao lado de cada imagem representa o número total de foci observado e em todas as células analisadas. As imagens foram tomadas em cinco campos diferentes de pelo menos três experimentos independentes. A figura mostra exemplos representativos e uma representação gráfica do número total dos foci encontrados. Imagens foram adquiridas com um microscópio invertido de fluorescência Leica DMI8 com uma magnificação de 100x.

A localização de msfGFP-PilB também é unipolar (**Figura 85**), mas a frequência dos foci encontrados na cepa *Xac_msfGFP-PilB_WT* é somente 6,5%, muito menos do que foi observado para FimX e PilZ. Tendo em conta que a fusão com msfGFP não afeta a função de PilB na motilidade twitching (**Figura 80C**), uma possível explicação seria uma alta dinâmica de polimerização e despolimerização do T4P durante a motilidade twitching onde ocorre a troca das ATPases (PilB e PilT) responsáveis por estes processos [37]. Nós avaliamos o efeito do nocaute $\Delta pilT_{XAC2924}$ na localização de PilB baseada na hipótese que PilB poderia ficar mais estavelmente fixada na base do pilus permitindo uma melhor visualização da sua localização na célula. Na **Figura 85 e 86C** mostra que a localização de PilB na cepa $\Delta pilT$ (*Xac_msfGFP-PilB_ΔpilT*) é muito similar ao observado na cepa *Xac_msfGFP-PilB_Wt*. Interessantemente, uma mutação pontual no resíduo K343A do sítio de ligação do ATP (Walker A) não afeta a localização polar de PilB e a frequência dos foci encontrados nas células analisadas foi de 8,4% (**Tabela 20**) um pouco maior que na cepa *Xac_msfGFP-PilB_Wt*. Por outro lado, uma dupla mutação pontual nos resíduos K343A (Walker A) e E407A (Walker B) importantes para a ligação e hidrólises do ATP, respectivamente, acaba com a localização polar de msfGFP-PilB. Isto indica que a localização de PilB não é dependente da ligação de ATP, mas as mudanças conformacionais que ocorrem durante a hidrólises do ATP [111,188] poderiam ser importantes para a localização e a dinâmica de interações de PilB com os componentes da membrana interna do T4P. Os nocautes dos genes *pilM* e *pilC* afeta significativamente a localização polar de PilB como se mostra na **Figura 86C**. Nocautes de *fimX*, *pilZ* e a deleção do domínio N-terminal de PilB correspondente ao domínios ND0 e ND1 (resíduos 12-156) acaba com a localização polar de PilB como se mostra na **Figura 85 e 86C**.

Figura 85. Localização celular de PilB. Efeito na localização subcelular de msfGFP-PilB em diferentes cepas de *Xac*_msfGFP-PilB: selvagem (WT), nocautes nos genes *pilM*_{XAC3385} ($\Delta pilM$), *pilC*_{XAC3242} ($\Delta pilC$), *pilT*_{XAC2924} ($\Delta pilT$), *pilZ*_{XAC3111} ($\Delta pilZ$) e *fimX*_{XAC2398} ($\Delta fimX$). A localização de PilB também foi avaliada numa mutante pontual no resíduo K343 (K343A), numa dupla mutante nos resíduos K343 e E404 (K343A/E407A) e na deleção da região N-terminal de PilB. O gráfico ao lado de cada imagem representa o número total de foci observado e em todas as células analisadas. As imagens foram tomadas em cinco campos diferentes de pelo menos três experimentos independentes. Imagens foram adquiridas com um microscópio invertido de fluorescência Leica DMI8 com uma magnificação de 100x.

Tabela 20. Número de células e dos foci analisados nas diferentes cepas de *X. citri* expressando as quimeras msfGFP-FimX, msfGFP-PilZ e msfGFP-PilB

Xac	N° células	N° foci	Porcentagem (%)
msfGFP-FimX			
Wt	1724	927	53,7
R534A	2565	1045	40,7
Δ REC	1676	0	0
Δ PAS	1379	0	0
Δ <i>pilZ</i>	1408	56	3,97
Δ <i>pilB</i>	2111	93	4,4
Δ <i>pilM</i>	1750	562	32,1
msfGFP-PilZ			
Wt	1521	487	32
Δ <i>pilM</i>	1336	497	37
Δ <i>pilB</i>	1581	0	0
Δ <i>fimX</i>	1647	57	3,5
msfGFP-PilB			
Wt	1331	86	6,5
K343A	1615	136	8,4
K343A/E407A	1716	0	0
Δ PilB _{Nt} (ND0-ND1)	2258	0	0
Δ <i>pilM</i>	1956	75	3,8
Δ <i>pilC</i>	1775	58	3,26
Δ <i>fimX</i>	1857	6	0,32
Δ <i>pilZ</i>	1803	0	0
Δ <i>pilT</i>	2336	125	5,3

Figura 86. Distribuição subcelular de msfGFP-FimX, msfGFP-PilZ e msfGFP-PilB. Distribuição dos foci de msfGFP-FimX, msfGFP-PilZ e msfGFP-PilB encontrados a longo das células das diferentes cepas de *X. citri*. O gráfico foi elaborado utilizando o mesmo número de células para cada cepa.

A localização subcelular de msfGFP-FimX, msfGFP-PilZ e msfGFP-PilB nas cepas de *X. citri* selvagem também foram observadas pela aquisição de imagens em períodos de 20 min (*time-lapse*) de células realizando twitching como descrito na seção 3.16.3. Interessantemente, os foci das proteínas msfGFP-FimX (**Figura 87A** e **Vídeo 7-10**), msfGFP-PilZ (**Figura 87B** e **Vídeo 11 e 12**) e msfGFP-PilB (**Figura 87C** e **Vídeo 13-15**) em células de *X. citri* são observados no polo que dirige o movimento (polo líder o leading pole) durante a motilidade twitching. Outro fato interessante é que em células que se deslocam em grupos, os foci fluorescentes das proteínas são observados principalmente em aquelas células que estão liderando a motilidade destes grupos e que possuem seu polo líder livre (não estão em contato com outras células), enquanto que, nas células que estão unidas a estas e a outras células por ambos seus polos não são observados foci. Por outro lado, a localização das proteínas no polo não é estática, apreciando uma alta dinâmica na localização dos foci durante a motilidade twitching. Na **Figura 88** se observa que os foci de msfGFP-FimX (**Figura 88A** e **Vídeo 16 e 17**), msfGFP-PilZ (**Figura 88B** e **Vídeo 18 e 19**) e msfGFP-PilB (**Figura 88C** e **Vídeo 20 e 21**) aparecem e desaparecem no polo da célula que lidera a motilidade.

Figura 87. Localização subcelular de FimX, PilZ e PilB em células de *X. citri* durante a motilidade twitching. Visualização por *time-lapse* da localização de msfGFP-FimX (A), msfGFP-PilZ (B) e msfGFP-PilB (C) em células de *X. citri* selvagem levando estas fusões. Os números indicam o tempo em horas da aquisição das imagens. As imagens foram obtidas pela superposição da imagem de epifluorescência e de contraste de fase adquiridas com um microscópio de fluorescência com uma magnificação de 100x. A barra de escala é 5 μ m.

A **B** **C**

Figura 88. Dinâmica na localização de FimX, PilZ e PilB. Imagens representativas de células de *X. citri* levando as fusões msfGFP-FimX (A), msfGFP-PilZ (B) e msfGFP-PilB (C), onde se mostra que os foci das proteínas apresentam uma alta dinâmica durante a motilidade twitching, observando-se o seu aparecendo e desaparecendo (indicado em setas brancas). Os números indicam o tempo em minutos da aquisição das imagens. As imagens foram obtidas pela superposição da imagem de epifluorescência e de contraste de fase adquiridas com um microscópio de fluorescência com uma magnificação de 100x. A barra de escala é 3 μ M.

4.23 Infecção de *X. citri* pelo fago ΦXacm4-11

Infecção de bactéria por bacteriófagos requiere de estruturas específicas (receptores) na superfície celular bacteriana aos quais se ligam com uma alta especificidade para iniciar a infecção [210]. *X. citri* é infectado pelo bacteriófago ΦXacm4-11 em um processo dependente do T4P [21]. Na **Figura 89** se mostra experimentos que ilustram a suscetibilidade ao fago ΦXacm4-11 das diferentes cepas de *X. citri* produzidas neste trabalho. *Xac_Wt* foi suscetível ao infecção pelo fago ΦXacm4-11 e as cepas nocautes $\Delta pilZ$, $\Delta pilB$, $\Delta pilM$ e $\Delta pilC$ são resistentes à infecção (**Figura 89A**) indicando que a entrada e infecção do fago ΦXacm4-11 é dependente do T4P como foi previamente observado por nosso grupo [21].

As cepas de *X. citri* expressando as fusões de msfGFP-FimX, msfGFP-PilZ e msfGFP-PilB também foram avaliadas pela sua capacidade de serem infectadas pelo fago ΦXacm4-11. As cepas *Xac_msfGFP-FimX_Wt*, *Xac_msfGFP-PilZ_Wt* e *Xac_msfGFP-PilB_Wt* foram suscetíveis à infecção pelo fago ΦXacm4-11 gerando placas de lise claras (**Figura 89B-D**) similar ao observado na cepa selvagem *Xac_Wt*. Interessantemente a deleção dos domínios REC (ΔREC) e PAS (ΔPAS) de FimX na cepa *Xac_msfGFP-FimX* e o nocaute em *fimX* ($\Delta fimX$) em *Xac_msfGFP-PilB* são suscetíveis à infecção pelo fago ΦXacm4-11 produzindo placas de lise turvos característicos de cepas parcialmente resistentes à infecção [211,212]. Por outro lado, o mutante pontual msfGFP-FimX_{R543A} é suscetível a infecção do fago ΦXacm4-11 similar ao *Xac_msfGFP-FimX_Wt*.

Figura 89. Suscetibilidade de *X. citri* pelo fago $\Phi Xacm4-11$. Aliquotas de 5 μL de uma diluição seriada (10^0 - 10^{-10}) da solução stock do fago $\Phi Xacm4-11$ (10^8 UFP/mL) foram colocadas sobre uma fina capa do meio KB-ágar (0,7% w/v) suplementado com 100 μL de um cultivo de *X. citri* (secção 3.17) e incubado a 30 °C por 24 horas. A presença de placas de lise (zonas claras dentro de uma camada uniforme de crescimento bacteriano) indica infecção e lise bacteriana. **A)** Cepas de *X. citri* (*Xac*) selvagem (Wt) e nocautes de alguns dos componentes do T4P. Cepas de *X. citri* selvagem e mutantes levando a fusão msfGFP na região N-terminal das proteínas FimX (**B**), PilZ (**C**) e PilB (**D**) e as diversas mutantes produzidas. As cepas *Xac_Wt*, *Xac_msfGFP-FimX_Wt*, *Xac_msfGFP-PilZ_Wt* e *Xac_msfGFP-PilB_Wt* foram susceptíveis ao fago $\Phi Xacm4-11$ formando placas de lise claras. As placas de lises geradas nas cepas com deleção dos domínios REC e PAS de FimX (**B**) apresentaram um aspecto turvo comparado pelas placas formadas em *Xac_msfGFP-FimX_Wt*. A cepa *Xac_msfGFP-FimX_{R534A}* também foi susceptível à infecção pelo fago gerando placas de lise claras. A cepa de *Xac_msfGFP-PilB $\Delta fimX$* também foi susceptível ao fago $\Phi Xacm4-11$, mas as placas de lise formadas têm um aspecto turvo (**D**).

Tabela 21. Motilidade twitching, suscetibilidade ao fago Φ Xacm4-11 e localização subcelular de msfGFP-FimX, msfGFP-PilZ e msfGFP-PilB nas cepas de *X. citri*

Cepas	Motilidade twitching	Infecção pelo fago Φ Xacm4-11	Localização polar
Xac_msfGFP-FimX			
Wt	Sim	Sim	Sim
Δ REC	Não	Sim*	Não
Δ PAS	Não	Sim*	Não
R3534A	Sim	Sim	Sim
Δ pilZ	Não	Não	Não
Δ pilB	Não	Não	Não
Δ pilM	Não	Não	Sim
Xac_msfGFP-PilZ			
Wt	Sim	Sim	Sim
Δ fimX	Não	Não	Não
Δ pilB	Não	Não	Não
Δ pilM	Não	Não	Sim
Xac_msfGFP-PilB			
Wt	Sim	Sim	Sim
K343A	Não	Não	Sim
K343A/E407A	Não	Não	Não
Δ pilB _{Nt}	Não	Não	Não
Δ fimX	Não	Sim*	Não
Δ pilZ	Não	Não	Não
Δ pilM	Não	Não	Sim
Δ pilC	Não	Não	Sim
Δ pilT	Não	Não	Sim

(*) Cepas de *X. citri* que apresentam placas de lise turvos indicando resistência parcial à infecção do fago Φ Xacm4-11.

4.24 Efeito da mutação no resíduo Met117 de PilZ_{XAC1133} em *X. citri*

Na estrutura cristalográfica do complexo PilB₁₂₋₁₆₃-PilZ foi observado que a cadeia lateral do resíduo Met117 (último resíduo da cadeia polipeptídica) de PilZ se encaixa dentro de um sulco hidrofóbico formando por resíduos hidrofóbicos altamente conservados de PilZ e PilB (**Figura 47**), e mutações nesse resíduo afeta significativamente a formação do complexo PilB-PilZ *in vitro* (**Figura 51**). Com a finalidade de avaliar a importância do resíduo Met117 de PilZ *in vivo*, a cepa nocaute de PilZ (*Xac_ΔpilZ*) foi complementada com os plasmídeos levando duas versões de mutantes de PilZ, PilZ_{M117G} e PilZ_{ΔM117}, e submetidas a ensaio de motilidade twitching e suscetibilidade ao fago ΦXacm4-11. Na **Figura 90**, se mostra que as mutações em PilZ, M117G e ΔM117, abolem a motilidade twitching e a suscetibilidade de *X. citri* ao fago ΦXacm4-11, provavelmente por afetar as interações de PilZ com PilB bloqueando a formação do T4P.

Figura 90. Mutações no resíduo conservado Met117 do PilZ afeta a motilidade twitching e a infecção de *X. citri* pelo fago ΦXacm4-11. A) Motilidade twitching onde se mostra imagens de microscopia de fluorescência das zonas de twitching (borda da colônia) na superfície intersticial entre o ágar e a base de vidro da câmara de microscopia. **B)** Infecção de *X. citri* pelo fago ΦXacm4-11, as placas escuras indicam a zona de lise em um background de uma cultura uniforme de *X. citri*. *Xac_WT* (*X. citri* selvagem), a cepa nocaute *Xac_ΔpilZ* ($\Delta pilZ$) foi complementada com o plasmídeo pUFR047 que leva o gene *pilZ_{XAC1133}* selvagem ($\Delta pilZc$) e as mutantes *pilZ_{M117A}* e *pilZ_{ΔM117}*. As cepas de *X. citri* usadas em **A** foram transformadas com o plasmídeo pBBR1-MCS2-GFP que permite a expressão constitutiva de GFP.

4.25 Ensaios de microscopia de transmissão eletrônica (TEM)

4.25.1 Visualização do complexo ternário PilB-PilZ-FimX

Como mostrado na **Figura 58**, PilB, PilZ e FimX podem formar um complexo ternário com uma massa molar aparente de ~600 kDa (**Figura 76**), indicando uma provável estequiometria de 6PilB:6PilZ:2FimX (onde o complexo PilB-PilZ provavelmente formaria um anel hexamérico). A presença dos ligantes ATP γ S e c-di-GMP favorecem a estabilidade e/ou a formação do complexo. Com a finalidade de iniciar estudos estruturais por microscopia eletrônica, uma alíquota de 0,1 mg/mL do complexo ternário PilB-PilZ-FimX ($\pm$ ATP γ S/c-di-GMP) purificados por SEC foram colocados sobre uma grade de cobre coberta por uma fina capa de carbono (Ultrathin C film supported by lacey carbon film on a 400 mesh Cu grid) previamente carregado e corada negativamente com acetato de uranila (seção 3.18). Na **Figura 91** se mostram uma imagem de tinção negativa obtida por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) do complexo ternário PilB-PilZ-FimX na presença de ATP γ S e c-di-GMP (partículas não foram observadas na ausência de ATP γ S e c-di-GMP), onde se pode identificar facilmente algumas partículas, provavelmente em diversas orientações do complexo ternário. Também é observado uma heterogeneidade na amostra com a presença de partículas menores, possivelmente pela desmontagem do complexo. Na **Figura 92B**, observamos que as partículas identificadas do complexo ternário possuem um diâmetro aproximando de 165 Å. Esta distância é maior do que observado (142 Å) para o modelo hexamérico cristalográfico do domínio ATPase de um homólogo de PilB em *Geobacter metallireducens* (**Figura 92A**) que possui uma aparência alongada e assimétrica com uma simetria de ordem 2. Esta estrutura cristalográfica não possui a região N-terminal equivalente aos domínios ND0 e ND1 [111]. Além disso, nas partículas podem ser identificados sete lóbulos (**Figura 92B**) e não seis como esperado para uma proteína hexamérica. Isto possivelmente poderia ser explicado pela presença de FimX e PilZ.

Figura 91. Imagem de TEM das partículas do complexo ternário PilB-PilZ-FimX. Visualização das partículas do complexo ternário PilB-PilZ-FimX na presença de ATP γ S e c-di-GMP previamente purificado por SEC. Partículas com um tamanho aproximado de 16,5 nm (165 Å) foram observadas. As imagens foram obtidas usando um microscópio eletrônico de transmissão JOEL 3010 (LNNano-CNPEM). As amostras do complexo ternário (0.1 mg/mL) foram colocadas em uma grade (Ultrathin carbon film supported by lacey carbon film on a 400 mesh cooper grid) previamente carregada e sometidas a tincão negativa (negative stained) com acetato de uranila 2%. Barra de escala em branco é de 10 nm.

Figura 92. Comparação da estrutura cristalográfica de um homólogo de PilB e uma das partículas do complexo PilB-PilZ-FimX visualizadas por TEM. **A.** Modelo hexamérico de um homólogo de PilB em *Geobacter metallireducens* (PDB: 5TSH), onde se observa que a oligomerização de PilB adota uma conformação hexamérica alongada (145 Å) e apresenta uma simetria de ordem 2. Subunidades análogas se mostram na mesma cor. **B.** Visualização de uma das partículas facilmente observadas do complexo ternário PilB-PilZ-FimX na presença de ATP γ S e c-di-GMP as quais chamamos de top view. As partículas possuem uma forma de anel com sete lóbulos com um diâmetro aproximado de 165 Å. A barra de escala equivale a 100 Å.

4.25.2 Visualização do filamento do T4P em *X. citri*

O T4P são filamentos helicoidais extracelulares longas (vários micrometros de comprimento), finas (4-7 nm) e flexíveis, produzidos por uma ampla variedade de espécies bacterianas Gram-positivas, Gram-negativas e archaeas [8,213]. Estas estruturas tem sido visualizadas em bactérias como *N. gonorrhoeae* [214], *P. aeruginosa* [33,42,215], *M. xanthus* [130], *Acinetobacter baumannii* [216], *X. fastidiosa* [44,217] e em algumas espécies do gênero *Xanthomonas* incluindo *X. campestris* pv. *hyacinthi* [218] e *X. campestris* pv. *vesicatoria* [61]. Com a finalidade de observar os filamentos do T4P de *X. citri*, diversas cepas mutantes de *X. citri*, foram crescidas em meio KB-agar suplementado com 2mM CaCl_2 por 3 dias. Grades foram colocados sobre a borda das colônias e posteriormente coradas com acetato de uranila 2%. Na **Figura 93** se mostra imagens de TEM das cepas de *X. citri* onde se podem observar estruturas filamentosas, finas, longas e com diâmetro aproximado a 7 nm (**Figura 94**) similares ao observados previamente em outras bactérias. Nas cepas de *Xac_Wt* e $\Delta pilT$ foram observadas células hiperpiladas em um dos polos das células, sendo as células da cepa *Xac_ΔpilT* as que se apresentam com maior frequência hiperpiladas (devido à ausência da ATPase responsável da retração do pilus tpo IV). Porém, em *X. citri* selvagem (*Xac_Wt*) a frequência de células hiperpiladas é menor. Por outro lado, as cepas nocautes $\Delta pilB$, $\Delta pilA$, $\Delta pilC$, $\Delta pilM$ e $\Delta pilZ$ não apresentaram estas estruturas filamentosas o que confirma que estas estruturas correspondem aos filamentos do pilus tipo IV. Interessantemente, na cepa *Xac_ΔfimX*, que é resistente à infecção do fago Xacm4-11 [21] e é deficiente na motilidade twitching (**Figura 79 e 81B**), foram observadas células com estruturas correspondentes ao filamento do pilus tipo IV (**Figura 93**).

Figura 93. Visualização do filamento do T4P em *X. citri* por TEM. Células de *X. citri* crescidas em meio KB-água suplementado com 2 mM Ca_2Cl a 30 °C por 3 dias foram utilizadas para a visualização da presença do pilus tipo IV nas diferentes cepas. Estruturas filamentosas finas e curvadas (marcadas em setas pretas) com um diâmetro aproximado de 7 nm forma visualizadas nas cepas selvagem (*Wt*), $\Delta pilT$ e $\Delta fimX$. Em *Xac_Wt* e *Xac_ΔpilT* foram observadas a ser hiperpiladas num dos polos da célula, mas na cepa *Xac_ΔfimX* foi observado a ter um menor número de pilus. Em cepas de *Xac* nocautes nos genes $\Delta pilB$, $\Delta pilA$, $\Delta pilC$, $\Delta pilM$ e $\Delta pilZ$ não foram observadas aquelas estruturas. (*) Indica uma estrutura similar ao flagelo. Imagem foram tomadas com um TEM JEOL JEM 2100 (IQ-USP).

Figura 94. Filamento do pilus tipo IV. Visualização do filamento do pilus tipo IV onde se observa um filamento comprido com um diâmetro aproximado de 7 nm. Imagem foram tomadas com um TEM FEI Tecnai G20 200 Kv (ICB-USP).

4.25.3 Análise da interação de *X. citri* com o bacteriófago ΦXacm4-11 por microscopia eletrônica.

Como mostrado nas **Figura 89** e **90**, *X. citri* é infectada pelo fago ΦXacm4-11 e nocautes de algum dos componentes do T4P acaba com a suscetibilidade de *X. citri* à infecção pelo fago. Além disso, tem sido observado que adsorção do fago é dependente da retração do T4P [21]. Com a finalidade de estudar a morfologia do fago ΦXacm4-11, imagens de microscopia eletrônica do fago ΦXacm4-11 purificado foram adquiridas (secção 3.18). Na **Figura 95A** se mostra que o fago ΦXacm4-11 possui uma cabeça simétrica icosaédrica com um diâmetro de 60 nm e uma pequena cauda com um comprimento aproximado de 20 nm. A sua morfologia geral permite classificá-lo dentro da família de vírus *Podoviridae* [219,220]. Os podovirus se caracterizam porque possuem uma pequena cauda não contrátil [219] o que poderia explicar a importância da retração do T4P na infecção de *X. citri* pelo fago ΦXacm4-11.

Para ter indícios do mecanismo de infecção de *X. citri* pelo fago ΦXacm4-11, 200 µL dos cultivos de *Xac_Wt* e *Xac_ΔpilT*, crescidas até uma D.O_{600nm} de 0.3 em meio KB líquido suplementado com 2 mM CaCl₂, foram incubadas com 5 µL do fago ΦXacm4-11 (10⁵ PFU/mL) por 5 min a temperatura ambiente. Após a incubação, alíquotas foram usadas para a montagem de grades seguindo o protocolo descrito na secção 3.18 e imagens de microscopia eletrônica foram adquiridas. Na **Figura 95B** se observam células de *Xac_ΔpilT* hiperpiladas e a longo do pilus o fago ΦXacm4-11 ligado a elas, enquanto que, na **Figura 95C** se observa ao fago ΦXacm4-11 ligado (ou em contato) na superfície das células de

Xac_Wt provavelmente sendo infectadas. Pilus e fagos ligados ao pilus não foram observados nas células de *Xac_Wt*. Isto possivelmente porque o fago ao se ligar no pilus induz a sua retração em *Xac_Wt* e assim se aproxima na superfície da bactéria e infecta-la. Isto não aconteceria na cepa *Xac_ΔpilT* porque esta mutante é deficiente na retração do pilus.

Figura 95. Visualização da interação de *X. citri* com o bacteriófago Φ Xacm4-11. A, Imagem do bacteriófago Φ Xacm4-11. **B,** Fago Φ Xacm4-11 ligado ao filamento doT4P na cepa *Xac_ΔpilT*. **C,** Células de *X. citri* selvagem (*Xac_Wt*) sendo infectadas pelo fago Φ Xacm4-11.

5 Discussão

O T4P são filamentos longos e finos encontrados amplamente em diversos grupos bacterianos e que podem se estender, aderir-se a superfícies e posteriormente ser retraídos, facilitando desta maneira o movimento bacteriano, a aderência e a organização de grupos de células em estruturas maiores. Nosso grupo tem mostrado que em *X. citri* (*Xac*), o T4P está envolvido em diversos fenótipos bacterianos que inclui a formação de biofilme, motilidade twitching, aderência ao hospedeiro e na susceptibilidade ao bacteriófago Φ Xacm4-11 [21]. A biossíntese do pilus requer de PilB, a ATPase que fornece a energia necessária para a polimerização dos monômeros da pilina localizados na parte citoplasmática da membrana interna. Nosso grupo também identificou que duas proteínas, FimX e PilZ, atuam como reguladores da biossíntese do T4P em *X. citri* via interações com PilB, onde PilZ pode interagir tanto com FimX e PilB. Um complexo ternário entre as três proteínas foi observado por ensaio de far-Western e nocautes dos genes que codificam estas proteínas abolem a função do T4P [21,135,137]. As interações entre PilZ e o domínio EAL de FimX foram descritas em detalhe e a estrutura cristalográfica do complexo entre ambas as proteínas na presença de c-di-GMP foi publicado [135,147].

5.1 Evidências que FimX participa em resposta a sinais extracelulares

FimX é uma proteína modular que possui quatro domínios sensores: REC, PAS, GGDEF e EAL (**Figura 15**) os quais podem estar envolvidos na captação de sinais extra e intracelulares e/ou na interação proteína – proteína. Uma proteína homóloga a FimX (XAC2398) de *X. citri* foi inicialmente identificada em *P. aeruginosa* (PA4959, 32% de identidade e 50% de similaridade) [40] e recentemente foi reportada em *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (PXO_00403, 97% de identidade e 99% de similaridade) [60] e *Lysobacter capsici* (AZ78_4971, 54% de identidade e 71% de similaridade) [35]. Uma procura na base de dados do NCBI mostra que um número de bactérias que possuem genes que codificam para a maquinaria do T4P também possuem o gene que codifica para FimX como *S. maltophilia* (CAQ45526, 70% de identidade e 81% de similaridade), *X. fastidiosa* (XF2624, 29% de identidade e 48% de similaridade) e *Thioalkalivibrio sulfidophilus* (WP_018953183, 32% de identidade e 53% de similaridade). Por outro lado, bactérias que também produzem T4P como *N. gonorrhoeae* [40], *M. xanthus* [130], *G. sulfurreducens* [112], *V. cholerae* [126], *R. solanacearum* [221] e *C. perfringens*. [127] não possuem um homólogo de FimX.

O domínio FimX_{EAL} foi descrito como um receptor de alta afinidade para o segundo mensageiro c-di-GMP em *P. aeruginosa* e *X. citri*, além de estar envolvido na interação com PilZ em *X. citri* [125,135]. Pouco ou quase nada se sabe da função que realizam os

outros domínios de FimX e/ou as sinais intra e/ou extracelulares que estes podem estar reconhecendo. É conhecido que o domínio receptor N-terminal, REC, típico de proteínas reguladoras de resposta, carece do resíduo conservado Asp importante para sua fosforilação (**Figura 96**). Em *P. aeruginosa*, o domínio REC de FimX é importante para a localização polar (provavelmente pela interação com outra proteína) e a sua dimerização [40,140,141].

Figura 96. Alinhamento de sequência de domínios REC. Alinhamento de sequência de domínios REC de diversas proteínas. A caixa em vermelho mostra o resíduo de Asp (D) conservado que é fosforilado nestes domínios. O domínio REC de FimX_{XAC2398} não possui este Asp conservado.

Por ensaios de duplo híbrido, nós mostramos que o domínio REC de FimX_{XAC2398} poderia participar na interação com as proteínas XAC1996, XAC3213, que pertencem à família de methyl-accepting chemotaxis protein (MCP), e XAC4193, que pertencem ao sistema de dois componentes (two component systems). As proteínas destas famílias formam parte de vias que estão envolvidas na regulação de diversos aspectos da atividade celular incluindo a formação de biofilme [222], a biossíntese do flagelo [223], a produção de exopolissacarídeos [224], a motilidade twitching [225,226] e a virulência [26]. O fato que o domínio REC de FimX possa interagir com XAC1996, XAC3213 e XAC4193 nos indica que os sinais captados por essas proteínas poderão ser transmitidos por FimX regulando a biossíntese e a função do T4P, como a motilidade twitching ou a formação biofilme.

Em *P. aeruginosa*, a motilidade twitching pode ser estimulada pela presença de certos nutrientes como mucina (0,05%), BSA (0,1%) e tripton (5%) e inibida na presença

de 300 mM NaCl, 300 mM KCl, 5% de sacarose, 10% de glicose entre outros [40]. Similarmente, em *L. capsici* e em *X. citri* a ativação da motilidade twitching é dependente da composição do meio de cultura, sendo observada no meio PAM (Pear Agar Medium) [35] e no meio KB suplementado com CaCl_2 (**Tabela 1**) [21], respectivamente. Recentemente, FimX foi descrito como um sensor que permite a *P. aeruginosa* adaptar-se à disponibilidade de nutrientes no meio via ativação da motilidade twitching [146]. Como é que FimX pode sentir estes sinais ainda não é conhecido. Alguns trabalhos tem mostrado que genes que codificam para componentes dos sistemas quimio-sensoriais são requeridos para a motilidade twitching em *Synechocystis* sp. PCC6803 [227], *M. xanthus* [132] e *Acidovorax citrulli* [228]. Além disso, em *P. aeruginosa* a função das ATPases que controlam a polimerização e retração do T4P é dependente do sistema quimiosensor Chp composto por as proteínas ChpA (histidine kinase) e dos reguladores de resposta PilG e PilH, através de um mecanismo ainda desconhecido [133].

5.2 A interação entre PilZ e FimX

Nosso grupo previamente tem demonstrado que PilZ pode interagir com o domínio EAL de FimX e a estrutura cristalográfica deste complexo na presença de c-di-GMP foi resolvida [135,137]. Em nosso trabalho desta tese, nós conseguimos cristalizar um fragmento maior de FimX (FimX_{GGDEF-EAL}, resíduos 255-689) em complexo de com PilZ_{Δ107-117} e c-di-GMP. O domínio EAL de FimX, PilZ e c-di-GMP foram modelados na densidade eletrônica (3,4 Å) obtida do cristal do complexo FimX_{GGDEF-EAL_255-689}-PilZ_{Δ107-117}-cdiGMP. Infelizmente, não foi encontrada densidade eletrônica correspondente ao domínio GGDEF (**Figura 41**), provavelmente devido a flexibilidade do domínio que pode estar em diferentes orientações dentro do cristal. A análise da rede cristalina do cristal nos permite observar espaços onde poderia caber o domínio GGDEF na unidade assimétrica (**Figura 41B**). Similar problema foi encontrado para o cristal de FimX_{GGDEF-EAL} de *P. aeruginosa* onde não se encontrou densidade eletrônica para resolver a estrutura do domínio GGDEF [141]. Tendo em conta isto, surge a pergunta se a flexibilidade do domínio GGDEF em FimX observada por Navarro et al. [141] e por nosso grupo poderia ter alguma implicância na função da proteína? Nos também observamos que a interação de FimX e PilZ (ambas proteínas inteiras) de *X. citri* é menos estável, já que se observa uma dissociação do complexo por SEC (**Figura 32**) e a constante de afinidade (kd) da interação entre o domínio FimX_{EAL} e PilZ calculada por fluorescência foi de 0,2 μM (**Figura 70B**), um valor similar a 0,11 e 0,53 μM, calculado por ressonância plasmódica de superfície (SPR) e por calorimetria isotérmica de titulação isotérmica (ITC), respectivamente, calculado previamente para as mesmas proteínas [148].

5.3 A interação entre PilZ e PilB

Neste estudo, nós temos demonstrado pela primeira vez que a região N-terminal de PilB, compreendida pelos domínios ND0 e ND1 (resíduos 12-163), está envolvida na interação com PilZ (**Figura 26, 34 e 35**). Esta interação estabiliza PilB permitindo obter um complexo solúvel (**Figura 36 e 37**). A análise por RMN nos mostra que a região N-terminal de PilB isolada é parcial ou totalmente desenovelada (**Figura 50A**), o que pode explicar a insolubilidade da proteína inteira quando superexpressa em *E. coli*. A interação com PilZ, induz o enovelamento da região N-terminal de PilB evidenciado pelo espalhamento dos picos na dimensão ^1H no espectro HSQC de RMN (**Figura 50C**). Os domínios ND0 e ND1 de PilB de *X. citri* são homólogos a região N-terminal de XpsE (ATPase do T2SS de *X. campestris*) que foi cristalizado em duas conformações, aberta e fechada. Especificamente, os primeiros 36 resíduos de XpsE_{Nt} (correspondentes ao domínio ND0 em PilB) apresentam uma alta dinâmica e podem ser submetidos a um grande rearranjo estrutural observado na sua conformação fechada (**Figura 49B**), a qual é crítica para a função do T2SS por permitir a interação XpsE-XpsL (XpsL proteína homóloga a PilM e PilN no T4P) [109]. A mesma conformação fechada foi observada na estrutura cristalográfica de MshE_{Nt} em complexo com c-di-GMP. Interessantemente, os resíduos conservados envolvidos na ligação do c-di-GMP estão localizados no domínio ND0 [128], os quais não são conservados em PilB de *X. citri* ou XpsE de *X. campestris* (**Figura 14C e 98B**). A estrutura desenovelada de PilB_{Nt} em solução e a estrutura enovelada observada na estrutura cristalográfica no complexo PilB_{Nt}-PilZ (similar a conformação fechada de XpsE_{Nt} e no complexo MshE_{Nt}-c-di-GMP) nos dá indícios da importância funcional do rearranjo estrutural da região N-terminal de PilB quando interage com PilZ ou no caso de MshE_{Nt} quando interage com c-di-GMP.

A estrutura previamente publicada do complexo entre GspE (homólogo de PilB e XpsE) e o domínio citoplasmático de GspL (homólogo a PilM e ao domínio citoplasmático de XpsL), componentes do T2SS em *V. vulnificus*, mostra que a região N-terminal de GspE (equivalente ao domínio ND1 em PilB, MshE e XpsE) interage com GspL [181]. A comparação estrutural do complexo GspE_{Nt}-GspL_{cyto} com o complexo PilB_{Nt}-PilZ (**Figura 97**) aponta para uma possível importância da interação de PilB_{Nt} com PilZ na biossíntese do T4P. Esta comparação sugere que a interação com PilZ induz o enovelamento de PilB_{Nt} permitindo a sua interação com PilM, conectando PilB com um componente da plataforma da membrana interna do T4P. Interessantemente, GspE_{Nt} não possui o domínio ND0, observado em PilB, MshE e XpsE (**Figura 49**), o que poderia indicar diferentes mecanismos envolvidos na interação entre as ATPases e a maquinaria de biossíntese do T4P/T2SS. A ausência do domínio ND0 também foi observada em outras ATPases

homologas de GspE como ExeE (*Aeromonas hydrophila*), Pule (*Klebsiella oxytoca*) e OutE (*Erwinia chrysanthemi*) [109].

Mutações nos resíduos conservados de PilZ (Δ M117, M117G, W69A e Δ 107-117) afetam drasticamente a interação com PilB_{Nt} (**Figura 51**). A importância funcional da interação entre PilB_{Nt}-PilZ é demonstrada pela não restauração da motilidade twitching e da susceptibilidade à infecção pelo fago Φ Xacm4-11 na cepa de *X. citri* Δ *pilZ* complementada com as mutantes Δ M117 e M117G aqui testadas (**Figura 91**) e com as mutantes W69A e Δ 107-117 observado previamente por nosso grupo [21]. Tendo em conta isto, nós propomos que a interação de PilZ com PilB é importante para permitir que PilB se ancore na base da maquinaria de biossíntese do T4P via sua interação com PilM, favorecendo a biossíntese do pilus tipo IV *in vivo*. Resultados preliminares de RMN obtidos por nosso grupo (ainda não publicados), mostram que PilB_{Nt} e PilM interagem fracamente e que esta interação é mais forte na presença de PilZ, o que poderia corroborar a nossa hipótese. Nosso modelo também é consistente com o estudo por tomografia crio-eletrônica da maquinaria do T4P de *M. xanthus* [90]. Neste modelo, PilB foi proposto para ser ancorado dentro de um anel formado por PilM na base do pilus (**Figura 9B**).

Figura 97. Comparação estrutural dos complexos PilB_{Nt}-PilZ e GspE_{Nt}-GspL_{cyto}. Superposição das estruturas cristalográficas dos complexos PilB_{Nt}-PilZ e GspE_{Nt}-GspL_{cyto} (PDB: 4PHT) tomando como referência o domínio ND1 de PilB_{Nt} (verde) e de GspE_{Nt} (laranja). Em azul se mostra o domínio citoplasmático de GspL (GspL_{cyto}) domínio homólogo a PilM no T4P. Em amarelo se mostra a PilZ. A comparação das estruturas nos mostra que a interação de PilZ com PilB_{Nt} poderia ser importante para a interação de PilB_{Nt} com PilM.

5.4 Mecanismos de regulação de montagem do T4P e do T2SS

Chen et al. propôs duas subclasses de ATPases associadas ao T4P/T2SS baseadas no comprimento de sua região N-terminal: longa (que possuem os domínios ND0 e ND1) como em XpsE e curta (que possuem somente o domínio ND1) como em GspE [109]. A presença do domínio ND0 nestas ATPases pode refletir mecanismos diferentes de regulação.

As estruturas cristalográficas do XpsE e GspE e dos complexos PilB_{Nt}-PilZ e MshE-c-di-GMP, nos revelam os diversos mecanismos que estão envolvidos na regulação da biossíntese do T4P e T2SS, via interação da ATPase responsável da biossíntese do T4P com a maquinaria do sistema: i) mecanismos que requerem a interação proteína – proteína como observado neste trabalho, onde PilZ induz o enovelamento de PilB_{Nt} (**Figura 98A**), ii) mecanismos de interação proteína – ligante como observado em MshE de *V. cholerae*, onde a ligação do segundo mensageiro c-di-GMP ao seu extremo N-terminal poderia induzir o enovelamento ou transição à conformação fechada da proteína (**Figura 98B**), iii) mecanismos de equilíbrio entre duas conformações (aberta e fechada) observada em XpsE_{Nt} (**Figura 98C**) e iv) mecanismos que não dependem de algum rearranjo conformacional por não possuir o domínio ND0 como em GspE_{Nt} (**Figura 98D**).

Figura 98. Mecanismos envolvidos na ligação das ATPases de montagem com a maquinaria de T4P e T2SS. **A)** Estrutura cristalográfica do complexo PilB_{Nt}-pilZ (PilB em verde e PilZ em amarelo), **B)** Estrutura cristalográfica do complexo MshE_{Nt}-c-di-GMP (PDB: 5HTL), e no lado esquerdo um zoom do domínio ND0 que liga c-di-GMP **C)** Estruturas cristalográficas de XpsE_{Nt} em suas conformações aberta (PDB: 2D27) e fechada (PDB: 2D28), e **D)** Estrutura cristalográfica de GspE_{Nt} (PDB: 4PHT), note-se a ausência do domínio ND0 em GspE_{Nt}.

5.5 Oligomerização e atividade ATPásica de PilB

PilB_{XAC3239}, ATPase que participa no processo de polimerização /extensão do T4P em *X. citri*, pertence a uma superfamília de ATPases hexaméricas relacionadas aos sistemas de secreção tipo II/IV (T2SS e T4SS) [177]. Nós observamos que *in vitro* o estado oligomérico de PilB em complexo com PilZ é um dímero de heterodímeros (PilB-PilZ)₂ (**Figura 75**), o que pode explicar sua baixa atividade ATPásica (**Figura 77B**). A presença de um análogo não hidrolisável de ATP (ATP_γS), além de estabilizar sua forma dimérica e/ou induzir uma mudança conformacional, pode também induzir a hexamerização do complexo PilB-PilZ (**Figura 75**). Mudanças conformacionais e aumento na estabilidade térmica após a ligação de ATP tem sido observadas em homólogos de PilB em *Geobacter* sp. [111,112] e *T. thermophilus* [65,184]. Algumas ATPases como PilB2 de *C. perfringens*,

PilF (ATPase responsável pela captação de DNA) em *T. thermophilus* [65] e GspE em *Archaeoglobus fulgidus* [191] são hexâmeros na ausência de ATP. Outras ATPases, como PilB em *M. xanthus* [206], GspE em *V. cholerae* [180] são monômeros ou no caso de XpsE em *X. campestris*, a presença de ATP induz a formação de hexâmeros [178].

Análise estrutural de homólogos de PilB, sugerem fortemente que a forma ativa destas proteínas são hexâmeros e que as interações entre subunidades no hexâmero poderiam ser importantes para a atividade ATPásica [111,112,188]. Em EpsE/GspE, ATPase do T2SS em *V. cholerae*, foi observado que oligômeros hexaméricos possuem maior atividade que monômeros (até 100 vezes maior), mas hexâmeros estão presentes em menor quantidade [180,203]. Muitos fatores podem contribuir ao incremento da atividade das ATPases associadas ao T4P/T2SS. Por exemplo: i) a atividade ATPásica da forma hexamérica de PilB de *M. xanthus* é estimulada pela presença de PilC [229], ii) em EpsE, a presença de fosfolipídios e de seu parceiro de interação, o domínio citoplasmático de EpsL, induzem a formação de oligômeros, possivelmente hexâmeros, estimulando consideravelmente sua atividade ATPásica [207], e iii) a atividade ATPásica de XpsE é estimulada por interações com o domínio citoplasmático de XpsL [178].

No caso do complexo PilB-PilZ de *X. citri*, a presença de FimX aumenta (até três vezes) a atividade ATPásica de PilB (**Figura 77B**), possivelmente ao estimular a sua oligomerização (hexâmero) (**Figura 76**). A adição de cardiolipina e c-di-GMP (ligante de FimX) na reação não tem efeito na atividade ATPásica de PilB (**Figura 78**). Em ATPases que ligam diretamente c-di-GMP, como PilB2 de *C. perfringens*, a presença do ligante também não afeta sua atividade enzimática [127]. Porém, em MshE (*V. cholerae*) foi observado um incremento de 10% [126]. Em contraste, outras proteínas que ligam c-di-GMP, como a celulose sintase de *Acetobacter xylinum*, incrementa sua atividade em resposta a c-di-GMP [230]. As ATPases Flil e HrcN, do sistema flagelar e do T3SS, respectivamente, ligam c-di-GMP e a ligação inibe sua atividade ATPásica [231]. PilM e PilC, componentes associados à membrana interna do T4P, preditos para interagir com PilB em *X. citri* como observado para outras bactérias, são os possíveis candidatos para estimular a atividade ATPásica de PilB via interação proteína – proteína induzindo (ou estabilizando) possivelmente sua oligomerização. Além disso, PilM também possui a capacidade de ligar, mas não hidrolisar, ATP, e foi proposto que a ligação de ATP modula a sua interação com PilN em *P. aeruginosa* e *T. thermophilus* [107,232]. Isto pode nos indicar que a concentração de ATP na célula pode também atuar como um regulador da biossíntese do T4P.

5.6 Evidências da formação do complexo ternário PilB-PilZ-FimX

A formação de um complexo ternário entre PilB, PilZ e FimX_{GGDEF-EAL} foi inicialmente observada por nosso grupo por ensaio de far-Western [137]. Apesar que os dados cristalográficos dos complexos binários PilB_{Nt}-PilZ e FimX_{EAL}-PilZ (PDB: 4FOU) mostram que PilB_{Nt} e FimX_{EAL} compartilham a mesma interface de interação com PilZ, nós temos conseguido visualizar a formação do complexo ternário entre PilB, PilZ e FimX. Interessantemente, PilZ mostra ter maior afinidade por PilB_{Nt} (K_d=4,1 nM) que por FimX_{EAL} (K_d=200 nM) em ensaios de fluorescência usando PilZ marcada com 5-hidroxitriptofano. Estas interações também foram observadas em ensaios de *pull-down* por co-expressão e purificação por cromatografia de afinidade (**Figura 61A e C**), por SEC (**Figura 55, 56 e 58**) e por RMN (**Figura 67 e 68**). Usando uma mistura (1:1) do complexo binário PilB_{Nt}-PilZ com os fragmentos FimX_{EAL} e FimX_{GGDEF-EAL} (**Figura 55 e 56**), observamos a formação de um complexo estável por SEC mas não com FimX inteira ou com o fragmento FimX_{PAS-GGDEF-EAL} (**Figura 57**). Estas interações foram confirmadas por ensaios de RMN, envolvendo os complexos marcados PilB_{Nt}(¹⁴N)-PilZ(¹⁵N) e PilB_{Nt}(¹⁵N)-PilZ(¹⁴N) e a adição de FimX_{EAL}(¹⁴N) onde observamos o desaparecimento e a diminuição da intensidade de vários dos picos pela adição de FimX_{EAL} no espectro de. Este fenômeno pode ser explicado pela formação de um complexo de alta massa molecular entre PilB_{Nt}-PilZ-FimX_{EAL} (~54 kDa) (**Figura 67 e 68**).

Por outro lado, FimX inteira e FimX_{GGDEF-EAL} são capazes de interagir com o complexo PilB-PilZ (PilB inteira), sendo este complexo ternário mais estável com FimX inteira do que com os fragmentos FimX_{EAL} e FimX_{GGDEF-EAL} (**Figura 58, 59 e 61**). Por SEC-MALS, determinamos que o complexo ternário PilB-PilZ-FimX possui uma massa de 590 kDa e 605 kDa na ausência e presença de ATP_γS e c-di-GMP, respectivamente. Isso sugere que a presença dos ligantes ATP_γS e c-di-GMP podem favorecer a formação deste complexo (**Figura 76A**). A massa observada para este complexo ternário é consistente com uma estequiometria de 6PilB:6PilZ:2FimX, consistente com as observações que i) PilB pode formar hexâmeros (**Figura 75**) assim como outras ATPases da mesma família, ii) uma molécula de PilZ interage com uma molécula de PilB como observados na estrutura cristalográfica (**Figura 46**) e por SEC-MALS (**Figura 74C e D**) e iii) que o FimX é um dímero como observado por SEC-MALS (**Figura 73A**). Ainda permanece por ser determinado se a estequiometria observada *in vitro* por SEC-MALS aconteceria também *in vivo*.

O fato que a interação de PilB-PilZ-FimX_{GGDEF-EAL} seja menos estável do que o complexo contendo FimX inteira levanta a hipótese que os domínios N-terminais de FimX (REC, PAS) podem estar interagindo com PilB, permitindo a formação de um

complexo ternário estável e estas interações podem ser fracas na ausência de PilZ, não sendo possíveis detectá-las *in vitro*. Ensaios de interação entre PilB e FimX (ambas as proteínas inteiras) não puderam ser realizados devida à insolubilidade de PilB na ausência de PilZ (**Figura 36**). Outros experimentos de interação envolvendo construções de FimX sem o domínio EAL (domínio de interação com PilZ) e o complexo PilB-PilZ e/ou usando um fragmento de PilB que não contenha sua região N-terminal (domínios ND2-ATPase) precisam ser feitos para detectar possíveis interações entre esses fragmentos de FimX e PilB.

A estequiometria proposta do complexo 6PilB:6PilZ:2FimX, nos indica que o complexo PilB-PilZ formaria um anel hexamérico como observado nas estruturas cristalográficas de outras ATPases homologas a PilB. Imagens obtidas por microscopia eletrônica nos mostraram que as partículas do complexo PilB-PilZ-FimX possuem uma forma de anéis com sete lóbulos facilmente visualizados e não seis como esperado para um anel hexamérico (**Figura 92 e 93**). Este lóbulo extra pode representar a presença de FimX no complexo. Estas partículas foram facilmente observadas na presença dos ligantes ATP γ S e c-di-GMP o que reforça a ideia que os ligantes estabilizam a formação deste complexo.

As estruturas cristalográficas de PilB (domínios ND2-ATPase) de *Geobacter sp.* [111,112] e *T. thermophilus* [188], assim como de GspE de *V. cholerae* [180], mostram uma estrutura hexamérica alongada com uma simetria de ordem 2, com as subunidades A e D, B e E e C e F formando pares opostos com conformação equivalentes. Assim, três estados conformacionais tem sido identificado nestas estruturas: i) aberta (forma apo, com alta afinidade ao ATP), ii) fechada (ligado a ADP, alta afinidade ao ADP) e iii) um estado intermediário chamado 'aberta' (ligado a ADP, após a hidrólise do ATP) [112], representados pelas cadeias A, C e B na **Figura 99A**, respectivamente. A simetria de ordem 2 observada nas estruturas hexaméricas de PilB e a observação de que FimX é um dímero nos podem indicar que cada dímero de FimX pode interagir com um dos três pares de subunidades equivalentes no hexâmero de PilB (complexo PilB-PilZ) (**Figura 99C**). Esta hipótese será consistente com nossa observação da formação do complexo ternário 6PilB:6PilZ:2FimX.

Figura 99. Modelo de interação do complexo ternário PilB-PilZ-FimX: **A)** Estrutura cristalográfica de PilB (domínio ND2-ATPase) de *Geobacter sulfurreducens* (PDB: 5ZFR), mostrando uma estrutura hexamérica alongada com uma simetria de ordem 2 com as suas subunidades A-D (roxo), B-E (laranja) e C-F (azul) formando pares equivalentes. **B)** Modelo hexamérico do complexo PilB-PilZ de *Xanthomonas citri* baseado na estrutura cristalográfica observada em A, mostrando o anel hexamérico como em A e a sua região N-terminal (verde) em complexo com PilZ (amarelo). **C)** Modelo do complexo ternário PilB-PilZ-FimX, mostrando a estequiometria observada por SEC-MALS, onde o dímero de FimX estaria interagindo com o hexâmero do complexo binário PilB-PilZ. O domínio EAL poderia estar interagindo com PilZ e/ou com a região N-terminal de PilB por outro lado os outros domínios de FimX (REC, PAS e GGDEF) poderia também estar fazendo contatos com PilB.

5.7 Evidencia da importância da formação do complexo ternário PilB-PilZ-FimX.

Com os dados aqui descritos ainda não é possível entender como é que a formação deste complexo ternário ocorre. Ensaios de interação por SEC mostraram que a mutante PilZ_{F28A}, mas não a mutante PilZ_{W69A}, afeta a interação com FimX [135]. Por outro lado, a mutante PilZ_{W69A}, mas não a mutante PilZ_{F28A}, afeta a interação com PilB (**Figura 55C**). No contexto do complexo ternário (PilB_{Nt}-PilZ-FimX_{GGDEF-EAL}), a mutante PilZ_{W69A} afeta drasticamente a estabilidade do complexo, mas a formação do complexo ternário não é comprometida por PilZ_{F28A} (**Figura 65**). Estas observações podem dar indícios que a interface de interação observada no complexo binário PilB_{Nt}-PilZ é mantida no complexo ternário e que FimX pode estar formando novas interações com PilZ e/ou PilB, o que seria consistente com a maior afinidade que existe entre PilZ e PilB. Ensaios de fluorescência também mostraram que PilB_{Nt} é capaz de interagir com o complexo binário PilZ_{50HW}-FimX_{EAL} observado pela mudança de fluorescência (**Figura 72A e B**). Por outro lado, não foram observadas mudanças na fluorescência quando o complexo PilZ_{50HW}-PilB_{Nt} foi titulado com FimX_{EAL} (**Figura 72C**) indicando que a interface de interação do complexo PilZ_{50HW}-PilB_{Nt} é mantida na formação do complexo ternário ou que FimX_{EAL} não interage como o complexo PilZ_{50HW}-PilB_{Nt} nas condições testadas (baixas concentrações, 1 µM de cada proteína). Estes resultados são consistentes com ensaios funcionais previamente publicados por nosso grupo, onde a mutante PilZ_{F28A}, mas não a mutante PilZ_{W69A}, restaura os fenótipos de motilidade twitching e a susceptibilidade à infecção pelo fago Xacm4-11 na cepa de *X. citri* $\Delta pilZ$. Tomando em conta todos estes resultados, a formação do complexo ternário PilB-PilZ-FimX *in vivo* é importante para a correta função e regulação da biossíntese do T4P. Recentemente, em *P. aeruginosa*, foi reportado que FimX e PilB interagem diretamente na ausência de PilZ [145]. É importante notar que interações entre PilZ e FimX do mesmo organismo não tem sido demonstradas [148]. Isto nos revela que os mecanismos que regulam a biossíntese do T4P em *X. citri* e *P. aeruginosa* possivelmente são diferentes.

5.8 Localização polar de FimX, PilB e PilZ

A visualização por microscopia de fluorescência de FimX, PilZ e PilB marcadas com msfGFP em células de *X. citri* realizando twitching, demonstrou que a localização de FimX, PilZ e PilB é unipolar e localizam no polo celular que lidera a motilidade (leading pole), onde a extensão e a retração do T4P está ocorrendo. Nossos resultados indicam que a distribuição de PilB, PilZ e FimX é assimétrica (**Figura 83 – 87**) e altamente dinâmica (**Figura 88**) mostrando que, como em *M. xanthus* e *Synechocystis* sp. [233,234], a direção

da motilidade twitching em *X. citri* é controlada pela localização do motor ATPásico PilB, juntos com os seus reguladores PilZ e FimX (**Figura 87**). Esta correlação entre a localização unipolar de FimX, PilZ e PilB e a direção da motilidade sugere que as três proteínas trabalham juntas regulando a polimerização e de alguma maneira poderiam também estar regulando a retração do T4P.

A função do T4P depende de ciclos de extensão e retração do pilus, e até agora permanece aberta a pergunta de como a atividade ATPásica de PilB e PilT são regulados para permitir a separação temporal da extensão e retração do pilus. Nossos dados de localização de PilB, PilZ e FimX em células fazendo twitching e das interações observadas entre estas proteínas, provem uma possível solução a esta pergunta. Como esperado, PilB, PilZ e FimX se localizam no polo líder onde ocorre a polimerização do T4P possivelmente interagindo entre elas formando um complexo como observado *in vitro*, permitindo a polimerização do pilus. A desmontagem deste complexo (observado pelo desaparecimento dos foci no polo líder) poderia permitir a entrada de PilT, a ATPase responsável pela retração, junto com outras proteínas envolvidas na regulação da reação.

A localização de FimX, PilZ e PilB parece ser dependente das interações entre elas. Fazemos esta afirmação com base em nossas observações onde a deleção dos genes *pilZ*_{XAC1133} e *pilB*_{XAC3239} afeta a localização de FimX, a deleção de *fimX*_{XAC2398} e *pilZ*_{XAC1133} afeta a localização PilB e a deleção de *fimX*_{XAC2398} e *pilB*_{XAC3239} afetam a localização de PilZ (**Figura 86**). Ainda não é claro como ocorrem as interações entre FimX, PilZ e PilB e qual é o mecanismo pelo qual elas localizam no polo celular. Baseado em nossos dados, a interação de PilZ com PilB parece ser importante para a localização e retenção de PilB no polo da célula, talvez permitindo a sua interação com PilM e possivelmente facilitando a interação com os domínios citoplasmáticos de PilC (componentes do complexo de membrana interna do T4P), os quais poderiam transmitir a energia proveniente da hidrólise do ATP no citoplasma por PilB até o periplasma onde ocorre a polimerização e extensão do pilus [111].

Figura 100. Modelo da localização de PilB, PilZ, FimX e PilT durante a motilidade twitching. A localização de PilB, PilZ e FimX é unipolar durante a motilidade twitching dirigindo a direção do movimento. Foci das proteínas marcadas com msfGFP aparecem e desaparecem no polo que lidera a motilidade. As proteínas localizam no polo líder provavelmente durante a polimerização do pilus formando um complexo que regula este processo. A desaparecimento dos foci de FimX, PilZ e PilB podem indicar a desmontagem deste complexo no polo permitindo o ingresso de PilT, responsável pela retração do pilus.

A localização subcelular de FimX parece também ser dependente dos seus domínios REC e PAS (**Figura 83**). Além disso, as cepas de *X. citri*, *Xac_msfGFP-FimX_{ΔREC}* e *Xac_msfGFP-FimX_{ΔPAS}*, possuem reduzida sensibilidade à infecção pelo fago ΦXacm4-11 (**Figura 74B**) e são deficientes na motilidade twitching (**Figura 80A**). Isto nos indica que a localização polar de FimX é importante para a motilidade twitching, mas sua localização não polar ainda pode suportar parcialmente a biossíntese do T4P. Uma observação semelhante foi feito em *P. aeruginosa*, onde a complementação da cepa *ΔfimX* com a quimera RFP-FimX_{ΔREC}, não localiza nos polos, mas restaura parcialmente a infecção por fago e a formação do pilus na superfície [123].

Uma mutação pontual em FimX no resíduo R534A não afeta sua localização polar, mas reduz levemente o número de foci observados (**Figura 86A**). Este mutante foi previamente reportado como importante na ligação de c-di-GMP e na formação do complexo com PilZ por nosso grupo [135]. O fato de não observar mudanças significativas na localização da mutante FimX_{R534A} pode nos indicar que esta mutante ainda é capaz de ligar ou talvez não liga c-di-GMP mas continua funcionando *in vivo* e/ou que essa mutante não afeta a formação do complexo ternário mesmo que seja importante para a formação do complexo binário FimX-PilZ. Isto é consistente com nossas observações que células de *X. citri* levando a mutação pontual R534A em FimX ainda podem realizar twitching (**Figura 80A**) e são infectadas pelo fago ΦXacm4-11 (**Figura 89B**). Por outro lado, a localização de FimX em *P. aeruginosa* é predominantemente unipolar e mutações nos resíduos importantes para a ligação de c-di-GMP fazem que a localização de FimX seja

predominantemente bipolar [40,123,145]. Porém, foi recentemente reportado que a localização polar de FimX é também dependente PilB e vice-versa em *P. aeruginosa* [145].

O gene de *pilC*_{XAC3242} está localizado no mesmo cluster gênico de *pilB*_{XAC3238} e é predito para codificar uma proteína integral de membrana de ~45 kDa. O gene de *pilM*_{XAC3385} está localizado em um outro operon junto com os genes que codificam para as proteínas do complexo de membrana interna PilMNOPQ e é predito para codificar uma proteína citoplasmática de ~38 kDa [124]. Ambas as proteínas, PilC e PilM tem sido observado para interagir com PilB em *M. xanthus* [229]. Nós observamos que a deleção dos genes *pilC* e *pilM* afeta a localização polar de PilB em *X. citri* e cepas levando estas mutações são deficientes em twitching e não são susceptíveis à infecção pelo fago ΦXacm4-11. Baseada nestes resultados, PilM e PilC podem atuar como âncoras para reter a PilB no polo da célula assim como transmitir a energia produzida por PilB durante a hidrólise de ATP no citoplasma até o periplasma onde acontece a montagem do pilus. Em *P. aeruginosa*, a deleção de *pilM* não afeta a localização polar de PilB mas sim é afetada pela deleção de *pilC* [108] e foi observado que PilB e PilC interagem *in vitro* [105]. Por outro lado, em *M. xanthus*, a deleção de *pilM* e *pilC* afeta a localização de PilB [90]. Nós também observamos que a localização de FimX pode ser afetado pela ausência de PilM, e isto pode ser explicado pela observação que PilM afeta a localização de PilB, que por sua vez afeta a localização de FimX. Em *P. aeruginosa*, também foi observado que a localização polar de FimX é afetado pela deleção de *pilQ*, *pilF* e *pilC* (componentes do complexo de membrana externa e interna da maquinaria do T4P) podendo indicar que FimX é recrutada após a montagem do T4P [145].

Dado que a oligomerização de AAA ATPases é requerido para sua função e interação com outros componentes do T4P [229], surge a pergunta se a oligomerização poderia ser requerida para a localização polar de PilB? Nós observamos que a mutante de PilB no resíduo K343A (Walker A) que não ligaria ATP, como sugerido pelas observações para outras ATPases da mesma família levando a mesma mutação [183], localiza no polo da célula com maior frequência que a PilB selvagem (**Figura 86C**). Porém, a dupla mutante de PilB nos resíduos K343A e E407A (Walker A e B, respectivamente) não localiza no polo celular, sugerindo que esta dupla mutação, mas não a mutação no resíduo K343A, estaria afetando a oligomerização de PilB. Isto, consistente com as nossas observações por SEC, em que a dupla mutação K343A e E407A em PilB afetaria a oligomerização do complexo PilB-PilZ-FimX (**Figura 63**). Em *M. xanthus*, a mutante de PilB_{E391A} (Walker B) afeta a sua localização polar [233] e em *P. aeruginosa*, uma mutação similar em PilT (ATPase de retração) não afeta a localização bipolar da proteína, mas sim é afetada pela mutação num

resíduo do motivo Walker A [190]. PilB, em *P. aeruginosa*, apresenta uma localização bipolar, mas a fusão de YFP no extremo N-terminal resulta uma proteína não funcional [108]. Em *V. cholerae*, PilB (PilB-GFP), além de localizar nos polos, forma vários foci distintos que se deslocam por toda a célula mostrando uma alta dinâmica. Mutações no resíduo E394A (Walker B) de PilB de *V. cholerae* não afeta a localização de PilB mas afeta o comportamento dinâmico da proteína [22]. Finalmente, a localização de PilB em *X. citri* não é dependente de PilT, similar como foi observado em *M. xanthus* [233].

5.9 Observação dos filamentos do T4P e evidências da sua interação com o fago ΦXacm4-11

A visualização dos filamentos do T4P por microscopia de transmissão (TEM), em *X. citri* nos mostra que estes filamentos são estruturas polares, finas com um diâmetro de ~7 nm e vários micrometros de comprimentos (**Figura 93 e 94**), similar à que foi previamente visualizado em bactérias como *P. aeruginosa*, *M. xanthus*, *Xanthomonas* sp. entre outras [33,61,130,218]. Estes filamentos foram observados nas cepas *Xac_Wt* e *Xac_ΔpilT*, sendo encontrados com maior frequência nas células da cepa *Xac_ΔpilT* devido à ausência da ATPase responsável da retração do pilus, PilT. Interessantemente, na cepa *Xac_ΔfimX*, deficiente na motilidade twitching, a formação de biofilme e susceptibilidade na infecção do fago Xacm4-11 [21], foram observadas células com estruturas correspondentes aos filamentos do T4P em número menor ao observado na cepa de *X. citri* selvagem (*Xac_Wt*). Isto pode nos indicar que na ausência de FimX, a cepa *Xac_ΔfimX* pode produzir T4P, sendo a sua presença importante mas não essencial para a biossíntese do T4P, e sim é indispensável para a função do T4P. Isto é consistente como o observado em *P. aeruginosa*, onde a cepa mutante em *fimX* ainda é capaz de produzir o pilus (níveis extracelulares de PilA reduzidos), mas sua localização polar é afetada observando-se pilus com localização polar e não polar por microscopia eletrônica [40,123]. Além disso, a biossíntese do T4P e a formação de biofilme é restaurado em altas concentrações intracelulares de c-di-GMP na nocaute em *fimX* em *P. aeruginosa* [33].

A infecção de *X. citri* pelo fago ΦXacm4-11 foi observado para ser dependente do T4P [21]. Nossas observações de microscopia eletrônica nos mostram que o fago ΦXacm4-11 pertence à família de vírus *Podoviridae*, e se caracteriza por possuir cabeça simétrica icosaédrica e uma pequena cauda não contrátil [219,220] (**Figura 95A**). Ao não possuir uma cauda contrátil, o fago poderia usar o filamento do T4P para infectar a *X. citri*. O fago ΦXacm4-11 se liga ao longo do filamento do T4P (**Figura 95B**) e pode induzir a retração do filamento permitindo que entre em contato com a célula e seguidamente infectá-la (**Figura 95C**). Um fato interessante é que a deleção de *fimX* na cepa de *X. citri*

expressando a quimera msfGFP-PilB (*Xac_msfGFP-PilB_ΔfimX*), incapaz de realizar twitching (**Figura 80C**), não acaba totalmente com a susceptibilidade a infecção pelo fago ΦXacm4-11 (**Figura 89C**), indicando que a cepa ainda é capaz de produzir um pilus funcional que permite a interação pilus – fago e posteriormente seu ingresso na bactéria. Isto pode ser consistente com as nossas observações na que a cepa *X. citri_ΔfimX* ainda é capaz de produzir filamentos do T4P (**Figura 93**), porem esta cepa não é susceptível ao fago ΦXacm4-11 [21]. Isto levanta a hipótese em que a fusão de msfGFP no extremo N-terminal de PilB poderia de alguma forma mimetizar a presença de FimX (ou de seu domínio EAL), restaurando parcialmente a função do T4P na cepa *Xac_msfGFP-PilB_ΔfimX*.

5.10 Considerações finais

Nós propomos um modelo onde FimX atua como um regulador de resposta sentindo sinais extra ou intracelulares direta (sinais captados pelos seus domínios PAS e EAL) ou indiretamente (via interação proteína – proteína de seu domínio REC com proteínas de sinalização como as MCP) regulando por exemplo a motilidade twitching ou a formação de biofilme. Estes sinais podem regular as interações de FimX com PilZ aumentando ou diminuindo sua afinidade assim como a sua localização subcelular. PilZ também interage com PilB permitindo sua localização na base do T4P via interação com PilM e com PilC. Os sinais sentidos por FimX poderiam ser transmitidos por PilZ para PilB estimulando sua atividade ATPase e a polimerização do pilus. Durante a retração, sinais captados por FimX poderia aumentar a sua afinidade por PilZ, sequestrando-a e permitindo a saída de PilB da base do pilus permitindo o ingresso de PilT, ATPase responsável pela retração do pilus.

6 Conclusões

As primeiras evidências que a biossíntese do T4P em *X. citri* é regulado por PilZ e FimX foram observadas por nosso grupo, mas os mecanismos envolvidos ainda são desconhecidos [137]. Só era conhecido que PilZ pode interagir como o domínio EAL de FimX e com PilB, a ATPase responsável pela biossíntese do T4P, e que estas três proteínas podiam formar um complexo ternário [135,137].

FimX forma homodímeros em solução de uma maneira que depende do domínio N-terminal REC responsável da dimerização, e a presença de c-di-GMP induz mudanças conformacionais na proteína. Este domínio N-terminal é importante para a sua localização polar e a sua interação com outras proteínas como MCPs. Estas interações poderiam ajudar a *X. citri* a se adaptar a diferentes ambientes, já seja no ambiente externo e dentro da planta durante a infecção, regulando formação de biofilme e/ou a motilidade.

Neste trabalho conseguimos resolver a estrutura cristalográfica do complexo PilB_{Nt}-PilZ. Observamos também que a região N-terminal de PilB é desestruturada e que a interação com PilZ induz uma marcada mudança conformacional (enovelamento) nesta região. Esta mudança conformacional em PilB_{Nt} permitiria a interação de PilB com PilM e com o resto da maquinaria biossintética do T4P, revelando pela primeira vez um dos mecanismos envolvidos na regulação da biossíntese do T4P em *X. citri*. Resíduos altamente conservados em PilZ como W69 e a região C-terminal são importantes para as interações com PilB e a estabilidade do complexo PilB-PilZ. Mutações nestes resíduos acabam com a motilidade twitching de *X. citri* e com a sua susceptibilidade ao bacteriófago ΦXacm4-11.

Apesar que as estruturas cristalográficas dos complexos binários PilB_{Nt}-PilZ e PilZ-FimX_{EAL} nos mostram que PilZ compartilha a mesma interface de interação com PilB_{Nt} e FimX_{EAL}, as três proteínas podem formar um complexo ternário com uma provável estequiometria *in vitro* de 6PilB:6PilZ:2FimX e a presença de FimX aumenta a atividade ATPásica do complexo PilB-PilZ. Por outro lado, a presença c-di-GMP e ATPγS (análogo não hidrolisável de ATP) estabilizam a formação deste complexo ternário. *In vivo*, a formação do complexo ternário é importante para a correta função do T4P, já que mutantes de PilZ que desestabilizam o complexo ternário *in vitro* não restauram os fenótipos de twitching e a susceptibilidade à infecção do fago ΦXacm4-11. Em células de *X. citri* fazendo twitching, a localização de PilB, PilZ e FimX é unipolar e dinâmica e a localização destas proteínas no polo celular é importante para a direção da motilidade.

A infecção de *X. citri* pelo fago Φ Xacm4-11 é dependente do T4P e a interação do fago com a bactéria ocorre a longo do filamento do T4P. Esta interação pode estimular a retração do pilus, permitindo a entrada do DNA do fago na bactéria.

7 Referencias

1. Ryan RP, Vorhölter F-J, Potnis N, Jones JB, Van Sluys M-A, Bogdanove AJ, Dow JM: **Pathogenomics of Xanthomonas: understanding bacterium–plant interactions**. *Nat Rev Microbiol* 2011, **9**:344–355.
2. Sayers EW, Barrett T, Benson DA, Bryant SH, Canese K, Chetvernin V, Church DM, DiCuccio M, Edgar R, Federhen S, et al.: **Database resources of the National Center for Biotechnology Information**. *Nucleic Acids Res* 2009, **37**:D5–D15.
3. Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW: **GenBank**. *Nucleic Acids Res* 2009, **37**:D26–D31.
4. Boch J, Bonas U: **Xanthomonas AvrBs3 Family-Type III Effectors: Discovery and Function**. *Annu Rev Phytopathol* 2010, **48**:419–436.
5. Buttner D, Bonas U, Büttner D, Bonas U, Buttner D, Bonas U: **Regulation and secretion of Xanthomonas virulence factors**. *FEMS Microbiol Rev* 2010, **34**:107–133.
6. Saddler GS, Bradbury JF: **Xanthomonadales ord. nov.** In *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. . Springer US; 2005:63–122.
7. Brunings AM, Gabriel DW: **Xanthomonas citri: breaking the surface**. *Mol Plant Pathol* 2003, **4**:141–157.
8. Craig L, Pique ME, Tainer JA: *Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity*. Nature Publishing Group; 2004.
9. Vojnov AA, Moraes do Amaral A, Dow JM, Castagnaro AP, Marano MR, do Amaral AM, Dow JM, Castagnaro AP, Marano MR: **Bacteria causing important diseases of citrus utilise distinct modes of pathogenesis to attack a common host**. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010, **87**:467–477.
10. Belasque Júnior J, Bassanezi RB, Spósito MB, Ribeiro LM, Jesus Junior WC de, Amorim L: **Escalas diagramáticas para avaliação da severidade do cancro cítrico**. *Fitopatol Bras* 2005, **30**:387–393.
11. Gottwald TR: **Citrus canker**. *Plant Heal Instr* 2000, doi:10.1094/PHI-I-2000-1002-01.
12. da Silva ACR, Ferro JA, Reinach FC, Farah CS, Furlan LR, Quaggio RB, Monteiro-Vitorello CB, Sluys MA Van, Almeida NF, Alves LMC, et al.: **Comparison of the genomes of two Xanthomonas pathogens with differing host specificities**. *Nature* 2002, **417**:459–463.
13. Shi W, Lux R: **Focal adhesion: getting a grasp on myxobacterial gliding**. *Nat Chem Biol* 2007, **3**:205–206.
14. Bardy SL, Ng SYM, Jarrell KF: **Prokaryotic motility structures**. *Microbiology* 2003, **149**:295–304.
15. Haiko J, Westerlund-Wikström B: **The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence**. *Biology (Basel)* 2013, **2**:1242–67.
16. Kearns DB: **A field guide to bacterial swarming motility**. *Nat Rev Microbiol* 2010, **8**:634–44.
17. Harshey RM: **Bacterial Motility on a Surface: Many Ways to a Common Goal**. *Annu Rev Microbiol* 2003, **57**:249–273.
18. Mattick JS: **Type IV Pili and Twitching Motility**. *Annu Rev Microbiol* 2002, **56**:289–314.
19. Nan B: **Bacterial Gliding Motility: Rolling Out a Consensus Model**. *Curr Biol* 2017, **27**:R154–R156.
20. Giltner CL, Nguyen Y, Burrows LL: **Type IV pilin proteins: versatile molecular modules**. *Microbiol Mol Biol Rev* 2012, **76**:740–772.
21. Dunger G, Guzzo CR, Andrade MO, Jones JB, Farah CS: **Xanthomonas citri subsp. citri type IV Pilus is required for twitching motility, biofilm development, and adherence**. *Mol Plant Microbe Interact* 2014, **27**:1132–47.
22. Seitz P, Blokesch M: **DNA-uptake machinery of naturally competent Vibrio cholerae**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, **110**:17987–17992.
23. Bradley DE, Pitt TL, By N, Bradley DE, Pitt TL: **Pilus-dependence of four Pseudomonas aeruginosa bacteriophages with non-contractile tails**. *J Gen Virol* 1974, **24**:1–15.

24. Dörr J, Hurek T, Reinhold-Hurek B: **Type IV pili are involved in plant-microbe and fungus-microbe interactions.** *Mol Microbiol* 1998, **30**:7–17.
25. Reguera G, McCarthy KD, Mehta T, Nicoll JS, Tuominen MT, Lovley DR: **Extracellular electron transfer via microbial nanowires.** *Nature* 2005, **435**:1098–1101.
26. Persat A, Inclan YF, Engel JN, Stone HA, Gitai Z: **Type IV pili mechanochemically regulate virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015, **112**:7563–7568.
27. Leighton TL, Buensuceso RNCC, Howell PL, Burrows LL: **Biogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili and regulation of their function.** *Environ Microbiol* 2015, **17**:4148–4163.
28. Maier B, Wong GCL: **How Bacteria Use Type IV Pili Machinery on Surfaces Composition and Structure of Type IV Pili.** *Trends Microbiol* 2015, **23**:775–788.
29. Eriksson J, Eriksson OS, Maudsdotter L, Palm O, Engman J, Sarkissian T, Aro H, Wallin M, Jonsson AB: **Characterization of motility and piliation in pathogenic *Neisseria*.** *BMC Microbiol* 2015, **15**:92.
30. Ellison CK, Dalia TN, Vidal Ceballos A, Wang JC-YY, Biais N, Brun Y V., Dalia AB: **Retraction of DNA-bound type IV competence pili initiates DNA uptake during natural transformation in *Vibrio cholerae*.** *Nat Microbiol* 2018, **3**:773–780.
31. Roux N, Spagnolo J, de Bentzmann S: **Neglected but amazingly diverse type IVb pili.** *Res Microbiol* 2012, **163**:659–673.
32. Salzer R, Joos F, Averhoff B: **Type IV pilus biogenesis, twitching motility, and DNA uptake in *Thermus thermophilus*: discrete roles of antagonistic ATPases PilF, PilT1, and PilT2.** *Appl Env Microbiol* 2014, **80**:644–652.
33. Jain R, Behrens A-JJ, Kaever V, Kazmierczak BI: **Type IV pilus assembly in *Pseudomonas aeruginosa* over a broad range of cyclic di-GMP concentrations.** *J Bacteriol* 2012, **194**:4285–4294.
34. Wall D, Kaiser D: **Type IV pili and cell motility.** *Mol Microbiol* 1999, **32**:01-10.
35. Tomada S, Puopolo G, Perazzolli M, Musetti R, Loi N, Pertot I: **Pea Broth Enhances the Biocontrol Efficacy of *Lysobacter capsici* AZ78 by Triggering Cell Motility Associated with Biogenesis of Type IV Pilus.** *Front Microbiol* 2016, **7**:1136.
36. Semmler ABTT, Whitchurch CB, Mattick JS: **A re-examination of twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*.** *Microbiology* 1999, **145**:2863–2873.
37. Skerker JM, Berg HC: **Direct observation of extension and retraction of type IV pili.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**:6901–6904.
38. Sun H, Zusman DR, Shi W: **Type IV pilus of *Myxococcus xanthus* is a motility apparatus controlled by the *frz* chemosensory system.** *Curr Biol* 2000, **10**:1143–1146.
39. Burrows LL: ***Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action.** *Annu Rev Microbiol* 2012, **66**:493–520.
40. Huang B, Whitchurch CB, Mattick JS: **FimX, a Multidomain Protein Connecting Environmental Signals to Twitching Motility in *Pseudomonas aeruginosa*.** *J Bacteriol* 2003, **185**:7068–7076.
41. O'Toole GA, Kolter R: **Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development.** *Mol Microbiol* 1998, **30**:295–304.
42. Chiang P, Burrows LL: **Biofilm formation by hyperpiliated mutants of *Pseudomonas aeruginosa*.** *J Bacteriol* 2003, **185**:2374–8.
43. Comolli J, Hauser A, Waite L, CB W, Mattick J, Engel J: **gene products PilT and PilU are required for cytotoxicity in vitro and virulence in a mouse model of acute pneumonia.** *Pseudomonas aeruginosa* 1999, **67**:3625.
44. Meng YZ, Li YX, Galvani CD, Hao GX, Turner JN, Burr TJ, Hoch HC: **Upstream migration of *Xylella fastidiosa* via pilus-driven twitching motility.** *J Bacteriol* 2005, **187**:5560–5567.
45. Sauer K: **The genomics and proteomics of biofilm formation.** *Genome Biol* 2003, **4**:219.
46. Malamud F, Torres PS, Roeschlin R, Rigano LA, Enrique R, Bonomi HR, Castagnaro AP, Marano MR, Vojnov AA: **The *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* flagellum is required for mature biofilm and canker development.** *Microbiology* 2011, **157**:819–829.

47. Saxena P, Joshi Y, Rawat K, Bisht R: **Biofilms: Architecture, Resistance, Quorum Sensing and Control Mechanisms.** *Indian J Microbiol* 2019, **59**:3–12.
48. Yi K, Rasmussen AW, Gudlavalleti SK, Stephens DS, Stojiljkovic I: **Biofilm formation by *Neisseria meningitidis*.** *Infect Immun* 2004, **72**:6132–8.
49. Teschler JK, Zamorano-Sanchez D, Utada AS, Warner CJA, Wong GCL, Linington RG, Yildiz FH, Zamorano-Sánchez D, Utada AS, Warner CJA, et al.: **Living in the matrix: assembly and control of *Vibrio cholerae* biofilms.** *Nat Rev Microbiol* 2015, **13**:255–268.
50. Xicohtencatl-Cortes J, Monteiro-Neto V, Saldaña Z, Ledesma MA, Puente JL, Girón JA: **The type 4 pili of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 are multipurpose structures with pathogenic attributes.** *J Bacteriol* 2009, **191**:411–21.
51. Maldarelli GA, Piepenbrink KH, Scott AJ, Freiberg JA, Song Y, Achermann Y, Ernst RK, Shirliff ME, Sundberg EJ, Donnenberg MS, et al.: **Type IV pili promote early biofilm formation by *Clostridium difficile*.** *Pathog Dis* 2016, **74**:ftw061.
52. Klausen M, Aaes-Jørgensen A, Molin S, Tolker-Nielsen T: **Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms.** *Mol Microbiol* 2003, **50**:61–8.
53. Kaiser D: **Coupling cell movement to multicellular development in myxobacteria.** *Nat Rev Microbiol* 2003, **1**:45–54.
54. Merz AJ, So M, Sheetz MP: **Pilus retraction powers bacterial twitching motility.** *Nature* 2000, **407**:98–102.
55. Wu SS, Wu J, Kaiser D: **The *Myxococcus xanthus* pilT locus is required for social gliding motility although pili are still produced.** *Mol Microbiol* 1997, **23**:109–121.
56. McKee RW, Aleksanyan N, Garrett EM, Tamayo R: **Type IV Pili Promote *Clostridium difficile* Adherence and Persistence in a Mouse Model of Infection.** *Infect Immun* 2018, **86**:e00943-17.
57. Bieber D, Ramer SW, Wu CY, Murray WJ, Tobe T, Fernandez R, Schoolnik GK: **Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*.** *Science* 1998, **280**:2114–8.
58. Lim MS, Ng D, Zong Z, Arvai AS, Taylor RK, Tainer JA, Craig L: ***Vibrio cholerae* El Tor TcpA crystal structure and mechanism for pilus-mediated microcolony formation.** *Mol Microbiol* 2010, **77**:755–770.
59. Taguchi F, Ichinose Y: **Role of Type IV Pili in Virulence of *Pseudomonas syringae* pv. tabaci 6605: Correlation of Motility, Multidrug Resistance, and HR-Inducing Activity on a Nonhost Plant.** *Mol Plant-Microbe Interact* 2011, **24**:1001–1011.
60. Yang F, Tian F, Li X, Fan S, Chen H, Wu M, Yang CH, He C: **The degenerate EAL-GGDEF domain protein Filp functions as a cyclic di-GMP receptor and specifically interacts with the PilZ-domain protein PXO_02715 to regulate virulence in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.** *Mol Plant Microbe Interact* 2014, **27**:578–589.
61. Ojanen-Reuhs T, Kalkkinen N, Westerlund-Wikstrom B, van Doorn J, Haahtela K, Nurmiaho-Lassila EL, Wengelnik K, Bonas U, Korhonen TK, Westerlund-Wikström B, et al.: **Characterization of the fimA gene encoding bundle-forming fimbriae of the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.** *J Bacteriol* 1997, **179**:1280–1290.
62. Burdman S, Bahar O, Parker JK, De La Fuente L: **Involvement of Type IV Pili in Pathogenicity of Plant Pathogenic Bacteria.** *Genes (Basel)* 2011, **2**:706–35.
63. Muschiol S, Balaban M, Normark S, Henriques-Normark B: **Uptake of extracellular DNA: Competence induced pili in natural transformation of *Streptococcus pneumoniae*.** *BioEssays* 2015, **37**:426–435.
64. Mell JC, Hall IM, Redfield RJ: **Defining the DNA uptake specificity of naturally competent *Haemophilus influenzae* cells.** *Nucleic Acids Res* 2012, **40**:8536–8549.
65. Collins RFF, Hassan D, Karuppiiah V, Thistlethwaite A, Derrick JPP: **Structure and mechanism of the PilF DNA transformation ATPase from *Thermus thermophilus*.** *Biochem J* 2013, **450**:417–425.
66. Goodman SD, Scocca JJ: **Identification and arrangement of the DNA sequence recognized in**

- specific transformation of *Neisseria gonorrhoeae*.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988, **85**:6982–6.
67. Mell JC, Redfield RJ: **Natural Competence and the Evolution of DNA Uptake Specificity.** *J Bacteriol* 2014, **196**:1471–1483.
 68. Haq IU, Chaudhry WN, Akhtar MN, Andleeb S, Qadri I: **Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review.** *Virology* 2012, **9**:9.
 69. Salmond GPC, Fineran PC: **A century of the phage: past, present and future.** *Nat Rev Microbiol* 2015, **13**:777–786.
 70. Heo Y-J, Chung I-Y, Choi KB, Lau GW, Cho Y-H: **Genome sequence comparison and superinfection between two related *Pseudomonas aeruginosa* phages, D3112 and MP22.** *Microbiology* 2007, **153**:2885–2895.
 71. Harvey H, Bondy-Denomy J, Marquis H, Sztanko KM, Davidson AR, Burrows LL: ***Pseudomonas aeruginosa* defends against phages through type IV pilus glycosylation.** *Nat Microbiol* 2018, **3**.
 72. Waldor MK, Mekalanos JJ: **Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin.** *Science* 1996, **272**:1910–4.
 73. Roine E, Raineri DM, Romantschuk M, Wilson M, Nunn DN: **Characterization of Type IV Pilus Genes in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000.** *Mol Plant-Microbe Interact* 1998, **11**:1048–1056.
 74. Yang YC, Chou CP, Kuo TT, Lin SH, Yang MK: **PilR enhances the sensitivity of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri to the infection of filamentous bacteriophage Cf.** *Curr Microbiol* 2004, **48**:251–261.
 75. Ahern SJ, Das M, Bhowmick TS, Young R, Gonzalez CF: **Characterization of novel virulent broad-host-range phages of *Xylella fastidiosa* and *Xanthomonas*.** *J Bacteriol* 2014, **196**:459–471.
 76. McCutcheon JG, Peters DL, Dennis JJ: **Identification and Characterization of Type IV Pili as the Cellular Receptor of Broad Host Range *Stenotrophomonas maltophilia* Bacteriophages DLP1 and DLP2.** *Viruses* 2018, **10**.
 77. Narulita E, Addy HS, Kawasaki T, Fujie M, Yamada T: **The involvement of the PilQ secretin of type IV pili in phage infection in *Ralstonia solanacearum*.** *Biochem Biophys Res Commun* 2016, **469**:868–872.
 78. Ahmad AA, Askora A, Kawasaki T, Fujie M, Yamada T: **The filamentous phage XacF1 causes loss of virulence in *Xanthomonas axonopodis* pv. citri, the causative agent of citrus canker disease.** *Front Microbiol* 2014, **5**:321.
 79. Addy HS, Askora A, Kawasaki T, Fujie M, Yamada T: **Loss of Virulence of the Phytopathogen *Ralstonia solanacearum* Through Infection by ϕ RSM Filamentous Phages.** *Phytopathology* 2012, **102**:469–477.
 80. Craig L, Li J: **Type IV pili: paradoxes in form and function.** *Curr Opin Struct Biol* 2008, **18**:267–277.
 81. Kolappan S, Coureuil M, Yu X, Nassif X, Egelman EH, Craig L: **Structure of the *Neisseria meningitidis* type IV pilus.** *Nat Commun* 2016, **7**.
 82. Friedrich C, Bulyha I, Sogaard-Andersen L, Sogaard-Andersen L: **Outside-in assembly pathway of the type IV pilus system in *Myxococcus xanthus*.** *J Bacteriol* 2014, **196**:378–390.
 83. Melville S, Craig L: **Type IV pili in Gram-positive bacteria.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2013, **77**:323–341.
 84. Li J, Egelman EH, Craig L: **Structure of the *Vibrio cholerae* Type IVb Pilus and stability comparison with the *Neisseria gonorrhoeae* type IVa pilus.** *J Mol Biol* 2012, **418**:47–64.
 85. Oki H, Kawahara K, Maruno T, Imai T, Muroga Y, Fukakusa S, Iwashita T, Kobayashi Y, Matsuda S, Kodama T, et al.: **Interplay of a secreted protein with type IVb pilus for efficient enterotoxigenic *Escherichia coli* colonization.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018, **115**:7422–7427.
 86. Bravo D, Blondel CJ, Hoare A, Leyton L, Valvano MA, Contreras I: **Type IVB pili are required for invasion but not for adhesion of *Salmonella enterica* serovar Typhi into BHK epithelial cells in a cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-independent manner.** *Microb Pathog* 2011, **51**:373–377.
 87. Ramsugit S, Pillay M: **Pili of *Mycobacterium tuberculosis*: current knowledge and future prospects.** *Arch Microbiol* 2015, **197**:737–744.

88. Pelicic V: **Type IV pili: e pluribus unum?** *Mol Microbiol* 2008, **68**:827–837.
89. Peabody CR, Chung YJ, Yen M-RR, Vidal-Ingigliardi D, Pugsley AP, Jr MHS, Saier Jr. MH, Saier MH, Saier ' MH: **Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella.** *Microbiology* 2003, **149**:3051–3072.
90. Chang Y-WW, Rettberg LA, Treuner-Lange A, Iwasa J, Sogaard-Andersen L, Jensen GJ: **Architecture of the type IVa pilus machine.** *Science (80-)* 2016, **351**:aad2001.
91. Gold VAM, Salzer R, Averhoff B, Kuhlbrandt W, Kuhlbrandt W: **Structure of a type IV pilus machinery in the open and closed state.** *Elife* 2015, **4**.
92. Koo J, Tammam S, Ku S-Y, Sampaleanu LM, Burrows LL, Howell PL: **PilF is an outer membrane lipoprotein required for multimerization and localization of the Pseudomonas aeruginosa Type IV pilus secretin.** *J Bacteriol* 2008, **190**:6961–9.
93. Siewering K, Jain S, Friedrich C, Webber-Birungi MT, Semchonok DA, Binzen I, Wagner A, Huntley S, Kahnt J, Klingl A, et al.: **Peptidoglycan-binding protein TsaP functions in surface assembly of type IV pili.** *Proc Natl Acad Sci* 2014, **111**:E953–E961.
94. Wehbi H, Portillo E, Harvey H, Shimkoff AE, Scheurwater EM, Howell PL, Burrows LL: **The peptidoglycan-binding protein FimV promotes assembly of the Pseudomonas aeruginosa type IV pilus secretin.** *J Bacteriol* 2011, **193**:540–50.
95. Hospenthal MK, Costa TRD, Waksman G: **A comprehensive guide to pilus biogenesis in Gram-negative bacteria.** *Nat Rev Microbiol* 2017, **15**:365–379.
96. Strom MS, Nunn DN, Lory S: **A single bifunctional enzyme, PilD, catalyzes cleavage and N-methylation of proteins belonging to the type IV pilin family.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, **90**:2404–2408.
97. Berry J-LL, Pelicic V: **Exceptionally widespread nanomachines composed of type IV pilins: the prokaryotic Swiss Army knives.** *FEMS Microbiol Rev* 2015, **39**:134–154.
98. Nivaskumar M, Bouvier G, Campos M, Nadeau N, Yu X, Egelman EH, Nilges M, Francetic O: **Distinct docking and stabilization steps of the pseudopilus conformational transition path suggest rotational assembly of type IV pilus-like fibers.** *Structure* 2014, **22**.
99. Alm RA, Mattick JS: **Identification of two genes with prepilin-like leader sequences involved in type 4 fimbrial biogenesis in Pseudomonas aeruginosa.** *J Bacteriol* 1996, **178**:3809–17.
100. Carbonnelle E, Helaine S, Prouvensier L, Nassif X, Pelicic V, Hélaine S, Prouvensier L, Nassif X, Pelicic V: **Type IV pilus biogenesis in Neisseria meningitidis: PilW is involved in a step occurring after pilus assembly, essential for fibre stability and function.** *Mol Microbiol* 2005, **55**:54–64.
101. Nguyen Y, Sugiman-Marangos S, Harvey H, Bell SD, Charlton CL, Junop MS, Burrows LL: **Pseudomonas aeruginosa minor pilins prime type IVa pilus assembly and promote surface display of the PilY1 adhesin.** *J Biol Chem* 2015, **290**:601–11.
102. Helaine S, Dyer DH, Nassif X, Pelicic V, Forest KT: **3D structure/function analysis of PilX reveals how minor pilins can modulate the virulence properties of type IV pili.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**:15888–93.
103. Wolfgang M, van Putten JPM, Hayes SF, Koomey M: **The comP locus of Neisseria gonorrhoeae encodes a type IV prepilin that is dispensable for pilus biogenesis but essential for natural transformation.** *Mol Microbiol* 1999, **31**:1345–1357.
104. Tammam S, Sampaleanu LM, Koo J, Manoharan K, Daubaras M, Burrows LL, Howell PL: **PilMNOPQ from the Pseudomonas aeruginosa type IV pilus system form a transenvelope protein interaction network that interacts with PilA.** *J Bacteriol* 2013, **195**:2126–2135.
105. Takhar HK, Kemp K, Kim M, Howell PL, Burrows LL: **The platform protein is essential for type IV pilus biogenesis.** *J Biol Chem* 2013, **288**:9721–9728.
106. Tammam S, Sampaleanu LM, Koo J, Sundaram P, Ayers M, Chong PA, Forman-Kay JD, Burrows LL, Howell PL: **Characterization of the PilN, PilO and PilP type IVa pilus subcomplex.** *Mol Microbiol* 2011, **82**:1496–1514.
107. McCallum M, Tammam S, Little DJ, Robinson H, Koo J, Shah M, Calmettes C, Moraes TF, Burrows LL, Howell PL: **PilN binding modulates the structure and binding partners of the Pseudomonas**

- aeruginosa type IVa pilus protein PilM.** *J Biol Chem* 2016, **291**:11003–11015.
108. Chiang P, Habash M, Burrows LL: **Disparate subcellular localization patterns of *Pseudomonas aeruginosa* Type IV pilus ATPases involved in twitching motility.** *J Bacteriol* 2005, **187**:829–839.
 109. Chen Y, Shiue S-JJ, Huang C-WW, Chang J-LL, Chien Y-LL, Hu N-TT, Chan N-LL: **Structure and function of the XpsE N-terminal domain, an essential component of the *Xanthomonas campestris* type II secretion system.** *J Biol Chem* 2005, **280**:42356–42363.
 110. Craig L, Volkmann N, Arvai AS, Pique ME, Yeager M, Egelman EHH, Tainer JA: **Type IV pilus structure by cryo-electron microscopy and crystallography: implications for pilus assembly and functions.** *Mol Cell* 2006, **23**:651–662.
 111. McCallum M, Tammam S, Khan A, Burrows LL, Howell PL, Lynne Howell P, Howell PL: **The molecular mechanism of the type IVa pilus motors.** *Nat Commun* 2017, **8**:15091.
 112. Solanki V, Kapoor S, Thakur KG: **Structural insights into the mechanism of Type IVa pilus extension and retraction ATPase motors.** *FEBS J* 2018, **285**:3402–3421.
 113. Römmling U, Galperin MY, Gomelsky M, Römmling U, Galperin MY, Gomelsky M: **Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2013, **77**:1–52.
 114. Hengge R: **Principles of c-di-GMP signalling in bacteria.** *Nat Rev Microbiol* 2009, **7**:263–273.
 115. Jenal U, Malone J: **Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria.** *Annu Rev Genet* 2006, **40**:385–407.
 116. Schirmer T, Jenal U: **Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signalling.** *Nat Rev Microbiol* 2009, **7**:724–735.
 117. Navarro M V, Newell PD, Krasteva P V, Chatterjee D, Madden DR, O'Toole GA, Sondermann H: **Structural basis for c-di-GMP-mediated inside-out signaling controlling periplasmic proteolysis.** *PLoS Biol* 2011, **9**:e1000588.
 118. Whitney JC, Colvin KM, Marmont LS, Robinson H, Parsek MR, Howell PL: **Structure of the cytoplasmic region of PelD, a degenerate diguanylate cyclase receptor that regulates exopolysaccharide production in *Pseudomonas aeruginosa*.** *J Biol Chem* 2012, **287**:23582–23593.
 119. Amikam D, Galperin MY: **PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein.** *Bioinformatics* 2006, **22**:3–6.
 120. Sudarsan N, Lee ER, Weinberg Z, Moy RH, Kim JN, Link KH, Breaker RR: **Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP.** *Science (80-)* 2008, **321**:411–413.
 121. An SQ, Chin KH, Febrer M, McCarthy Y, Yang JG, Liu CL, Swarbreck D, Rogers J, Maxwell Dow J, Chou SH, et al.: **A cyclic GMP-dependent signalling pathway regulates bacterial phytopathogenesis.** *EMBO J* 2013, **32**:2430–2438.
 122. Valentini M, Filloux A: **Biofilms and Cyclic di-GMP (c-di-GMP) Signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and Other Bacteria.** *J Biol Chem* 2016, **291**:12547–55.
 123. Kazmierczak BI, Lebron MB, Murray TS: **Analysis of FimX, a phosphodiesterase that governs twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*.** *Mol Microbiol* 2006, **60**:1026–1043.
 124. Dunger G, Llontop E, Guzzo CR, Farah CS: **The *Xanthomonas* type IV pilus.** *Curr Opin Microbiol* 2016, **30**:88–97.
 125. Qi Y, Chuah MLC, Dong X, Xie K, Luo Z, Tang K, Liang Z-XX: **Binding of cyclic diguanylate in the non-catalytic EAL domain of FimX induces a long-range conformational change.** *J Biol Chem* 2011, **286**:2910–2917.
 126. Roelofs KG, Jones CJ, Helman SR, Shang X, Orr MW, Goodson JR, Galperin MY, Yildiz FH, Lee VT: **Systematic Identification of Cyclic-di-GMP Binding Proteins in *Vibrio cholerae* Reveals a Novel Class of Cyclic-di-GMP-Binding ATPases Associated with Type II Secretion Systems.** *PLoS Pathog* 2015, **11**:e1005232.
 127. Hendrick WA, Orr MW, Murray SR, Lee VT, Melville SB: **Cyclic di-GMP binding by an assembly ATPase (PilB2) and control of type IV pilin polymerization in the Gram-positive pathogen *Clostridium perfringens*.** *J Bacteriol* 2017, **199**:1–17.
 128. Wang Y-CC, Chin K-HH, Tu Z-L Le, He J, Jones CJ, Sanchez DZ, Yildiz FH, Galperin MY, Chou S-HH:

- Nucleotide binding by the widespread high-affinity cyclic di-GMP receptor MshEN domain.** *Nat Commun* 2016, **7**:12481.
129. Bordeleau E, Purcell EB, Lafontaine DA, Fortier L-C, Tamayo R, Burrus V: **Cyclic di-GMP riboswitch-regulated type IV pili contribute to aggregation of *Clostridium difficile*.** *J Bacteriol* 2015, **197**:819–32.
 130. Skotnicka D, Petters T, Heering J, Hoppert M, Kaever V, Søgaard-Andersen L: **Cyclic Di-GMP Regulates Type IV Pilus-Dependent Motility in *Myxococcus xanthus*.** *J Bacteriol* 2016, **198**:77–90.
 131. Iyer LM, Leippe DD, Koonin E V, Aravind L: **Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases.** *J Struct Biol* 2004, **146**:11–31.
 132. Schumacher D, Søgaard-Andersen L: **Regulation of Cell Polarity in Motility and Cell Division in *Myxococcus xanthus*.** *Annu Rev Microbiol* 2017, **71**:61–78.
 133. Bertrand JJ, West JT, Engel JN: **Genetic analysis of the regulation of type IV pilus function by the Chp chemosensory system of *Pseudomonas aeruginosa*.** *J Bacteriol* 2010, **192**:994–1010.
 134. Cowles KN, Gitai Z: **Surface association and the MreB cytoskeleton regulate pilus production, localization and function in *Pseudomonas aeruginosa*.** *Mol Microbiol* 2010, **76**:1411–1426.
 135. Guzzo CR, Dunger G, Salinas RK, Farah CS: **Structure of the PilZ-FimXEAL-c-di-GMP Complex Responsible for the Regulation of Bacterial Type IV Pilus Biogenesis.** *J Mol Biol* 2013, **425**:2174–2197.
 136. Alm RA, Boder AJ, Free PD, Mattick JS: **Identification of a novel gene, pilZ, essential for type 4 fimbrial biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*.** *J Bacteriol* 1996, **178**:46–53.
 137. Guzzo CR, Salinas RK, Andrade MO, Farah CS: **PILZ Protein Structure and Interactions with PILB and the FIMX EAL Domain: Implications for Control of Type IV Pilus Biogenesis.** *J Mol Biol* 2009, **393**:848–866.
 138. Benach J, Swaminathan SS, Tamayo R, Handelsman SK, Folta-Stogniew E, Ramos JE, Forouhar F, Neely H, Seetharaman J, Camilli A, et al.: **The structural basis of cyclic diguanylate signal transduction by PilZ domains.** *EMBO J* 2007, **26**:5153–5166.
 139. McCarthy Y, Ryan RP, O'Donovan K, He YQ, Jiang BL, Feng JX, Tang JL, Dow JM: **The role of PilZ domain proteins in the virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.** *Mol Plant Pathol* 2008, **9**:819–824.
 140. Kazmierczak BI, Hendrixson DR: **Spatial and numerical regulation of flagellar biosynthesis in polarly flagellated bacteria.** *Mol Microbiol* 2013, **88**:655–663.
 141. Navarro MVA, De N, Bae N, Wang Q, Sondermann H: **Structural Analysis of the GGDEF-EAL Domain-Containing c-di-GMP Receptor FimX.** *Structure* 2009, **17**:1104–1116.
 142. Zhulin IB, Taylor BL, Dixon R: **PAS domain S-boxes in Archaea, Bacteria and sensors for oxygen and redox.** *Trends Biochem Sci* 1997, **22**:331–333.
 143. Henry JT, Crosson S: **Ligand-Binding PAS Domains in a Genomic, Cellular, and Structural Context.** *Annu Rev Microbiol* 2011, **65**:261–286.
 144. Möglich A, Ayers RA, Moffat K: **Structure and signaling mechanism of Per-ARNT-Sim domains.** *Structure* 2009, **17**:1282–94.
 145. Jain R, Sliusarenko O, Kazmierczak BI: **Interaction of the cyclic-di-GMP binding protein FimX and the Type 4 pilus assembly ATPase promotes pilus assembly.** *PLoS Pathog* 2017, **13**:e1006594.
 146. Ni L, Yang S, Zhang R, Jin Z, Chen H, Conrad JC, Jin F: **Bacteria differently deploy type-IV pili on surfaces to adapt to nutrient availability.** *NPJ biofilms microbiomes* 2016, **2**:15029.
 147. Chin K-HH, Kuo W-TT, Yu Y-JJ, Liao Y-TT, Yang M-T Te, Chou S-HH: **Structural polymorphism of c-di-GMP bound to an EAL domain and in complex with a type II PilZ-domain protein.** *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2012, **68**:1380–1392.
 148. Qi Y, Xu L, Dong X, Yau YH, Ho CL, Koh SL, Shochat SG, Chou SHS-HS-HH, Tang K, Liang ZXZ-XZ-XX: **Functional divergence of FimX in PilZ Binding and type IV Pilus regulation.** *J Bacteriol* 2012, **194**:5922–5931.
 149. Wong CY, Eftink MR: **Biosynthetic incorporation of tryptophan analogues into staphylococcal**

- nuclease: effect of 5-hydroxytryptophan and 7-azatryptophan on structure and stability.** *Protein Sci* 1997, **6**:689–97.
150. Finn RD, Coghill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Mistry J, Mitchell AL, Potter SC, Punta M, Qureshi M, Sangrador-Vegas A, et al.: **The Pfam protein families database: Towards a more sustainable future.** *Nucleic Acids Res* 2016, **44**:D279–D285.
 151. Finn RD, Attwood TK, Babbitt PC, Bateman A, Bork P, Bridge AJ, Chang H-Y, Dosztányi Z, El-Gebali S, Fraser M, et al.: **InterPro in 2017-beyond protein family and domain annotations.** *Nucleic Acids Res* 2017, **45**:D190–D199.
 152. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJ: **The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis.** *Nat Protoc* 2015, **10**:845–858.
 153. Schägger H: **Tricine–SDS–PAGE.** *Nat Protoc* 2006, **1**:16–22.
 154. Farah CS, Reinach FC: **Regulatory Properties of Recombinant Tropomyosins Containing 5-Hydroxytryptophan: Ca²⁺-Binding to Troponin Results in a Conformational Change in a Region of Tropomyosin outside the Troponin Binding Site †.** *Biochemistry* 1999, **38**:10543–10551.
 155. Otwinowski Z, Minor W: **Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode.** *Methods Enzymol* 1997, **276**:307–326.
 156. Collaborative Computational Project, Number 4: **The CCP4 suite: programs for protein crystallography.** *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* 1994, **50**:760–763.
 157. McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ: **Phaser crystallographic software.** *J Appl Crystallogr* 2007, **40**:658–674.
 158. Adams PD, Grosse-Kunstleve RW, Hung LW, Ioerger TR, McCoy AJ, Moriarty NW, Read RJ, Sacchettini JC, Sauter NK, Terwilliger TC: **PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination.** *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2002, **58**:1948–54.
 159. Kabsch W: **XDS.** *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2010, **66**:125–32.
 160. Terwilliger TC, Adams PD, Read RJ, McCoy AJ, Moriarty NW, Grosse-Kunstleve RW, Afonine P V., Zwart PH, Hung L-W: **Decision-making in structure solution using Bayesian estimates of map quality: the PHENIX AutoSol wizard.** *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* 2009, **65**:582–601.
 161. Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K: **Features and development of Coot.** *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2010, **66**:486–501.
 162. Alegria MC, Docena C, Khater L, Ramos CHI, da Silva ACR, Farah CS: **New protein-protein interactions identified for the regulatory and structural components and substrates of the type III Secretion system of the phytopathogen Xanthomonas axonopodis Pathovar citri.** *J Bacteriol* 2004, **186**:6186–97.
 163. Alegria MC, Souza DP, Andrade MO, Docena C, Khater L, Ramos CHI, da Silva ACR, Farah CS: **Identification of new protein-protein interactions involving the products of the chromosome- and plasmid-encoded type IV secretion loci of the phytopathogen Xanthomonas axonopodis pv. citri.** *J Bacteriol* 2005, **187**:2315–2325.
 164. Wen J, Arakawa T, Philo JS: **Size-Exclusion Chromatography with On-Line Light-Scattering, Absorbance, and Refractive Index Detectors for Studying Proteins and Their Interactions.** *Anal Biochem* 1996, **240**:155–166.
 165. Delaglio F, Grzesiek S, Vuister G, Zhu G, Pfeifer J, Bax A: **NMRPipe: A multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes.** *J Biomol NMR* 1995, **6**:277–293.
 166. Skinner SP, Fogh RH, Boucher W, Ragan TJ, Mureddu LG, Vuister GW: **CcpNmr AnalysisAssign: a flexible platform for integrated NMR analysis.** *J Biomol NMR* 2016, **66**:111–124.
 167. Corrêa F, Farah CS: **Different Effects of Trifluoroethanol and Glycerol on the Stability of Tropomyosin Helices and the Head-to-Tail Complex.** *Biophys J* 2007, **92**:2463–2475.
 168. Carter SG, Karl DW: **Inorganic phosphate assay with malachite green: An improvement and evaluation.** *J Biochem Biophys Methods* 1982, **7**:7–13.
 169. Feng J, Chen Y, Pu J, Yang X, Zhang C, Zhu S, Zhao Y, Yuan Y, Yuan H, Liao F: **An improved malachite green assay of phosphate: Mechanism and application.** *Anal Biochem* 2011, **409**:144–

- 149.
170. Oliveira MC, Teixeira RD, Andrade MO, Pinheiro GMS, Ramos CHI, Farah CS: **Cooperative Substrate Binding by a Diguanylate Cyclase**. *J Mol Biol* 2015, **427**:415–432.
171. Gibson DG, Young L, Chuang R-Y, Venter JC, Hutchison CA, Smith HO: **Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases**. *Nat Methods* 2009, **6**:343–345.
172. Ke N, Landgraf D, Paulsson J, Berkmen M: **Visualization of periplasmic and cytoplasmic proteins with a self-labeling protein tag**. *J Bacteriol* 2016, **198**:1035–1043.
173. Hmelo LR, Borlee BR, Almblad H, Love ME, Randall TE, Tseng BS, Lin C, Irie Y, Storek KM, Yang JJ, et al.: **Precision-engineering the *Pseudomonas aeruginosa* genome with two-step allelic exchange**. *Nat Protoc* 2015, **10**:1820–1841.
174. Reytrat JM, Pelicic V, Gicquel B, Rappuoli R: **Counterselectable markers: untapped tools for bacterial genetics and pathogenesis**. *Infect Immun* 1998, **66**:4011–7.
175. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, et al.: **Fiji: an open-source platform for biological-image analysis**. *Nat Methods* 2012, **9**:676–682.
176. Ducret A, Quardokus EM, Brun Y V.: **MicrobeJ, a tool for high throughput bacterial cell detection and quantitative analysis**. *Nat Microbiol* 2016, **1**:16077.
177. Planet PJ, Kachlany SC, DeSalle R, Figurski DH: **Phylogeny of genes for secretion NTPases: identification of the widespread *tadA* subfamily and development of a diagnostic key for gene classification**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**:2503–2508.
178. Shiue S-JJ, Kao K-MM, Leu W-MM, Chen L-YY, Chan N-LL, Hu N-TT: **XpsE oligomerization triggered by ATP binding, not hydrolysis, leads to its association with XpsL**. *EMBO J* 2006, **25**:1426–1435.
179. Abendroth J, Murphy P, Sandkvist M, Bagdasarian M, Hol WGJ: **The X-ray structure of the type II secretion system complex formed by the N-terminal domain of EpsE and the cytoplasmic domain of EpsL of *Vibrio cholerae***. *J Mol Biol* 2005, **348**:845–855.
180. Lu C, Turley S, Marionni ST, Park Y-JJ, Lee KK, Patrick M, Shah R, Sandkvist M, Bush MF, Hol WGJ: **Hexamers of the Type II Secretion ATPase GspE from *Vibrio cholerae* with Increased ATPase Activity**. *Structure* 2013, **21**:1707–1717.
181. Lu C, Korotkov K V., Hol WGJ: **Crystal structure of the full-length ATPase GspE from the *Vibrio vulnificus* type II secretion system in complex with the cytoplasmic domain of GspL**. *J Struct Biol* 2014, **187**:223–235.
182. Vale RD: **AAA proteins. Lords of the ring**. *J Cell Biol* 2000, **150**:F13-9.
183. Wendler P, Ciniawsky S, Kock M, Kube S: **Structure and function of the AAA+ nucleotide binding pocket**. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2012, **1823**:2–14.
184. Salzer R, Herzberg M, Nies DH, Joos F, Rathmann B, Thielmann Y, Averhoff B: **Zinc and ATP binding of the hexameric AAA-ATPase PilF from *Thermus thermophilus*: role in complex stability, piliation, adhesion, twitching motility, and natural transformation**. *J Biol Chem* 2014, **289**:30343–30354.
185. Bos JL, Rehmann H, Wittinghofer A: **GEFs and GAPs: Critical Elements in the Control of Small G Proteins**. *Cell* 2007, **129**:865–877.
186. Erzberger JP, Berger JM: **EVOLUTIONARY RELATIONSHIPS AND STRUCTURAL MECHANISMS OF AAA+ PROTEINS**. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2006, **35**:93–114.
187. Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ: **Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold**. *EMBO J* 1982, **1**:945–51.
188. Mancl JMM, Black WPP, Robinson H, Yang Z, Schubot FDD: **Crystal Structure of a Type IV Pilus Assembly ATPase: Insights into the Molecular Mechanism of PilB from *Thermus thermophilus***. *Structure* 2016, **24**:1886–1897.
189. Rule CS, Patrick M, Camberg JL, Maricic N, Hol WG, Sandkvist M: **Zinc coordination is essential for the function and activity of the type II secretion ATPase EpsE**. *Microbiologyopen* 2016, **5**:870–882.

190. Chiang P, Sampaleanu LM, Ayers M, Pahuta M, Howell PL, Burrows LL: **Functional role of conserved residues in the characteristic secretion NTPase motifs of the *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilus motor proteins PilB, PilT and PilU.** *Microbiology* 2008, **154**:114–126.
191. Yamagata A, Tainer JA: **Hexameric structures of the archaeal secretion ATPase GspE and implications for a universal secretion mechanism.** *EMBO J* 2007, **26**:878–90.
192. Gietz J, Danieli R: **Yeast Two-Hybrid System Screening.** In *Yeast Protocols*. Humana Press; 2006:345–372.
193. Maple J, Møller SG: **Yeast Two-Hybrid Screening.** In *Circadian Rhythms. Methods in Molecular Biology™*. Humana Press; 2007:207–223.
194. Kanehisa M, Goto S: **KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes.** *Nucleic Acids Res* 2000, **28**:27–30.
195. Salah Ud-Din AIM, Roujeinikova A: **Methyl-accepting chemotaxis proteins: a core sensing element in prokaryotes and archaea.** *Cell Mol Life Sci* 2017, **74**:3293–3303.
196. Wang S: **Bacterial Two-Component Systems: Structures and Signaling Mechanisms.** In *Protein Phosphorylation in Human Health*. InTech; 2012.
197. Cheung J, Hendrickson WA: **Sensor domains of two-component regulatory systems.** *Curr Opin Microbiol* 2010, **13**:116–23.
198. Mitrophanov AY, Groisman EA: **Signal integration in bacterial two-component regulatory systems.** *Genes Dev* 2008, **22**:2601–11.
199. Krissinel E, Henrick KK: **Inference of macromolecular assemblies from crystalline state.** *J Mol Biol* 2007, **372**:774–797.
200. Holm L, Rosenstrom P: **Dali server: conservation mapping in 3D.** *Nucleic Acids Res* 2010, **38**:W545–9.
201. Dyson HJ, Wright PE: **Unfolded Proteins and Protein Folding Studied by NMR.** *Chem Rev* 2004, **104**:3607–3622.
202. Gil S, Hošek T, Solyom Z, Kümmerle R, Brutscher B, Pierattelli R, Felli IC: **NMR Spectroscopic Studies of Intrinsically Disordered Proteins at Near-Physiological Conditions.** *Angew Chemie Int Ed* 2013, **52**:11808–11812.
203. Camberg JL, Sandkvist M: **Molecular analysis of the *Vibrio cholerae* type II secretion ATPase EpsE.** *J Bacteriol* 2005, **187**:249–256.
204. Corrêa F, Farah CS: **Using 5-hydroxytryptophan as a probe to follow protein-protein interactions and protein folding transitions.** *Protein Pept Lett* 2005, **12**:241–4.
205. Wilkins MR, Gasteiger E, Bairoch A, Sanchez JC, Williams KL, Appel RD, Hochstrasser DF: **Protein identification and analysis tools in the ExPASy server.** *Methods Mol Biol* 1999, **112**:531–52.
206. Jakovljevic V, Leonardy S, Hoppert M, Søgaard-Andersen L: **PilB and PilT Are ATPases Acting Antagonistically in Type IV Pilus Function in *Myxococcus xanthus*.** *J Bacteriol* 2008, **190**:2411–21.
207. Camberg JL, Johnson TL, Patrick M, Abendroth J, Hol WGJ, Sandkvist M: **Synergistic stimulation of EpsE ATP hydrolysis by EpsL and acidic phospholipids.** *EMBO J* 2007, **26**:19–27.
208. Beatson SA, Whitchurch CB, Semmler ABT, Mattick JS: **Quorum sensing is not required for twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*.** *J Bacteriol* 2002, **184**:3598–3604.
209. Oldfield NJ, Bland SJ, Taraktsoglou M, Ramos FJ Dos, Robinson K, Wooldridge KG, Ala'Aldeen DAA: **T-cell stimulating protein A (TspA) of *Neisseria meningitidis* is required for optimal adhesion to human cells.** *Cell Microbiol* 2007, **9**:463–478.
210. Letarov A V., Kulikov EE: **Adsorption of Bacteriophages on Bacterial Cells.** *Biochem* 2017, **82**:1632–1658.
211. Kuo MY, Yang MK, Chen WP, Kuo TT: **High-frequency interconversion of turbid and clear plaque strains of bacteriophage f1 and associated host cell death.** *Can J Microbiol* 2000, **46**:841–7.
212. Jurczak-Kurek A, Gasior T, Nejman-Faleńczyk BB, Bloch S, Dydecka A, Topka G, Necel A,

- Jakubowska-Deredas M, Narajczyk M, Richert M, et al.: **Biodiversity of bacteriophages: Morphological and biological properties of a large group of phages isolated from urban sewage.** *Sci Rep* 2016, **6**:34338.
213. Maier B, Potter L, So M, Long CD, Seifert HS, Sheetz MP: **Single pilus motor forces exceed 100 pN.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**:16012–7.
 214. Collins RF, Frye SA, Balasingham S, Ford RC, Tønnum T, Derrick JP, Tønnum T, Derrick JP, Tønnum T, Derrick JP: **Interaction with type IV pili induces structural changes in the bacterial outer membrane secretin PilQ.** *J Biol Chem* 2005, **280**:18923–18930.
 215. Carter MQ, Chen J, Lory S: **The *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity island PAPI-1 is transferred via a novel type IV pilus.** *J Bacteriol* 2010, **192**:3249–58.
 216. Harding CM, Tracy EN, Carruthers MD, Rather PN, Actis LA, Munson RS: **Acinetobacter baumannii strain M2 produces type IV pili which play a role in natural transformation and twitching motility but not surface-associated motility.** *MBio* 2013, **4**:e00360-13.
 217. Kandel PP, Chen H, Fuente LD La, De La Fuente L: **A Short Protocol for Gene Knockout and Complementation in *Xylella fastidiosa* Shows that One of the Type IV Pilin Paralogs (PD1926) Is Needed for Twitching while Another (PD1924) Affects Pilus Number and Location.** *Appl Environ Microbiol* 2018, **84**:e01167-18.
 218. van Doorn J, Boonekamp PM, Oudega B: **Partial characterization of fimbriae of *Xanthomonas campestris* pv. *hyacinthi*.** *Mol plant-microbe Interact* 1994, **7**:334–344.
 219. Ackermann H-W: **Tailed Bacteriophages: The Order Caudovirales.** *Adv Virus Res* 1998, **51**:135–201.
 220. Hamdi S, Rousseau GM, Labrie SJ, Kourda RS, Tremblay DM, Moineau S, Slama KB: **Characterization of Five Podoviridae Phages Infecting *Citrobacter freundii*.** *Front Microbiol* 2016, **7**:1023.
 221. Siri MI, Sanabria A, Boucher C, Pianzola MJ: **New Type IV Pili-Related Genes Involved in Early Stages of *Ralstonia solanacearum* Potato Infection.** *Mol Plant-Microbe Interact* 2014, **27**:712–724.
 222. Hickman JW, Tifrea DF, Harwood CS: **A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels.** *Proc Natl Acad Sci* 2005, **102**:14422–14427.
 223. Berleman JE, Bauer CE: **Involvement of a Che-like signal transduction cascade in regulating cyst cell development in *Rhodospirillum centenum*.** *Mol Microbiol* 2005, **56**:1457–1466.
 224. Black WP, Yang Z: ***Myxococcus xanthus* Chemotaxis Homologs DifD and DifG Negatively Regulate Fibril Polysaccharide Production.** *J Bacteriol* 2004, **186**:1001–1008.
 225. Jansari VH, Potharla VY, Riddell GT, Bardy SL: **Twitching motility and cAMP levels: signal transduction through a single methyl-accepting chemotaxis protein.** *FEMS Microbiol Lett* 2016, **363**:1–9.
 226. Kilmury SLN, Burrows LL: **The *Pseudomonas aeruginosa* PilSR Two-Component System Regulates Both Twitching and Swimming Motilities.** *MBio* 2018, **9**.
 227. Bhaya D, Takahashi A, Grossman AR: **Light regulation of type IV pilus-dependent motility by chemosensor-like elements in *Synechocystis* PCC6803.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**:7540–5.
 228. Rosenberg T, Salam BB, Burdman S: **Association Between Loss of Type IV Pilus Synthesis Ability and Phenotypic Variation in the Cucurbit Pathogenic Bacterium *Acidovorax citrulli*.** *Mol Plant-Microbe Interact* 2018, **31**:548–559.
 229. Bischof LF, Friedrich C, Harms A, Søgaard-Andersen L, van der Does C: **The Type IV pilus assembly ATPase PilB of *myxococcus xanthus* interacts with the inner membrane platform protein pilc and the nucleotide-binding protein PilM.** *J Biol Chem* 2016, **291**:6946–6957.
 230. Ross P, Weinhouse H, Aloni Y, Michaeli D, Weinberger-Ohana P, Mayer R, Braun S, de Vroom E, van der Marel GA, van Boom JH, et al.: **Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid.** *Nature* 1987, **325**:279–281.
 231. Trampari E, Stevenson CEM, Little RH, Wilhelm T, Lawson DM, Malone JG: **Bacterial rotary export ATPases are allosterically regulated by the nucleotide second messenger cyclic-di-GMP.** *J Biol*

Chem 2015, **290**:24470–83.

- 232. Karuppiah V, Derrick JP: **Structure of the PilM-PilN inner membrane type IV pilus biogenesis complex from *Thermus thermophilus*.** *J Biol Chem* 2011, **286**:24434–24442.
- 233. Bulyha I, Schmidt C, Lenz P, Jakovljevic V, Höne A, Maier B, Hoppert M, Søgaaard-Andersen L: **Regulation of the type IV pili molecular machine by dynamic localization of two motor proteins.** *Mol Microbiol* 2009, **74**:691–706.
- 234. Schuergers N, Nü DJ, Wallner T, Mullineaux CW, Wilde A, Nürnberg DJ, Wallner T, Mullineaux CW, Wilde A, Nü DJ, et al.: **PilB localization correlates with the direction of twitching motility in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803.** *Microbiology* 2015, **161**:960–966.

8 Apêndices

8.1 Vídeo da motilidade twitching em diferentes cepas de *X. citri*.

Visualização por *time-lapse* da motilidade twitching em *X. citri* selvagem (*Xac_Wt*) (**Vídeo 1 e 2**) e na mutante de *X. citri* nocaute de *fimX*_{XAC2398} (*Xac_ΔfimX*) (**Vídeo 3**) e nas cepas de *X. citri* expressando as quimeras msfGFP-FimX (**Vídeo 4**), msfGFP-PilZ (**Vídeo 5**) e msfGFP-PilB (**Vídeo 6**). As imagens foram adquiridas usando um microscópio de contraste de fase Leica DMI8 com uma magnificação de 40x. Cada imagem no vídeo foi adquirida cada 10 min por 16 horas a 30 °C. O QR code e os links da **Tabela 22** permite o acesso aos vídeos.

X. citri selvagem (*Xac_Wt*)

Vídeo 1

Vídeo 2

X. citri nocaute em *fimX* (*Xac_ΔfimX*)

Vídeo 3

***X. citri* selvagem expressando a quimera msfGFP-FimX**

Vídeo 4

***X. citri* selvagem expressando a quimera msfGFP-PilZ**

Vídeo 5

***X. citri* selvagem expressando a quimera msfGFP-PilB**

Vídeo 6

8.2 Vídeos da localização subcelular de FimX, PilZ e PilB em células de *X. citri* durante a motilidade twitching

Visualização da localização de proteínas FimX (**Vídeo 7 – 10**), PilZ (**Vídeos 11 e 12**) e PilB (**Vídeos 13 – 15**) marcadas com msfGFP no seu extremo N-terminal durante a motilidade twitching por *time-lapse* em células de *X. citri* selvagem. As imagens foram adquiridas usando um microscópio fluorescência Leica DMI8 com uma magnificação de 100x. Cada imagem no vídeo foi adquirida cada 20 min por 16 horas a 30 °C. O QR code e os links da **Tabela 22** permite o acesso aos vídeos.

*Xac*_msfGFP-FimX_WT

Vídeo 7

Vídeo 8

Vídeo 9

Vídeo 10

*Xac*_msfGFP-PilZ_WT

Vídeo 11

Vídeo 12

*Xac*_msfGFP-PilB_WT

Vídeo 13

Vídeo 14

Vídeo 15

8.3 Vídeos mostrando a dinâmica na localização de FimX, PilZ e PilB

Visualização de células de *X. citri* selvagens levando as quimeras msfGFP-FimX (Vídeo 16 e 17), msfGFP-PilZ (Vídeo 18 e 19) e msfGFP-PilB (Vídeo 20 e 21), onde se mostra que os foci das proteínas apresentam uma alta dinâmica durante a motilidade twitching, observando-se o seu aparecendo e desaparecendo no polo da célula. As imagens foram adquiridas usando um microscópio fluorescência Leica DMI8 com uma magnificação de 100x. Cada imagem no vídeo foi adquirida cada 15 min por 6 horas a 30 °C. A barra de escala é 3 μ M. O QR code e os links da **Tabela 22** permite o acesso aos vídeos.

*Xac*_msfGFP-FimX_WT

Vídeo 16

Vídeo 17

*Xac*_msfGFP-PilZ_WT

Vídeo 18

Vídeo 19

*Xac*_msfGFP-PilB_WT

Vídeo 20

Vídeo 21

Tabela 22. Links de acesso para os vídeos de *time lapse*

	Links
Video 1	https://drive.google.com/file/d/12PfmSueRKImMG7leglxYmPSlbt_M-m3K/view?usp=sharing
Video 2	https://drive.google.com/file/d/1wSETKg4kaxfWtw9FUno9YWZaJldc1H3/view?usp=sharing
Video 3	https://drive.google.com/file/d/1Eld6amsO1FT57gLve-SpCU1XyMDeTB7y/view?usp=sharing
Video 4	https://drive.google.com/file/d/1uINy-ZRGbJzka2RT3YG8YrBzMXxEq6i2/view?usp=sharing
Video 5	https://drive.google.com/file/d/1oa529yIHbh2qv6mbp9mnb9VL5yT-CuBK/view?usp=sharing
Video 6	https://drive.google.com/file/d/13T7-TMbUU1CHnQAvucys3q1xy1H0aiLy/view?usp=sharing
Video 7	https://drive.google.com/file/d/1lgEEDhTK-MFdM6Ukkth_-SPWQI9JO6I6/view?usp=sharing
Video 8	https://drive.google.com/file/d/1yvNnprHKLz2ye7w7kxxecmZvy9bKeewb/view?usp=sharing
Video 9	https://drive.google.com/file/d/1IK75bL8B0qcmv-u7ZEBN7RxBPYXqwbLp/view?usp=sharing
Video 10	https://drive.google.com/file/d/1wL7EBnGbDBld3VQru5eU8IVb7Sic5W1K/view?usp=sharing
Video 11	https://drive.google.com/file/d/1Mse8Vnr44adP2mxJOtGvrbzqIFgMuat4/view?usp=sharing
Video 12	https://drive.google.com/file/d/1qgPxOZArk5mJ7PCTwCM9D3Lq9tJB5fp/view?usp=sharing
Video 13	https://drive.google.com/file/d/1XjpLo4W044c3vbBEL0gpvJTjwMdx_ph/view?usp=sharing
Video 14	https://drive.google.com/file/d/16NBn3wYDxwUHgmMeQR0gxhezzMGqPkqV/view?usp=sharing
Video 15	https://drive.google.com/file/d/1Pg62OcAEJBdTLwmlxpgu_yspWOiGEc1X/view?usp=sharing
Video 16	https://drive.google.com/file/d/1OoropfsU_6xhc6_PX5jPBCVGV4WMSdd/view?usp=sharing
Video 17	https://drive.google.com/file/d/1q_Aq4utjDEzNEbltusFoJMrprEr9E5Xs/view?usp=sharing
Video 18	https://drive.google.com/file/d/1l6zXErLVv96sEcNfmKsjkKJirtG6j6L1/view?usp=sharing
Video 19	https://drive.google.com/file/d/15Nt7dti_boW_lah8_PAGujvrQmeCdijl/view?usp=sharing
Video 20	https://drive.google.com/file/d/1jOqL4Rrh2yMCcj6APbNaqEI95tRIO1weV/view?usp=sharing
Video 21	https://drive.google.com/file/d/1lehl4FWv07btr0nQo2iX_OX54GzFYcpM/view?usp=sharing

9 Anexo

Anexo A — Súmula Curricular

Edgar Enrique Llontop Cornejo

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome Edgar Enrique Llontop Cornejo

Nascimento 12/09/1988

Nacionalidade Peruana

Endereço Profissional Av. Professor Lineu Prestes, 748. Bloco 0 Inferior Sala 12, Butantã, São Paulo, SP – Brasil, CEP: 05508000 -

Formação acadêmica/titulação

2013 Doutorado em Ciências Biológicas (Bioquímica)
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil.
Título: Estudo funcional e estrutural dos reguladores da biossíntese do Pilus Tipo IV de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.
Orientador: Shaker Chuck Farah.
Coorientador: Cristiane Rodrigues Guzzo.
Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

2005 – 2011 Graduação em Biologia.
Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, UNPRG, Lambayeque, Peru.
Título: Optimización del medio de cultivo, temperatura, pH, concentración del inductor y tiempo para la expresión genética de la proteína verde fluorescente (GFP) en *Escherichia coli* BL21 (DE3).
Orientador: Pedro Jorge Chimoy Effio.

Formação Complementar

2017 - 2017 Introduction to cryo-electron microscopy. (Carga horária: 8h).
Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology, SBBQ, Brasil.

2012 - 2012 Structure and function of membrane proteins: a practical course. (Carga horária: 80h).
Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, CNPEM, Brasil.

Atuação profissional

Instituto de Química – USP, Brasil

Vínculo institucional

2013 – Atual Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Pesquisador, Regime: Dedicação exclusiva.

Produção bibliográfica

1. DUNGER, GERMAN; LLONTOP, EDGAR; GUZZO, CRISTIANE R; FARAH, CHUCK S. **The Xanthomonas type IV pilus**. CURRENT OPINION IN MICROBIOLOGY, v. 30, p. 88-97, 2016.

Produção técnica

Demais produções técnicas

1. LLONTOP, E. E
IX Curso de Inverno Temas Avançados de Bioquímica e Biologia Molecular. 2014. (Curso de curta duração ministrado/Outra).

Apresentações de trabalho

1. FAVARO, D. C.; MITTERMAIER, A. K.; ANTUNES, V.; LLONTOP, E. E.; OLIVEIRA, R. Importance of the $\beta 5$ - $\beta 6$ loop for the Structure, Catalytic efficiency, and Stability of the CHDLsOXA-143 and its variants OXA-231 and OXA-143 (P227S). 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
2. LLONTOP, E. E.; CENENS, W. ; FAVARO, D. C. ; SALINAS, R. K. ; GUZZO, CRISTIANE R ; FARAH, CHUCK S . Regulators of Xanthomonas Type IV Pilus Biogenesis: The FimX-PilZ-PilB Complex. 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
3. LLONTOP, E. E.; FAVARO, D. C.; SALINAS, R. K.; GUZZO, CRISTIANE R; FARAH, CHUCK S. Regulators of Bacterial Type IV Pilus Biogenesis: Crystal Structure of the PilZ-PilBNt Complex and its Interactions with FimX. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
4. LLONTOP, E. E.; FAVARO, D. C.; SALINAS, R. K.; GUZZO, CRISTIANE R; FARAH, CHUCK S. Structure of the PilZ-PilBNt Complex and its interactions with FimX - Regulators of Bacterial Type IV Pilus Biogenesis. 2016. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
5. VASCONCELOS, F. N. C. ; LLONTOP, E. E. ; FAVARO, D. C. ; FARAH, CHUCK S ; GUZZO, CRISTIANE R . Type four pilus biogenesis interactions network - The same as type two-secretion system? 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Eventos

1. 2a Reunião de Usuários de Criomicroscopia eletrônica. Regulators of Bacterial Type IV Pilus Biogenesis: Crystal Structure of the PilZ-PilBNt Complex and its Interactions with FimX. 2018. (Outra).
2. 2nd São Paulo XanthoMeeting Science. Regulators of Bacterial Type IV Pilus Biogenesis: Crystal Structure of the PilZ-PilBNt Complex. 2018. (Congresso).
3. 47th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology. Regulators of Xanthomonas Type IV Pilus Biogenesis: The FimX-PilZ-PilB Complex. 2018. (Congresso).
4. 46th Annual Meeting of Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology. Regulators of Bacterial Type IV Pilus Biogenesis: Crystal Structure of the PilZ-PilBNt Complex and its Interaction with FimX. 2017. (Congresso).
5. I Workshop in Microbial Molecular Biology. Regulators of Bacterial Type IV Pilus Biogenesis: Crystal Structure of the PilZ-PilBNt Complex and its Interactions with FimX. 2017. (Congresso).

6. V Latin American Protein Society Meeting - LAPSM. Structure of the PilZ-PilBNt Complex and its interactions with the FimX Regulator of bacterial Type IV Pilus Biogenesis. 2016. (Congresso).
7. XI Congresso do Departamento de Bioquímica do IQ-USP. Structure of the PilZ-PilBNt Complex and its interactions with FimX – Regulators of Bacterial Type IV Pilus Biogenesis. 2016. (Congresso).