**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

MAYCON CAMPOS OLIVEIRA

**Caracterização Bioquímica e Funcional
de Diguamilato Ciclases de *Xanthomonas*
citri subsp. *citri*.**

**Versão corrigida da Tese defendida conforme Resolução CoPGr 5890
O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

03/03/2015

MAYCON CAMPOS OLIVEIRA

**Caracterização Bioquímica e Funcional
de Diguanilato Ciclases 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

São Paulo

2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Oliveira, Maycon Campos
O48cr Caracterização bioquímica e funcional de diguanilato ciclases
de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. / Maycon Campos Oliveira. --
São Paulo, 2015.
267p.

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

1. Bioquímica molecular 2. Enzima : Bioquímica I. T. II. Farah,
Shaker Chuck, orientador.

574.88 CDD

MAYCON CAMPOS OLIVEIRA

Caracterização Bioquímica e Funcional de Diguamilato Ciclases 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)*

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof(a).Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof(a).Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof(a).Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof(a).Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof(a).Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

*Aos meus pais, Maria de Lourdes e José Antônio,
Dedico*

AGRADECIMENTOS

À Deus por me dar força e perseverança durante toda a minha vida acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro durante a realização deste trabalho.

À Universidade de São Paulo pelo acolhimento, ao Departamento de Bioquímica e ao programa de pós-graduação em Bioquímica do IQ/USP pela oportunidade de realizar o curso de doutorado.

Ao professor Shaker Chuck Farah pela orientação, apoio, compreensão e amizade.

Aos professores do IQ/USP pelos ensinamentos e a todos os funcionários do Instituto de Química pela ajuda e suporte nas atividades de ensino e pesquisa.

À Luci Deise Navarro pela agilidade e eficiência na prestação de serviço de sequenciamento de DNA.

A toda equipe da Central Analítica do IQ/USP, e em especial à Vânia e ao Emerson pelo suporte na obtenção dos resultados de espalhamento de luz e espectrometria de massas.

À Glaucia Melina Squizato Pinheiro e ao professor Carlos Henrique Inácio Ramos do IQ/UNICAMP por toda a ajuda na realização dos ensaios de SEC-MALS.

Aos meus pais pela orientação de vida, amor, dedicação, constante apoio e incentivo.

Ao meu irmão, Diogo, e a todos os meus familiares pelo carinho e pelas vibrações positivas.

À minha esposa, Swiany, que tanto admiro, pelo companheirismo, paciência, ensinamentos, amor e apoio incondicional.

Aos amigos de longa data Daniel, Sávio, Marcos, Guilherme e Rodrigo, que mesmo de longe sempre tiveram participação fundamental na minha vida pessoal e profissional.

Aos amigos de laboratório, com quem tive o grande prazer de conviver durante a realização deste trabalho: Camila, Clarissa, Cláudia, Cristiane, Cristina, Denize, Diorge, Edgar, Fernanda, Gabriel, German Dunger, Germán Sgro, Guilherme, Ilda, Layara, Lígia, Lucas, Luciana, Maxuel, Nikolas, Paola, Phelipe, Pricila, Raphael, Roberto e Ronaldo.

A todos os amigos e colegas do bloco zero do IQ/USP, em especial ao professor Frederico José Gueiros Filho e sua equipe pela ajuda, bom convívio e disponibilidade no empréstimo de reagentes e equipamentos.

Aos amigos da Embrapa Milho e Sorgo pelo acolhimento, compreensão e apoio durante a conclusão deste trabalho.

Enfim, a todos os amigos que fiz em São Paulo e a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

***“It is not the strongest of the species that survives,
nor the most intelligent that survives. It is the one
that is the most adaptable to change.”***

- Leon C. Megginson
(interpretation of Charles Darwin's ideas)

RESUMO

Oliveira, M.C. **Caracterização bioquímica e funcional de diguanilato ciclases de *Xanthomonas citri* subsp. *citri***. 2015. 267p. Tese - Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O diguanilato cíclico (c-di-GMP) é uma molécula de sinalização intracelular que atua na regulação de importantes processos bacterianos como motilidade, formação de biofilme e virulência. As diguanilato ciclases (DGCs), contendo um domínio GGDEF ativo, catalisam a formação de c-di-GMP a partir de duas moléculas de GTP. A bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xanthomonas axonopodis* pv *citri*; *Xac*) é o agente causal do cancro cítrico, uma doença que ataca todas as variedades e espécies de citros. O genoma de *Xac* codifica 31 proteínas contendo domínios GGDEF. Treze destas proteínas possuem também domínios PAS e/ou GAF, que são ubíquos domínios sensores e de sinalização. Para tentar entender melhor o papel na sinalização por c-di-GMP das interações entre domínios GGDEF e domínios PAS e/ou GAF, estudos bioquímicos e funcionais foram realizados com as proteínas XAC0610 e XAC2446. XAC0610 contém um domínio GAF, quatro domínios PAS e um domínio GGDEF conservado. Análises fenotípicas com a linhagem nocaute *Xac*Δ0610 mostraram que XAC0610 atua na regulação da motilidade e sobrevivência de *Xac* ao tratamento com H₂O₂. Ensaio de atividade enzimática demonstraram que XAC0610 é uma DGC cataliticamente ativa, e que a mutação sítio-dirigida de um resíduo conservado de lisina (Lys759) provoca uma grande redução na atividade de DGC. Os domínios GAF e PAS de XAC0610 aparentemente não atuam como domínios sensores, entretanto são importantes para a dimerização da proteína, necessária para a obtenção de altos níveis de atividade de DGC. Além disso, várias observações sugerem que XAC0610 não é submetida à inibição alostérica pelo produto, um mecanismo regulatório comumente

utilizado para o controle da atividade de DGC. Por outro lado, os dados de cinética enzimática de XAC0610_{HIS-35-880} revelaram um efeito de cooperatividade positiva para a ligação dos substratos, com uma constante de dissociação para a ligação da primeira molécula de GTP (K_1) cerca de 3-5 vezes maior que a constante de dissociação para a ligação da segunda molécula de GTP (K_2). A partir deste estudo, nós apresentamos um esquema cinético geral mais apropriado para as análises dos dados cinéticos de enzimas DGCs e propomos que a ligação cooperativa do substrato talvez possa desempenhar um importante papel na regulação *in vivo* da atividade de algumas DGCs, aumentando sua sensibilidade a pequenas variações nos níveis celulares de GTP. Outra proteína caracterizada neste trabalho, XAC2446 possui um domínio GAF e um domínio GGDEF que, ao contrário do domínio GGDEF de XAC0610, não deve apresentar atividade de DGC. Mesmo assim, análises funcionais mostraram que XAC2446 regula negativamente a formação de biofilme e positivamente a motilidade de *Xac*. Ensaios de duplo híbrido em leveduras identificaram que XAC2446 interage com XAC2897, contendo um domínio GGDEF potencialmente ativo, e XAC1185, contendo um domínio HD fosfohidrolase de (p)ppGpp. Alguns estudos indicam que altos níveis celulares de c-di-GMP e baixos níveis de (p)ppGpp podem ser necessários durante a formação de biofilme. XAC2446 talvez possa atuar como um inibidor da atividade enzimática de XAC2897 e XAC1185 e influenciar, indiretamente e antagonicamente, tanto os níveis celulares de c-di-GMP quanto de (p)ppGpp.

Palavras-chave: c-di-GMP, cinética enzimática, GGDEF, cooperatividade, *Xanthomonas citri*.

ABSTRACT

Oliveira, M.C. **Biochemical and functional characterization of diguanilate cyclases from *Xanthomonas citri* subsp. *citri***. 2015. 267p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Cyclic di-GMP is a bacterial second messenger that regulates a range of functions, including cellular motility, biofilm formation and virulence. This molecule is produced from two GTP substrates by the activity of diguanylate cyclases (DGCs) containing a GGDEF domain. The phytopathogenic bacteria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xanthomonas axonopodis* pv *citri*; *Xac*) causes citrus canker in a wide variety of citrus species. The *Xac* genome codes for 31 proteins with GGDEF domains. Thirteen of the 31 *Xac* GGDEF domain-containing proteins also possess PAS (Per-Arnt-Sim) or GAF (cGMP-specific phosphodiesterases, adenylyl cyclases and FhlA) domains that are ubiquitous signaling and sensory domains. In order to better understand the relationship between these commonly associated domains, biochemical and functional studies were carried out with the XAC0610 and XAC2446 proteins. XAC0610 is a large multi-domain protein containing one GAF domain, four PAS domains and one GGDEF domain. This protein has a demonstrable *in vivo* and *in vitro* diguanylate cyclase (DGC) activity. Analysis of a *Xac*Δ0610 knockout strain revealed that XAC0610 plays a role in the regulation of *Xac* motility and resistance to H₂O₂. Site-directed mutagenesis of a conserved DGC lysine residue (Lys759 in XAC0610) resulted in a severe reduction in XAC0610 DGC activity. XAC0610 DGC activity was also impaired by removal of the N-terminal GAF and PAS domains, which are probably needed for proper protein dimerization. Furthermore, experimental and *in silico* analysis suggest that XAC0610 is not subject to allosteric product inhibition, a common regulatory mechanism for DGC

activity control. Instead, steady-state kinetics of XAC0610 DGC activity revealed a positive cooperative effect of the GTP substrate with a dissociation constant for the binding of the first GTP molecule (K_1) approximately three to five times greater than the dissociation constant for the binding of the second GTP molecule (K_2). We present a general kinetics scheme that should be used when analyzing DGC kinetics data and propose that cooperative GTP binding could be a common, though up to now overlooked, feature of these enzymes that may in some cases offer a physiologically relevant mechanism for regulation of DGC activity *in vivo*. The other characterized protein, XAC2446, has a GAF domain and a degenerated GGDEF domain. Unlike XAC0610, XAC2446 should not present DGC activity. Nevertheless, functional analysis of XAC2446 demonstrated that it plays a role in the regulation of *Xac* motility and biofilm formation. A yeast two-hybrid screen identifies XAC2897 (a potentially active GGDEF domain-containing protein) and XAC1185 (a (p)ppGpp hydrolase) as specific binding partners of the XAC2446 protein. As indicated by studies in other bacteria, high cellular levels of c-di-GMP and low levels of (p)ppGpp may be both required for biofilm formation. It is possible that XAC2446 might have a role in the antagonistic regulation of c-di-GMP and (p)ppGpp cellular levels by acting as an inhibitor of both XAC2897 and XAC1185 enzymatic activities.

Keywords: c-di-GMP, enzyme kinetics, GGDEF, cooperativity, *Xanthomonas citri*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3-AT – 3-amino-1,2,4-triazol

aa – aminoácido

Ap^R – resistência à ampicilina

Cam^R – resistência à cloranfenicol

c-di-GMP – diguanosina monofostafato cíclico

CMC – carboximetilcelulose

CR – vermelho congo (*congo red*)

CV – volumes de coluna (*column volume*)

DBD – domínio de ligação a DNA (*DNA-binding domain*)

DGC – diguanilato ciclase

DLS – espalhamento de luz dinâmico (*dynamic light scattering*)

DMSO – dimetilsulfóxido

DO – densidade óptica

DNA – ácido desoxirribonucleico

DTT – ditionitrito

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

ExPASy – *Expert Protein Analysis*

F_i – fração de proteínas insolúveis

F_s – fração de proteínas solúveis

Gm^R – resistência à gentamicina

GTP – guanosina trifosfato

HPLC-ESI-MS – cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com ionização por electrospray (*high-Performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry*)

IPTG – isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo

kb – quilobases

kDa – quilodalton

K_d – constante de dissociação

KEGG – *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

Kan^R – resistência à kanamicina

ORF – fase de leitura aberta (*open reading frame*)

pb – pares de base

pBAD – promotor induzível por L-arabinose

PCR – reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)

PDB – banco de dados de proteínas (*protein data bank*)

PDE – fosfodiesterase

PEG – polietilenoglicol

P_i – fosfato inorgânico

PP_i – pirofosfato

rpm – rotações por minuto

SDS – dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (*sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis*)

SEC – Cromatografia de exclusão molecular (*size exclusion chromatography*)

SEC-MALS – cromatografia de exclusão molecular acoplada ao espalhamento de luz em multiângulos (*multi-angle laser light-scattering coupled with size exclusion chromatography*)

SLS – espalhamento de luz estático (*static light scattering*)

Spc^R – resistência à spectinomicina

SST2 – sistema de secreção tipo II

SST3 – sistema de secreção tipo III

Str^R – resistência à streptomicina

Tet^R – resistência à tetraciclina

TRP1 – marca de seleção auxotrófica para triptofano

U – unidade

UFC – unidades formadoras de colônias

Xac – *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (sinônimo: *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*)

Xcc – *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Xcv – *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

Xoo – *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

X-Gal – 5-bromo-4- cloro-3-indoil-β-galactosídeo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. A BACTÉRIA <i>XANTHOMONAS CITRI</i> SUBSP. <i>CITRI</i> É O AGENTE CAUSAL DO CANCRO CÍTRICO.....	17
1.2. FATORES DE VIRULÊNCIA E REGULAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE <i>XANTHOMONAS</i>	20
1.3. SINALIZAÇÃO POR C-DI-GMP EM BACTÉRIAS.....	26
1.3.1. Enzimas envolvidas no metabolismo de c-di-GMP.....	26
1.3.2. Distribuição dos domínios GGDEF, EAL e HD-GYP nos genomas bacterianos	31
1.3.3. Mecanismos efetores e fisiologia da sinalização por c-di-GMP.....	34
1.3.4. Cinética e regulação enzimática de diguanilato ciclases.....	38
1.4. ESTRUTURA E FUNÇÃO DE DOMÍNIOS GAF E PAS	45
2. OBJETIVOS	54
3. MATERIAIS E MÉTODOS	55
3.1. LINHAGENS BACTERIANAS E CONDIÇÕES GERAIS DE CULTIVO	55
3.2. DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS E AMPLIFICAÇÃO DE GENES POR PCR.....	60
3.3. CLONAGEM E MUTAÇÃO SÍTIO DIRIGIDA DE XAC0610	61
3.3.1. Clonagem de xac0610 com promotor nativo	61
3.3.2. Mutação sítio dirigida.....	62
3.4. SEQUENCIAMENTO DE DNA	66
3.5. ANÁLISE DE SEQUÊNCIA E MODELAGEM DE PROTEÍNAS.....	66
3.6. EXPRESSÃO HETERÓLOGA E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	67
3.6.1. Clonagem de genes em vetores de expressão de proteínas.....	67
3.6.2. Expressão de proteínas recombinantes em <i>E. coli</i>	68
3.6.3. Purificação de proteínas recombinantes	69
3.6.4. Testes de cristalização de proteínas.....	72
3.7. AVALIAÇÃO INDIRETA DA ATIVIDADE DE DGC DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EM <i>E. COLI</i> BL21 (DE3).....	73
3.8. ANÁLISE DO ESTADO OLIGOMÉRICO DE XAC0610 _{HIS-35-880}	73
3.8.1. Gel filtração analítica	73
3.8.2. Experimentos de fluorescência de proteína.....	74
3.8.3. Native-PAGE.....	74
3.8.4. Cross-linking com glutaraldeído.....	74
3.8.5. Espalhamento de luz: DLS e SLS	75
3.8.6. SEC-MALS (Multi-angle laser light-scattering coupled with size exclusion chromatography) ..	79
3.9. CINÉTICA ENZIMÁTICA	79

3.9.1. Detecção espectrofotométrica da atividade de DGC de proteínas recombinantes.....	79
3.9.2. Avaliação do efeito da temperatura, pH e íons metálicos na atividade de XAC0610 _{HIS-35-880} ...	81
3.9.3. Separação cromatográfica de nucleotídeos.....	82
3.9.4. Identificação de c-di-GMP por espectrometria de massa	83
3.9.5. Modelo cinético e análise de dados.....	84
3.10. ESPECTROSCOPIA DE DICROÍSMO CIRCULAR.....	85
3.11. CONSTRUÇÃO DE MUTANTES NOUCATES <i>IN FRAME</i> DE XAC.....	85
3.11.1. Produção das linhagens nocaute XacΔ0610 e XacΔ2446	85
3.11.2. Complementação da linhagem nocaute XacΔ0610.....	87
3.11.3. Complementação da linhagem nocaute XacΔ2446.....	90
3.12. ENSAIOS FUNCIONAIS COM OS MUTANTES NOCAUTES DE XAC.....	91
3.12.1. Ensaios de motilidade em meio semi-sólido.....	91
3.12.2. Ensaios de virulência na planta hospedeira.....	91
3.12.3. Sobrevivência bacteriana na presença de peróxido de hidrogênio.....	92
3.12.4. Ensaios de produção de enzimas extracelulares por Xac.....	92
3.12.5. Ensaios de formação de biofilme por Xac.....	93
3.13. ENSAIOS DE DUPLO-HÍBRIDO EM LEVEDURAS	94
3.13.1. Clonagem dos genes xac0610 e xac2446 no vetor pOBD.....	94
3.13.2. Transformação da linhagem PJ69-4a com a isca de interesse	95
3.13.3. Teste de auto-ativação das células de levedura contendo a isca	96
3.13.4. Transformação com a biblioteca genômica de Xac e confirmação dos clones positivos	97
3.13.5. Extração do DNA plasmidial de levedura.....	99
3.13.6. Transformação de <i>E. coli</i> KC8 e sequenciamento dos clones.....	100
3.13.7. Cotransformação da linhagem PJ69-4a com os vetores pOAD e pOBD para confirmar as interações	101

4. RESULTADOS..... 102

4.1. PREDIÇÃO DA ATIVIDADE DE DIGUANILATO CICLASE DAS PROTEÍNAS DE XAC.....	102
4.2. EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E TENTATIVAS DE CRISTALIZAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	105
4.2.1. Expressão de proteínas recombinantes em <i>E. coli</i>	105
4.2.2. Purificação de proteínas recombinantes e tentativas de cristalização.....	109
4.3. CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE XAC0610.....	114
4.3.1. Atividade enzimática <i>in vivo</i>	114
4.3.2. Mutação sítio dirigida de XAC0610	116
4.3.3. Detecção da atividade enzimática <i>in vitro</i> por cromatografia de troca iônica	119

4.3.4. Detecção espectrofotométrica da atividade enzimática <i>in vitro</i>	122
4.3.5. Efeito da concentração enzimática, pH e íons metálicos na atividade de XAC0610 _{HIS-35-880} ..	126
4.3.6. Estudos de inibição pelo produto.....	134
4.4. ESTUDOS DO ESTADO OLIGOMÉRICO DE XAC0610 EM SOLUÇÃO	137
4.4.1. Gel filtração analítica	137
4.4.2. Experimentos de ligação cruzada com glutaraldeído.....	140
4.4.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante.....	142
4.4.4. Análises por espalhamento de luz dinâmico e estático.....	145
4.4.5. Análises por SEC-MALS.....	147
4.4.6. Análises por fluorescência.....	149
4.5. CINÉTICA ENZIMÁTICA DE XAC0610	149
4.6. CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE XAC0610	158
4.6.1. Produção da linhagem nocaute <i>Xac</i> Δ0610.....	158
4.6.2. Ensaios fenotípicos com a linhagem nocaute <i>Xac</i> Δ0610.....	160
4.6.3. Complementação da linhagem nocaute <i>Xac</i> Δ0610.....	165
4.6.4. Ensaios de duplo-híbrido utilizando XAC0610 como isca	168
4.7. ESTUDOS FUNCIONAIS E BIOQUÍMICOS COM XAC2446.....	175
4.7.1. Produção da linhagem nocaute <i>Xac</i> Δ2446.....	175
4.7.2. Ensaios fenotípicos com a linhagem nocaute <i>Xac</i> Δ2446.....	176
4.7.3. Complementação da linhagem nocaute <i>Xac</i> Δ2446.....	179
4.7.4. Ensaios de duplo-híbrido utilizando XAC2446 como isca	180
4.7.5. Estudos da interação <i>in vitro</i> entre XAC2446 e XAC1185	184
5. DISCUSSÃO.....	190
5.1. ESTUDOS FUNCIONAIS DE XAC0610	190
5.1.1. Estrutura e organização do gene <i>xac0610</i>	190
5.1.2. XAC0610 exerce controle na motilidade de <i>Xac</i> independentemente de sua atividade de DGC	193
5.1.3. A atividade de DGC de XAC0610 confere proteção a <i>Xac</i> contra o estresse oxidativo provocado por H ₂ O ₂	195
5.2. A CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE XAC0610 ORIGINA UMA NOVA VISÃO PARA A ANÁLISE CINÉTICA DE DGCS	197
5.2.1. A atividade específica de DGC de XAC0610 depende da concentração de proteína e de seus domínios GAF e PAS (A-D).....	197

5.2.2. A cinética enzimática de XAC0610 sugere um mecanismo de ligação cooperativa dos substratos ao sítio ativo.....	201
5.3. ESTUDOS FUNCIONAIS E BIOQUÍMICOS COM XAC2446 REVELAM EVIDÊNCIAS DE COMUNICAÇÃO ENTRE AS VIAS DE SINALIZAÇÃO POR C-DI-GMP E (P)PPGPP EM XAC	210
5.3.1. Estrutura e organização do gene <i>xac2446</i>	210
5.3.2. XAC2446 exerce controle positivo sobre a motilidade bacteriana e controle negativo sobre a formação de biofilme.....	214
6. CONCLUSÕES	229
7. REFERÊNCIAS.....	234
APÊNDICE	265
DEDUÇÃO DAS EQUAÇÕES DE VELOCIDADE PARA A REAÇÃO CATALISADA POR DGCs.....	265
LISTA DE ANEXOS.....	267

1. INTRODUÇÃO

1.1. A bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* é o agente causal do cancro cítrico

O agente etiológico do cancro cítrico é uma bactéria aeróbica obrigatória, Gram-negativa, com formato baciliforme, uniflagelada (flagelo polar), não formadora de esporos, pertencente ao gênero *Xanthomonas* (do grego, *xanthos* = amarelo; *monas* = unidade) (Swings & Civerolo, 1993, Das, 2003). Bactérias deste gênero se caracterizam por formar colônias amarelas e de aspecto mucóide em meio de cultura (Figura 1) devido à produção de pigmentos de membrana, semelhantes à carotenóides, denominados xantomonadinas (Starr et al., 1977, Poplawsky et al., 2000), e de exopolissacarídeos, principalmente a goma xantana, que auxiliam na dispersão e sobrevivência bacteriana (Vojnov et al., 1998, Das, 2003, Dunger et al., 2007). *Xanthomonas* constitui também um diverso e economicamente importante grupo de bactérias fitopatogênicas que causam doenças em pelo menos 124 espécies de monocotiledôneas e 268 dicotiledôneas (Leyns et al., 1984, Buttner & Bonas, 2010, Ryan et al., 2011).

Figura 1 – Colônias de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em meio de cultura sólido.

A forma mais propagada e agressiva do cancro cítrico é a cancrase A ou cancro cítrico asiático (Stall & Seymour, 1983, Das, 2003), cujo agente etiológico, foi primeiramente descrito como *Pseudomonas citri* (Hasse, 1915). Desde sua primeira classificação, a taxonomia bacteriana sofreu diversas modificações e a bactéria foi reclassificada como *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Dye et al., 1980), *Xanthomonas citri* pv. *citri* (Gabriel et al., 1989), *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Vauterin et al., 1995), e atualmente seu nome foi modificado para *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Schaad et al., 2005, Schaad et al., 2006).

Figura 2 – Ciclo de infecção do cancro cítrico (Gottwald et al., 2002).

Figura 3 – Lesões do cancro cítrico observadas em folhas, ramos e frutos (Gottwald et al., 2002).

X. citri subsp. *citri*, aqui referenciada apenas como *Xac*, ataca quase todas as variedades e espécies de citros possuindo, portanto, uma ampla gama de hospedeiros (Civerolo, 1984, Gottwald et al., 2002, Brunings & Gabriel, 2003, Das, 2003). Diferentemente de patógenos vasculares, como *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) e *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*), que podem se espalhar sistemicamente pela planta hospedeira, *Xac* é um patógeno mesofílico e se multiplica localmente a partir do ponto de infecção (Buttner & Bonas, 2010, Ryan et al., 2011). Uma vez depositada sobre o hospedeiro, após disseminação geralmente por chuvas (Figura 2), *Xac* pode colonizar a superfície da planta de forma epífita, sem causar doença (Dunger et al., 2007, Rigano et al., 2007). Ao encontrar uma porta de entrada, por meio de aberturas naturais (estômatos e hidatódios) ou de ferimentos mecânicos (Figura 2), a bactéria coloniza os espaços intercelulares do tecido hospedeiro e inicia a produção de fatores de virulência (Graham et al., 1992, Gottig et al., 2010). A doença

manifesta-se em folhas (em ambos os lados), ramos e frutos como lesões de coloração parda, circulares, corticosas, salientes e circundadas por um halo amarelo clorótico (Figura 2, Figura 3) (Brunings & Gabriel, 2003, Das, 2003, Graham et al., 2004). Quando em alta severidade a doença pode levar a queda prematura dos frutos ao afetar o equilíbrio hormonal da produção de etileno pela planta (Dutta & Biggs, 1991). Não existe método eficiente de controle do cancro cítrico. A única maneira de eliminar a doença é por meio da erradicação das plantas doentes, um procedimento que resulta em grandes perdas econômicas (Gottwald et al., 2002, Das, 2003, Graham et al., 2004, Vojnov et al., 2010).

1.2. Fatores de virulência e regulação da patogenicidade de *Xanthomonas*

Para se estabelecerem em seus hospedeiros as bactérias fitopatogênicas devem ser capaz de aderir na superfície da planta, invadir o espaço intercelular do hospedeiro, adquirir nutrientes e neutralizar as respostas de defesa da planta (Van Sluys et al., 2002). Muitas vezes, a infecção da planta hospedeira depende também de sistemas de secreção que transportam proteínas bacterianas para o espaço extracelular ou injetam DNA e/ou proteínas efetoras diretamente no citosol da célula hospedeira (Preston et al., 2005). Durante a infecção por *Xac*, por exemplo, um sintoma característico e essencial para o diagnóstico do cancro cítrico é a indução pelo patógeno da formação de tecido hiperplástico no hospedeiro. A hiperplasia é resultado da atividade do gene *pthA* da bactéria, que codifica para uma proteína similar aos fatores de transcrição eucarióticos, que é secretada através do sistema de secreção tipo III (SST3) do patógeno e causa divisões mitóticas excessivas no hospedeiro, levando ao aparecimento das lesões do

tipo cancro (Swarup et al., 1992, Duan et al., 1999, Brunings & Gabriel, 2003, Boch & Bonas, 2010, Li et al., 2014).

Nos últimos anos, a obtenção da sequência do genoma de diversas espécies e patovares de bactérias do gênero *Xanthomonas* vêm facilitando as análises funcionais e contribuindo para uma melhor compreensão das bases moleculares da virulência e especificidade de hospedeiros exibidos por estas bactérias fitopatogênicas (da Silva et al., 2002, Lee et al., 2005, Qian et al., 2005, Thieme et al., 2005). Análises comparativas permitiram identificar que quase todas as *Xanthomonas* possuem em seu genoma determinados agrupamentos de genes associados com a patogenicidade, incluindo: genes *xps*, que codificam para um sistema de secreção tipo II (SST2), genes *rpf* (*regulation of pathogenicity factors*), que regulam a síntese de alguns fatores de patogenicidade, genes *hrp* (*hypersensitive response and pathogenicity*), que codificam para um sistema de secreção tipo III, e genes *gum*, necessários para a síntese da goma xantana (Buttner & Bonas, 2010, Ryan et al., 2011). A expressão coordenada destes fatores de virulência em *Xanthomonas* é orquestrada por vias de comunicação célula-célula (*quorum-sensing*), múltiplos sistemas regulatórios de dois componentes, reguladores transcricionais, como Clp, Zur, FhrR, HrpX e HpaR, e reguladores pós-transcricionais, como a proteína ligadora de RNA, RsmA (Figura 4) (Buttner & Bonas, 2010, Romeo et al., 2013), para mencionar somente alguns daqueles parcialmente caracterizados.

Os sistemas de secreção tipo II promovem a secreção de enzimas extracelulares, como celulasas, poligalacturonases, xilanases e proteases, que podem ser necessárias para a degradação da parede celular da célula vegetal durante a infecção bacteriana (Jha et al., 2005). *Xanthomonas* e bactérias filogeneticamente

relacionadas como *Xylella fastidiosa* e *Stenotrophomonas* spp. possuem um SST2 chamado Xps, que já foi demonstrado ser importante para a virulência de *X. campestris* pv. *campestris*, *X. campestris* pv. *vesicatoria*, *X. oryzae* pv. *oryzae* e *X. citri* subsp. *citri* (Dow et al., 1987, Ray et al., 2000, Jha et al., 2007, Wang et al., 2008, Baptista et al., 2010, Szczesny et al., 2010). Um segundo SST2, chamado de Xcs, também pode ser encontrado em certas espécies de *Xanthomonas*, incluindo *Xac*, entretanto este sistema parece não estar envolvido na virulência bacteriana (Szczesny et al., 2010).

Figura 4 – Representação esquemática das vias de sinalização envolvidas no controle da expressão de genes de virulência em *Xanthomonas campestris* pv *campestris* (Xcc) (Buttner & Bonas, 2010). Em Xcc e outras *Xanthomonas*, a expressão de muitos fatores de virulência é regulada de modo dependente de densidade celular por meio do acúmulo extracelular de uma molécula de comunicação célula-célula (*quorum-sensing*) denominada DSF (*diffusible signal factor*). DSF é sintetizada por RpfF e é reconhecida por um sistema de dois componentes constituído pelo sensor RpfC e pelo regulador de resposta RpfG, que contém um domínio HD-GYP envolvido na degradação do segundo mensageiro c-di-GMP. Além de RpfC/RpfG, outro sistema de

dois componentes, RavS/RavR, também contribui para a hidrólise de c-di-GMP por meio da ativação do domínio EAL do regulador de resposta RavR. A ativação de RavR é realizada, possivelmente em condições de baixos níveis de oxigênio, pela proteína sensora RavS, contendo dois domínios PAS. Altos níveis de c-di-GMP promovem a formação de biofilme e inibem a ligação do regulador transcricional Clp ao promotor dos genes-alvo. Clp induz a síntese de enzimas extracelulares e ativa a expressão dos reguladores FhrR e Zur. O ativador transcricional Zur e o regulador de resposta HrpG induzem a expressão do gene *hrpX*, que codifica um regulador transcricional essencial para a expressão dos genes *hrp*. A expressão dos genes *hrp* também depende do sistema de dois componentes ColS/ColR e é reprimida por FhrR. HrpX regula a expressão de genes adicionais incluindo *hpaR*. HpaR é um regulador transcricional envolvido na inibição da atividade de proteases extracelulares em *Xcc*. A regulação da formação de biofilme, produção de EPS e da síntese de enzimas extracelulares também é influenciada pós-transcricionalmente pela proteína de ligação a RNA RsmA. As linhas tracejadas indicam que o efeito regulatório de RsmA na formação de biofilme, produção de EPS e síntese de enzimas extracelulares ocorre de forma indireta. Sistemas de dois componentes são mostrados em verde, e os reguladores transcricionais em amarelo. Os símbolos (+) e (-) indicam regulação positiva e negativa da transcrição, respectivamente.

Um dos principais fatores de patogenicidade de muitas bactérias Gram-negativas patogênicas de plantas ou animais são os sistemas de secreção tipo III, os quais podem injetar proteínas efetoras diretamente no citosol da célula hospedeira para manipular os processos celulares em benefício do patógeno (Ghosh, 2004, Coburn et al., 2007). Em bactérias fitopatogênicas, o SST3 é codificado por um agrupamento de genes cromossômicos chamado *hrp*, os quais são essenciais não somente para a manifestação da patogenicidade bacteriana em plantas hospedeiras, mas também para a indução da resposta de hipersensibilidade em plantas não hospedeiras (Lindgren et al., 1986, Buttner & Bonas, 2002). Muitas espécies de *Xanthomonas* utilizam também um SST3 Hrp para injetar proteínas efetoras no citoplasma da célula vegetal, onde estas proteínas podem promover a manifestação da doença por meio de diferentes mecanismos de ação (Gurlebeck et al., 2006, Kay & Bonas, 2009, White et al., 2009, Boch & Bonas, 2010). Acredita-se que o arsenal de diferentes proteínas efetoras

secretadas pelo SST3 seja responsável por conferir especificidade na interação entre as diferentes espécies de *Xanthomonas* e suas respectivas plantas hospedeiras (Lindeberg et al., 2009, Rybak et al., 2009, Moreira et al., 2010).

Além dos fatores de virulência secretados pelos sistemas de secreção tipo II e III, a patogenicidade de *Xanthomonas* também depende de outras estruturas na superfície bacteriana como adesinas, exopolissacarídeos (EPS) e lipopolissacarídeos (LPS) (Buttner & Bonas, 2010, Gottig et al., 2010, Ryan et al., 2011). A aderência bacteriana à superfície do hospedeiro, que corresponde a uma etapa determinante para a invasão do tecido, é dependente da expressão de proteínas específicas, conhecidas como adesinas, ancoradas na membrana externa bacteriana (Gerlach & Hensel, 2007). Para se aderir à superfície de seus hospedeiros *Xanthomonas* pode sintetizar adesinas fimbriais, incluindo pilus tipo IV e proteínas relacionadas (van Doorn et al., 1994), assim como adesinas não fimbriais como, por exemplo, as proteínas XadA e XadB (*Xanthomonas adhesin-like proteins*), primeiramente caracterizadas em *Xoo* (Ray et al., 2002, Das et al., 2009), ou proteínas do tipo Fha (*filamentous haemagglutinin-like proteins*), como a adesina XacFhaB (XAC1815) de *Xac* (Gottig et al., 2009).

Lipopolissacarídeos e polissacarídeos extracelulares, como a goma xantana, também contribuem para a patogenicidade de *Xanthomonas* (Kingsley et al., 1993, Chou et al., 1997, Dow et al., 1995, Petrocelli et al., 2012, Yan et al., 2012). Além de conferir proteção contra estresses ambientais e/ou respostas de defesa da planta, LPS e EPS contribuem para a habilidade bacteriana em formar biofilmes, os quais são conglomerados de células imobilizadas numa matriz polimérica orgânica que possibilitam uma sobrevivência prolongada da bactéria em sua planta hospedeira (Dow et al., 2003, Rigano et al., 2007, Li & Wang, 2011a, Li & Wang, 2011b, Yan et al., 2012).

Similar a outras bactérias patogênicas, *Xanthomonas* desenvolveu sistemas de regulação para ativar a expressão de fatores de virulência em resposta a diferentes estímulos extracelulares, tais como densidade populacional, disponibilidade de nutrientes, níveis de oxigênio, presença de moléculas derivadas da planta hospedeira, entre outros (Figura 4). Muitos aspectos do comportamento bacteriano são influenciados pelo ambiente, seja extracelular ou intracelular. A célula bacteriana reconhece sinais externos de natureza diversa por meio de receptores especializados, muitos dos quais são constituídos por proteínas transmembrana e, fazem parte de sistemas de transdução de sinais de dois componentes. Uma grande variedade de sistemas de dois componentes conecta a percepção de um sinal ambiental específico a alterações apropriadas na expressão gênica e fisiologia bacteriana. Comumente, nos mecanismos de transdução de sinal, a percepção de um sinal primário, ativa um regulador de resposta e/ou altera os níveis de um segundo sinal intracelular, também chamado de segundo mensageiro. Clássicos segundos mensageiros citoplasmáticos retransmitem os sinais recebidos para as moléculas alvo dentro da célula. Frequentemente, esse processo possibilita a amplificação do sinal original por um sinal intracelular capaz de induzir drásticas alterações bioquímicas na célula (Stock et al., 2000, Spakov & Pertseva, 2008).

Análises por genômica comparativa indicam que o gênero *Xanthomonas* possui cerca de 450 sistemas de dois componentes (Qian et al., 2008). Até o momento, entretanto, somente alguns desses sistemas foram estudados e caracterizados quanto aos seus papéis na virulência de *Xanthomonas*. Entre os sistemas de dois componentes caracterizados em *Xanthomonas* destacam-se: RpfC/RpfG, envolvido na comunicação célula-célula e regulação da produção de fatores de virulência (Slater et

al., 2000, Andrade et al., 2006, Ryan et al., 2006a); RavS/RavR (*regulation of adaptation and virulence*), que regula a produção de fatores de virulência em condições de hipóxia (He et al., 2009); ColR/ColS, que contribui para a expressão de alguns genes *hrp* e de outros fatores de virulência (Zhang et al., 2008, Yan & Wang, 2011); e PhoP/PhoQ, que controla a expressão gênica em resposta a baixas concentrações extracelulares de Ca^{2+} e Mg^{2+} e é crítico para a sobrevivência da bactéria no hospedeiro (Lee et al., 2008b). PhoP/PhoQ também contribui para a ativação do regulador de resposta HrpG, o qual é essencial para a expressão dos genes *hrp* que formam o SST3 de *Xanthomonas* (Wengelnik et al., 1996, Wengelnik et al., 1999, Lee et al., 2008b). Muitos desses sistemas de dois componentes exercem suas funções regulatórias por meio de interações diretas ou indiretas com a via de sinalização pelo segundo mensageiro intracelular c-di-GMP (Figura 4), a qual vêm se consolidando nos últimos anos como a principal via de regulação para as alterações no estilo de vida e patogenicidade de bactérias em resposta a estímulos ambientais (Romling, 2012, Kalia et al., 2013, Romling et al., 2013, Ryan, 2013).

1.3. Sinalização por c-di-GMP em bactérias

1.3.1. Enzimas envolvidas no metabolismo de c-di-GMP

O segundo mensageiro citoplasmático diguanilato cíclico (c-di-GMP) (Figura 5) foi primeiramente identificado como um ativador alostérico da celulose sintase utilizada por *Gluconacetobacter xylinus* (antes denominada *Acetobacter xylinum*) para produzir uma matriz de celulose extracelular (Ross et al., 1986, Ross et al., 1987). Posteriormente, enzimas capazes de sintetizar e degradar c-di-GMP, diguanilato ciclases (DGC) e fosfodiesterases (PDE), foram purificadas e seus genes

correspondentes foram identificados por meio da genética reversa (Tal et al., 1998). Desde então, foi verificado que o c-di-GMP é sintetizado por uma classe de enzimas que contém domínios GGDEF (Paul et al., 2004b, Hickman et al., 2005, Ryjenkov et al., 2005) e hidrolisado por outras famílias de proteínas que possuem domínios EAL (Bobrov et al., 2005, Schmidt et al., 2005, Tamayo et al., 2005, Christen et al., 2005) ou HD-GYP (Ryan et al., 2006a) (Figura 5), onde os nomes dos domínios foram originados dos motivos de aminoácidos conservados presentes no sítio ativo destas enzimas (Hecht & Newton, 1995, Chan et al., 2004, Wassmann et al., 2007, Barends et al., 2009, Tchigvintsev et al., 2010, Lovering et al., 2011). Homólogos destas proteínas são encontrados em abundância nos genomas de Eubactérias, sugerindo que a sinalização por c-di-GMP é largamente empregada nesse domínio da vida (Galperin et al., 1999, Galperin, 2001, Galperin et al., 2001). Além disso, recentemente foi proposto que a sinalização por c-di-GMP também pode ser importante para a regulação do desenvolvimento em eucariotos inferiores (Chen & Schaap, 2012).

Figura 5 – Síntese e degradação de c-di-GMP. Diguanylat ciclases (DGCs), contendo o domínio GGDEF, sintetizam o segundo mensageiro c-di-GMP (representado no centro da figura) a partir de duas moléculas de GTP. Fosfodiesterases (PDEs), contendo os domínios EAL ou HD-GYP, hidrolisam c-di-GMP em 5'-pGpG ou GMP, respectivamente (Boyd & O'Toole, 2012).

As diguanilato ciclasas catalisam a formação de c-di-GMP a partir de duas moléculas de GTP (Figura 5). Durante a catálise, duas moléculas de pirofosfato são também liberadas como subprodutos da reação (Ross et al., 1987). Os primeiros estudos bioquímicos e estruturais que ajudaram a compreender melhor o mecanismo de síntese de c-di-GMP foram realizados com a DGCs PleD de *Caulobacter crescentus* (Chan et al., 2004, Wassmann et al., 2007) e WspR de *Pseudomonas* spp. (Malone et al., 2007, De et al., 2008). A similaridade com o core catalítico das adenilato ciclasas assim como a natureza dinucleotídica da molécula de c-di-GMP implica que os domínios GGDEF atuam como homodímeros, onde o sítio catalítico é formado na interface de dimerização e cada monômero contribui com a ligação de uma única molécula de substrato GTP. Isso explica por que a atividade enzimática específica de PleD (e de outros DGCs) é fortemente dependente da concentração enzimática, com apenas a fração dimérica da proteína apresentando altos níveis de atividade de DGC (Ryjenkov et al., 2005, Paul et al., 2007). O motivo GG^D/E^F (sítio A = sítio ativo), altamente conservada pelas DGCs, se localiza em um beta hairpin (Figura 6) e faz parte do chamado meio-sítio ativo (*half site*) de um domínio GGDEF monomérico. Além do sítio A, as DGCs podem apresentar também um sítio inibitório (sítio I), caracterizado pelo motivo RxxD (onde x representa qualquer aminoácido). Um dímero de moléculas de c-di-GMP pode se ligar ao sítio I provocando inibição alostérica pelo produto (Christen et al., 2006). Os sítios A e I estão localizados em lados opostos do domínio GGDEF (Figura 6). A análise da estrutura cristalográfica de PleD em complexo com um análogo de substrato (GTP α S) aliada aos estudos por mutagênese sítio dirigida permitiram atribuir prováveis funções específicas na catálise, ligação ao substrato

(GTP) e coordenação de íons Mg^{2+} para a maioria dos resíduos de aminoácidos conservados no sítio ativo das DGCs (Figura 17) (Christen et al., 2006, Malone et al., 2007, Wassmann et al., 2007). Entretanto, a estrutura conformacional de um dímero cataliticamente competente, ou seja, na presença do substrato verdadeiro (GTP), ainda não pode ser obtida para confirmar o mecanismo catalítico exato da síntese de c-di-GMP pelas DGCs.

Figura 6 – Estrutura do domínio GGDEF da proteína tDGC de *Thermotoga marítima* (Deepthi et al., 2014). A) Topologia do domínio GGDEF de tDGC mostrando a disposição dos elementos de estrutura secundária, hélices α (em azul) e fitas β (em rosa). B) Estrutura cristalográfica do domínio GGDEF de tDGC. As linhas tracejadas em vermelho e azul indicam a localização dos sítios A (motivo GGDEF) e I (motivo RxxD), respectivamente.

As fosfodiesterases contendo um domínio EAL ativo catalisam a linearização de c-di-GMP em 5'-pGpG, o qual é posteriormente hidrolisado a GMP por outras PDEs

celulares (Ross et al., 1987, Tal et al., 1998). A atividade específica de PDE de c-di-GMP do domínio EAL requer Mg^{2+} ou Mn^{2+} e é fortemente inibida por Ca^{2+} ou Zn^{2+} (Christen et al., 2005, Schmidt et al., 2005, Tamayo et al., 2005). Estudos estruturais e mutagênicos permitiram identificar pelo menos 10 resíduos de aminoácidos importantes associados à atividade de PDE, como por exemplo, o resíduo de glutamato (E) presente no motivo EAL, altamente conservado entre as PDEs ativas, o qual está diretamente envolvido na coordenação de um dos dois íons metálicos necessários para a catálise (Rao et al., 2008, Barends et al., 2009, Minasov et al., 2009, Rao et al., 2009b, Tchigvintsev et al., 2010). Ao contrário dos domínios GGDEF, que precisam formar homodímeros para realizar a catálise, os domínios EAL parecem manter algum nível de atividade de PDE mesmo na forma monomérica (Schmidt et al., 2005). Entretanto, a grande maioria das PDEs contendo domínios EAL, caracterizadas até o momento, forma dímeros ou outros oligômeros de alta massa *in vitro*, indicando que o estado monomérico não corresponde à unidade funcional mais provável de um domínio EAL envolvido na hidrólise de c-di-GMP *in vivo* (Tarutina et al., 2006, Rao et al., 2008, Barends et al., 2009, Tchigvintsev et al., 2010, Phippen et al., 2014).

Uma segunda classe, menos comum, de PDEs de c-di-GMP é constituída por proteínas contendo domínios HD-GYP, as quais pertencem à superfamília HD de fosfohidrolases metalo-dependentes e não apresentam similaridade de sequência com os domínios EAL (Galperin et al., 1999, Ryan et al., 2006a, Ryan et al., 2009, Sultan et al., 2011). Diferente do domínio EAL, que apresenta como principal produto catalítico a molécula de 5'-pGpG, considera-se que o domínio HD-GYP é suficiente para a completa hidrólise de c-di-GMP em duas moléculas de GMP (Figura 5) (Ryan et al., 2006a). Entretanto, como a disponibilidade de dados bioquímicos de qualidade ainda

permanecem escassos para proteínas contendo um domínio HD-GYP ativo, estudos futuros ainda são necessários para esclarecer melhor o significado da aparente diferença entre os produtos da reação de PDE catalisada pelos domínios EAL e HD-GYP (Romling et al., 2013). Atualmente, a proteína Bd1817 de *Bdellovibrio bacteriovorus* representa a única estrutura cristalográfica de alta resolução disponível para um domínio HD-GYP (Lovering et al., 2011). Bd1817, porém, não apresenta atividade de PDE e, aparentemente, também não é capaz de se ligar a c-di-GMP *in vitro* (Lovering et al., 2011). Mesmo assim, a estrutura de Bd1817 ainda se mostrou instrutiva e permitiu a observação de que vários resíduos de aminoácidos, geralmente conservados em domínios HD-GYP, se agrupam em torno de um centro binuclear de íons metálicos catalíticos, que provavelmente correspondem a Fe^{2+} ou Mn^{2+} (Lovering et al., 2011, Sultan et al., 2011).

1.3.2. Distribuição dos domínios GGDEF, EAL e HD-GYP nos genomas bacterianos

O grande número de proteínas contendo domínios GGDEF e EAL em uma única espécie de bactéria é intrigante. Em geral, bactérias Gram-negativas possuem mais dessas proteínas que bactérias Gram-positivas, e dentre as bactérias Gram-negativas, especialmente as proteobactérias gama apresentam uma proliferação impressionante de proteínas com domínios GGDEF e/ou EAL (Romling et al., 2005, Hengge, 2009, Seshasayee et al., 2010). Por exemplo, *E. coli* possui 29 proteínas com domínios GGDEF e/ou EAL, enquanto que *Salmonella enterica* tem 19, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescens* possuem 41 e 43 dessas proteínas, respectivamente, e várias espécies de *Vibrio* codificam mais de 70 proteínas contendo

domínios GGDEF e/ou EAL (Galperin, 2001, Galperin et al., 2001, Ryan et al., 2006b, Newell et al., 2011, Povolotsky & Hengge, 2012). Por outro lado, proteínas contendo um domínio HD-GYP são menos comuns e até mesmo ausentes em algumas espécies. Embora em alguns casos, como em *Thermotoga marítima*, cujo genoma não codifica proteínas com domínio EAL, as proteínas com domínio HD-GYP devem responder por toda a atividade de PDE de c-di-GMP nesta bactéria (Kyrpides et al., 2000, Galperin, 2001, Galperin et al., 2001).

A ocorrência de genes codificando DGCs e PDEs no genoma de *Xanthomonas* também é alta. Os genomas de *Xac* e *Xcc* codificam três proteínas com um domínio HD-GYP e 34 proteínas com domínios GGDEF e/ou EAL (Andrade et al., 2006, Ryan et al., 2007, Andrade, 2011). Trinta e seis dessas proteínas são também encontradas em *X. campestris* pv. *armoraciae*, 31 em *X. oryzae* pv. *oryzicola* e 26 em *X. oryzae* pv. *oryzae* (Ryan et al., 2011).

Um dos aspectos mais curiosos das enzimas que metabolizam c-di-GMP é a natureza modular da estrutura dessas proteínas. Embora algumas proteínas sejam compostas de apenas domínios GGDEF, EAL ou HD-GYP, em muitas proteínas, entretanto, estes domínios estão presentes em combinação com outros domínios regulatórios (Galperin et al., 2001, Jenal, 2004, Romling et al., 2005). Dentre os domínios mais frequentemente encontrados em associação com os domínios GGDEF, EAL e HD-GYP incluem módulos sensoriais e regulatórios como os domínios PAS (Per-Arnst-Sim), GAF (cGMP-specific phosphodiesterases, Adenylyl cyclases and FhlA), HAMP (Histidine kinases, Adenylate cyclases, Methyl accepting proteins and Phosphatases) e REC (two-component receiver domains) (Seshasayee et al., 2010, Romling et al., 2013). Além de domínios sensores citoplasmáticos, muitas DGCs e

PDEs apresentam também domínios transmembrana que conectam os domínios GGDEF, EAL ou HD-GYP a domínios sensores extracelulares ou periplasmáticos, como os domínios CHASE (Cyclases/Histidine kinases Associated Sensory Extracellular) (Zhulin et al., 2003), Cache (Calcium channels and Chemotaxis receptors) (Anantharaman & Aravind, 2000) e MASE (Membrane-Associated Sensor) (Nikolskaya et al., 2003). A presença desses domínios adicionais sugere a existência de múltiplos mecanismos pelos quais as atividades dos domínios GGDEF, EAL e HD-GYP podem ser controlados, em resposta a diversos sinais ambientais e celulares como luz, gases (O₂ e NO), fosforilação, estado oxidativo, escassez de nutrientes, presença de antibióticos ou moléculas de comunicação célula-célula, entre outros (Jenal & Malone, 2006, Romling & Amikam, 2006, Cotter & Stibitz, 2007, Hengge, 2009, Schirmer & Jenal, 2009, Mills et al., 2011, Sondermann et al., 2012, Romling et al., 2013).

Proteínas contendo o domínio GGDEF covalentemente ligado a domínios EAL ou HD-GYP também são encontradas com frequência nos genomas bacterianos (Seshasayee et al., 2010). Na maioria dos casos, entretanto, estas proteínas possuem apenas atividade de PDE ou de DGC, com o domínio enzimaticamente inativo exercendo uma função estrutural ou regulatória (Schmidt et al., 2005, Kuchma et al., 2007, Qi et al., 2009, Tuckerman et al., 2009). Por exemplo, a ligação de GTP ao domínio GGDEF degenerado da proteína CC3396, de *C. crescentus*, estimula a atividade de PDE do domínio EAL adjacente, diminuindo seu K_M de ligação à c-di-GMP para um nível fisiologicamente relevante (Christen et al., 2005). Quando proteínas bifuncionais são encontradas, em que ambos os domínios são enzimaticamente ativos, o que geralmente se observa é uma regulação diferencial das atividades de DGC e PDE, ativando hora o domínio GGDEF, hora o domínio EAL, obtendo, assim, uma

atividade enzimática prevalecente em resposta a um determinado estímulo ambiental e/ou intracelular (Tarutina et al., 2006, Ferreira et al., 2008, Levet-Paulo et al., 2011).

1.3.3. Mecanismos efetores e fisiologia da sinalização por c-di-GMP

A sinalização por c-di-GMP está relacionada a uma grande variedade de processos celulares como, por exemplo, comunicação célula-célula, regulação da expressão gênica, produção de exopolissacarídeos, secreção de fatores de virulência, biossíntese de flagelo, montagem de pilus tipo IV, entre outros (Romling et al., 2005, Fouhy et al., 2006, Ryan et al., 2006a, Weber et al., 2006, Lee et al., 2007, He & Zhang, 2008, Leduc & Roberts, 2009, Qi et al., 2011). Isto significa que a molécula de c-di-GMP pode influenciar muitos aspectos do comportamento bacteriano, incluindo motilidade, adesão a superfícies, agregação celular, formação e dispersão de biofilmes, diferenciação ou progressão do ciclo celular e a virulência de bactérias patogênicas de plantas ou animais (Jenal & Malone, 2006, Hengge, 2009, Mills et al., 2011, Krasteva et al., 2012, Romling, 2012, Sondermann et al., 2012, Romling et al., 2013).

Em geral, o aumento dos níveis intracelulares de c-di-GMP estimula a formação de biofilme e inibe várias formas de motilidade bacteriana, incluindo formas dependentes (*swimming* e *swarming*) ou independentes de flagelo (*twitching*, *sliding* e *gliding*) (Hickman et al., 2005, Wolfe & Visick, 2008, Boyd & O'Toole, 2012, Gao et al., 2013, Hengge, 2013). Por outro lado, além de sinalizar para a dispersão do biofilme, baixos níveis intracelulares de c-di-GMP estão associados também à manifestação da virulência bacteriana (Tischler & Camilli, 2005, Fouhy et al., 2006, Ryan et al., 2009, Ferreira et al., 2012, Ryan, 2013).

Para exercer seus efeitos sobre o comportamento bacteriano, a molécula de c-di-GMP precisa se ligar e alterar a estrutura e/ou atividade de um componente efetor (Shanahan & Strobel, 2012, Krasteva et al., 2012, Romling et al., 2013). Uma grande diversidade de receptores de c-di-GMP monitoram os níveis intracelulares deste segundo mensageiro traduzindo-os em respostas adaptativas específicas (Tabela 1). Até o momento, cinco principais tipos de receptores de c-di-GMP já foram identificados: (a) proteínas efetoras, tais como proteínas contendo domínios PilZ que ao se ligarem a c-di-GMP sofrem drásticas alterações conformacionais e geram efeitos alostéricos dentro da própria proteína ou influenciam sua interação com outras proteínas (Amikam & Galperin, 2006, Ryjenkov et al., 2006, Pratt et al., 2007, Benach et al., 2007); (b) proteínas contendo domínios GGDEF ou EAL degenerados que não são mais cataliticamente ativas, mas que retêm a capacidade de se ligarem à c-di-GMP e funcionarem como receptores deste segundo mensageiro (Duerig et al., 2009, Navarro et al., 2009, Navarro et al., 2011, Rakshe et al., 2011, Petters et al., 2012); (c) enzimas que utilizam a ligação direta à molécula de c-di-GMP para a regulação da atividade enzimática (Tuckerman et al., 2011); (d) fatores de transcrição que se ligam à c-di-GMP para ativar ou reprimir a expressão de genes (Hickman & Harwood, 2008, Leduc & Roberts, 2009, Chin et al., 2010, Krasteva et al., 2010, Wilksch et al., 2011) e (e) riboswitches, estruturas enoveladas de RNA que se ligam a c-di-GMP para regular os processos de transcrição ou tradução gênica (Sudarsan et al., 2008, Smith et al., 2009, Lee et al., 2010).

Tabela 1 – Principais receptores de c-di-GMP caracterizados.

Receptor	Organismo	Arquitetura de domínios*	Mecanismo efector	Função biológica	Referência
Proteínas contendo domínios PilZ					
Alg44	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MFP/TM/ <u>PilZ</u>	Interação proteína-proteína	Produção de alginato	Merighi et al. (2007), Oglesby et al. (2008)
MrkH	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<u>PilZ</u>	Ligação ao DNA	Expressão de fímbrias e formação de biofilme	Wilksch et al. (2011)
DgrA	<i>Caulobacter crescentus</i>	<u>PilZ</u>	Interação proteína-proteína	Controle da motilidade celular	Christen et al. (2007)
BcsA	<i>Gluconacetobacter xylinus</i>	TM/Cell_synth_A/ <u>PilZ</u>	Controle da atividade enzimática	Produção de celulose	Weinhouse et al. (1997), Ryjenkov et al. (2006)
PlzD	<i>Vibrio cholerae</i>	YcgR_N/ <u>PilZ</u>	Mudança conformacional	Motilidade, formação de biofilme e virulência	Pratt et al. (2007), Benach et al. (2007)
PlzA	<i>Borrelia burgdorferi</i>	<u>PilZ</u>	Desconhecido	Motilidade e infectividade	Freedman et al. (2010), Pitzer et al. (2011)
YcgR	<i>Escherichia coli</i>	<u>PilZ</u>	Interação proteína-proteína	Controle da rotação flagelar	Ryjenkov et al. (2006), Boehm et al. (2010), Fang & Gomelsky (2010), Paul et al. (2010)
PilZ	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<u>PilZ</u>	Desconhecido	Biogênese de pilus tipo IV e motilidade twitching	Alm et al. (1996)
PP4397	<i>Pseudomonas putida</i>	YcgR_N/ <u>PilZ</u>	Controle da dimerização	Desconhecida	Ko et al. (2010)
PA4608	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<u>PilZ</u>	Mudança conformacional	Desconhecida	Ramelot et al. (2007), Habazettl et al. (2011)
Domínios GGDEF degenerados					
PelD	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	TM/GAF/ <u>GGDEF</u>	Interação proteína-proteína	Produção de exopolissacarídeos	Lee et al. (2007), Whitney et al. (2012)
PopA	<i>Caulobacter crescentus</i>	REC/REC/ <u>GGDEF</u>	Localização no polo celular	Controle do ciclo celular	Duerig et al. (2009), Abel et al. (2011)

*Domínio ou motivos diretamente envolvidos na ligação ao c-di-GMP estão sublinhados.

Tabela 1 – Continuação...

Receptor	Organismo	Arquitetura de domínios*	Mecanismo efetor	Função biológica	Referência
Domínios EAL degenerados					
FimX	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Xanthomonas citri</i>	REC/PAS/GGDEF/ <u>EAL</u>	Interação proteína-proteína	Regulação da biogênese de pilus tipo IV e motilidade	Huang et al. (2003), Guzzo et al. (2009), Navarro et al. (2009), Qi et al. (2011)
LapD	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	LapD/TM/HAMP/GGDEF/ <u>EAL</u>	Regulação de proteases periplasmáticas	Adesão e formação de biofilme	Newell et al. (2009), Navarro et al. (2011)
Fatores de transcrição					
FleQ	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	FLEQ/ <u>AAA+</u> /HTH	Redução da ligação ao DNA	Motilidade e formação de biofilme	Hickman & Harwood (2008), Baraquet et al. (2012), Baraquet & Harwood (2013)
Clp	<i>Xanthomonas citri</i> e <i>Xanthomonas campestris</i>	<u>cNMP</u> -HTH	Redução da ligação ao DNA	Virulência	He et al. (2007), Leduc & Roberts (2009), Chin et al. (2010), Tao et al. (2010a)
Bcam1349	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	<u>cNMP</u> -HTH	Aumento da ligação ao DNA	Virulência e formação de biofilme	Fazli et al. (2011), Fazli et al. (2013)
VpsT	<i>Vibrio cholerae</i>	<u>REC</u> -HTH	Ligação ao DNA induzida por dimerização	Motilidade e formação de biofilme	Krasteva et al. (2010), Srivastava et al. (2011)
Enzimas					
PNPase	<i>Escherichia coli</i>	RNase PH1/RNase PH2/KH RNA-binding/S1 RNA-binding	Aumento da atividade enzimática	Degradação de RNA dependente de O ₂	Tuckerman et al. (2011)
Riboswitches					
Vc2 Riboswitch Class I	<i>Vibrio cholerae</i>	<u>GEMM</u>	Alteração da estrutura secundária do RNA	Regulação da expressão gênica	Sudarsan et al. (2008), Smith et al. (2009), Kulshina et al. (2009)
84Cd Riboswitch Class II	<i>Clostridium difficile</i>	<u>Pseudoknot</u>	<i>Splicing</i> alternativo de RNA	Obtenção de transcritos alterados	Lee et al. (2010), Smith et al. (2011)

*Domínio ou motivos diretamente envolvidos na ligação ao c-di-GMP estão sublinhados.

A diversidade e o grande número de proteínas envolvidas na sinalização por c-di-GMP preditas em muitos genomas bacterianos sugerem que as redes de sinalização por c-di-GMP são extremamente complexas. Apesar dos inúmeros avanços obtidos nos últimos anos, continua sendo desafiador tentar entender com precisão como os múltiplos sinais ambientais são integrados em uma regulação coordenada, tanto das muitas proteínas envolvidas no metabolismo de c-di-GMP, quanto de seus diversos mecanismos efetores que resultam em alterações específicas no comportamento bacteriano (Ryan et al., 2007, Beyhan et al., 2008, Boyd & O'Toole, 2012, Massie et al., 2012, Spurbeck et al., 2012, Petrova et al., 2015).

1.3.4. Cinética e regulação enzimática de diguanilato ciclases

As DGCs podem ser controladas por diferentes mecanismos. Um primeiro nível de regulação é dado pela regulação da expressão gênica. Estudos em *E. coli*, *Salmonella Typhimurium* e *X. campestris* indicam que a expressão de várias proteínas GGDEF e/ou EAL são influenciadas pela proteína CsrA/RsmA, contendo um domínio de ligação à RNA (Jonas et al., 2008, Jonas et al., 2010, Lu et al., 2012). Além disso, muitos genes que codificam proteínas contendo domínios GGDEF e/ou EAL em *E. coli*, estão também sobre o controle do fator sigma S, e são expressos durante a entrada na fase estacionária do crescimento (Sommerfeldt et al., 2009). Em *Legionella pneumophila*, um patógeno intracelular que apresenta um ciclo de vida bifásico (fase de replicação e fase de transmissão), 18 dos 24 genes que codificam proteínas contendo domínios GGDEF e/ou EAL são regulados positivamente na fase estacionária extracelular, fase de transmissão (Bruggemann et al., 2006). O fato de muitas proteínas GGDEF e/ou EAL serem expressas em condições similares sugere que mecanismos de

regulação pós-traducionais devem ser críticos para o controle da atividade dessas proteínas (Seshasayee et al., 2010).

Uma conclusão importante resultante das análises das estruturas cristalográficas de PleD (Chan et al., 2004, Wassmann et al., 2007), WspR (De et al., 2008, De et al., 2009) e de outras DGCs (Yang et al., 2011, Giardina et al., 2013, Zahringer et al., 2013, Deepthi et al., 2014) é que para a formação de c-di-GMP, cada sítio A deve ser ligar a uma molécula de GTP e permanecer em contato próximo, permitindo a formação de um homodímero cataliticamente competente (Schirmer & Jenal, 2009, Whiteley & Lee, 2015). Isto sugere que interações regulatórias que alteram a orientação relativa ou mantêm os domínios GGDEF fisicamente separados um do outro podem ser utilizadas como mecanismos eficientes de inibição da atividade de DGC (Romling et al., 2013).

A inibição alostérica pelo produto, que envolve a ligação de c-di-GMP a um sítio inibitório (sítio I), corresponde a um mecanismo, bem caracterizado, de controle da atividade de DGC (Christen et al., 2006). Esta inibição não competitiva da atividade de DGC ocorre via imobilização de domínios, ou seja, pela ligação cruzada entre dois domínios que imobiliza a enzima em um estado catalítico não competente, devido à separação espacial entre os dois sítios A (Deepthi et al., 2014). A ligação de c-di-GMP às DGCs que apresentam um sítio I conservado (motivo RxxD) ocorre na forma de dímero intercalado (Figura 17), e geralmente com afinidade na ordem de nano- ou micro-molar (Tabela 2). A presença no domínio GGDEF do motivo RxxD, também chamado de sítio inibitório primário (I_p), é uma condição importante, porém não suficiente para a ocorrência da inibição pelo produto, uma vez que um segundo resíduo de arginina, fornecida por um sítio inibitório secundário (I_s), é também necessária (Wassmann et al., 2007). Este sítio inibitório secundário pode estar localizado em outro

domínio GGDEF ou em diferentes domínios regulatórios permitindo, assim, ligações cruzadas do tipo GGDEF/GGDEF (Wassmann et al., 2007, De et al., 2008, Vorobiev et al., 2012), GGDEF/REC (Chan et al., 2004) ou GGDEF/GAF (Whitney et al., 2012).

A inibição alostérica das DGCs pelo produto é, provavelmente, utilizada para limitar o tempo de ativação de um componente efetor desejado e/ou prevenir o acúmulo de c-di-GMP que possibilite a sua ligação em alvos indesejados (Romling et al., 2013). Entretanto, análises *in silico* indicam que muitos domínios GGDEF, apesar de potencialmente ativos, não apresentam um sítio I conservado e, provavelmente, não estão submetidas à inibição pelo produto pela forma usual, ou seja, pela ligação de c-di-GMP ao motivo RxxD (Christen et al., 2006, Seshasayee et al., 2010). De fato, recentemente, Yang et al. (2011) propuseram um mecanismo de inibição alostérico da atividade de DGC envolvendo a ligação competitiva de c-di-GMP ao sítio A. Esse novo tipo de ligação envolve interações por empilhamento de bases e peptídeos entre o c-di-GMP e os dois resíduos de glicina do motivo GGDEF, e alterações nestes dois resíduos, como nas mutações pontuais GADEF, AGDEF ou AADEF podem reduzir fortemente a capacidade de ligação ao c-di-GMP (Yang et al., 2011). Enquanto a ligação de c-diGMP ao sítio A surge como uma alternativa para a regulação de DGCs contendo um sítio I degenerado, a importância e abrangência desse mecanismo de inibição competitiva ainda precisam ser verificadas com mais detalhes (Romling et al., 2013).

Tabela 2 – Caracterização cinética de diguanilato ciclases.

DGC	Organismo	Arquitetura de domínios	Método de quantificação de c-di-GMP	Modelo cinético	Constantes cinéticas	Observações	Referências
PleD	<i>Caulobacter crescentus</i>	REC-REC-GGDEF	Quantificação indireta com o corante verde malaquita	Michaelis-Menten (considerando inibição não competitiva pelo produto)	$k_{cat} = 9 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ $K_M = 26 \text{ } \mu\text{M}$ $K_i = 0,5 \text{ } \mu\text{M}$		Chan et al. (2004), Wassmann et al. (2007)
			TLC	Michaelis-Menten (considerando inibição não competitiva pelo produto)	$k_{cat} = 0,2 \text{ min}^{-1}$ $K_M = \text{n.d.}$ $K_i = 5,8 \text{ } \mu\text{M}$		Christen et al. (2006)
			TLC	Nenhum	n.d.	A ativação de PleD com BeF_3 provoca uma diminuição no K_D de dimerização da proteína de $100 \text{ } \mu\text{M}$ para $10 \text{ } \mu\text{M}$ e um aumento de ≈ 50 vezes na atividade de DGC.	Paul et al. (2007)
WspR	<i>Pseudomonas syringae</i>	REC-GGDEF	Quantificação indireta utilizando o kit EnzChek Pyrophosphate Assay (Invitrogen)	Michaelis-Menten	$k_{cat} = 4,5 \text{ s}^{-1}$ $K_M = 6 \text{ } \mu\text{M}$ $K_i = \text{n.d.}$	Dados cinéticos obtidos para a amostra de WspR livre de c-di-GMP (adição e posterior remoção de PDE durante a purificação da proteína) e apresentando um equilíbrio entre tetrâmeros e dímeros compactos.	De et al. (2009)

(N.d.) Não determinado.

Tabela 2 – Continuação...

DGC	Organismo	Arquitetura de domínios	Método de quantificação de c-di-GMP	Modelo cinético	Constantes cinéticas	Observações	Referências
AxDGC2	<i>Acetobacter xylinum</i>	PAS-GGDEF-EAL	HPLC	Michaelis-Menten (considerando inibição não competitiva pelo produto)	FAD (oxidado): $k_{cat} = 5,6 \text{ min}^{-1}$ $K_M = 176 \text{ } \mu\text{M}$ $K_i = 52 \text{ } \mu\text{M}$ FAD (reduzido): $k_{cat} = 0,7 \text{ min}^{-1}$ $K_M = 112 \text{ } \mu\text{M}$ $K_i = \text{n.d.}$	A enzima na forma oxidada também apresenta forte inibição pelo substrato na faixa de 0-500 μM GTP.	Qi et al. (2009)
DgcA	<i>Caulobacter crescentus</i>	GGDEF	TLC	Michaelis-Menten (considerando inibição não competitiva pelo produto)	$k_{cat} = 2,8 \text{ min}^{-1}$ $K_M = \text{n.d.}$ $K_i = 1 \text{ } \mu\text{M}$	Devido à rápida inibição pelo produto os valores experimentais de V_0 foram provavelmente subestimados.	Christen et al. (2006)
DgcZ (YdeH)	<i>Escherichia coli</i>	CZB-GGDEF	LC/MS	Michaelis-Menten	$k_{cat} = 1,6 \text{ min}^{-1}$ $K_M = 17 \text{ } \mu\text{M}$ $K_i = 44 \text{ } \mu\text{M}$	A atividade de DGC é inibida pela ligação de Zn^{2+} ao domínio CZB ($K_d = 3 \times 10^{-17} \text{ M}$).	Boehm et al. (2009), Zahringer et al. (2011), Zahringer et al. (2013)
XCC4471	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	HAMP-GGDEF	Quantificação indireta utilizando o kit EnzChek Pyrophosphate Assay (Invitrogen)	Michaelis-Menten	$k_{cat} = 0,5 \text{ min}^{-1}$ $K_M = 105 \text{ } \mu\text{M}$ $K_i = 6,5 \text{ } \mu\text{M}$	Dados cinéticos obtidos com o fragmento XCC4471 ₆₉₋₃₀₁ , contendo o domínio GGDEF e parte do domínio HAMP. XCC4471 não apresenta o motivo RxxD (sítio I) e apresenta inibição alostérica pela ligação competitiva de c-di-GMP no sítio A.	Yang et al. (2011)

(N.d.) Não determinado

Uma outra maneira pela qual a atividade de DGC pode ser regulada é pelo controle da dimerização (ativação por dimerização), utilizando um domínio sensor que regula as interações proteína-proteína em resposta a estímulos intracelulares ou extracelulares. Por exemplo, em PleD de *C. crescentus* e Rrp1 de *Borrelia burgdorferi*, a fosforilação do domínio REC, localizado no N-terminal destas proteínas, estimula a dimerização, e é necessária para a obtenção de altos níveis de atividade de DGC (Ryjenkov et al., 2005, Paul et al., 2007). Várias proteínas contendo um domínio GGDEF catalítico possuem também domínios sensores adjacentes como PAS, GAF, HAMP, Cache, CHASE e MASE que podem ser utilizados para a regulação da atividade de DGC em resposta a estímulos como gases dissolvidos (CO, O₂ ou NO) (Tuckerman et al., 2009, Wan et al., 2009, Sawai et al., 2010, Plate & Marletta, 2012, Liu et al., 2012, Lahiri et al., 2014), zinco (Zahringer et al., 2013), cGMP (An et al., 2013), potencial redox (Qi et al., 2009) e luz (Tarutina et al., 2006, Savakis et al., 2012). Além de propiciarem uma interface para a dimerização, provavelmente, os domínios sensores adjacentes auxiliam também na correta orientação dos domínios GGDEF para a formação de um sítio catalítico competente (Schirmer & Jenal, 2009, Whiteley & Lee, 2015). Os domínios REC de PleD, por exemplo, são fundamentais para a orientação dos domínios GGDEF tanto para a formação de um dímero com conformação produtiva para a síntese de c-di-GMP, quanto para a produção de um estado dimérico não produtivo, que impede a ocorrência da catálise (Wassmann et al., 2007).

Relatos de oligomerização de DGCs independentemente de estímulos ou ligantes também existem (Ryjenkov et al., 2005, De et al., 2008, De et al., 2009, Zahringer et al., 2013). A proteína DgcZ (YdeH) de *E. coli*, por exemplo, parece formar um estado dimérico constitutivo mediado pelo domínio CZB (domínio de ligação a Zn²⁺),

no N-terminal da proteína (Boehm et al., 2009, Zahringer et al., 2013). Por outro lado, a ligação de Zn^{2+} ao motivo 3His/1Cys do domínio CZB, com afinidade da ordem de femtomolar (Tabela 2), induz uma alteração na conformação dimérica dos domínios GGDEF, e impossibilita a síntese de c-di-GMP (Zahringer et al., 2013).

Em alguns casos, as DGCs podem ser reguladas também por interações proteína-proteína com diferentes proteínas, contendo tanto domínios envolvidos no metabolismo de c-di-GMP, quanto na percepção de sinais. Em *Xac* e *Xcc*, por exemplo, a interação entre algumas proteínas contendo domínios GGDEF e o domínio HD-GYP da fosfodiesterase RpfG foi demonstrada ser importante para a regulação de vários processos celulares (Andrade et al., 2006, Ryan et al., 2010). Em *P. aeruginosa*, a interação com a proteína periplasmática YfiR inibe a atividade de DGC de YfiN, e previne o aparecimento do fenótipo de micro-colônias, correlacionado com a resistência a antibióticos por esta bactéria (Malone et al., 2012, Giardina et al., 2013). E em *Shewanella* spp. e, provavelmente, em outras bactérias, a interação de proteínas DGCs com o domínio H-NOX (*Heme Nitric Oxide/Oxygen*), envolvido na percepção de óxido nítrico (NO), afeta o metabolismo de c-di-GMP e, conseqüentemente, a formação de biofilme (Liu et al., 2012, Plate & Marletta, 2012).

Uma das principais questões a serem resolvidas no campo da sinalização por c-di-GMP se refere ao grau de especificidade dessa sinalização. Estudos genéticos acompanhados por quantificação dos níveis celulares de c-di-GMP indicam que, durante o processo de formação de biofilme, diferentes DGCs podem ser utilizadas por *V. cholerae* a fim de gerar uma indução rápida ou lenta da síntese de c-di-GMP e, conseqüente, formação de biofilme em resposta às diferentes condições ambientais (Massie et al., 2012). Além da descoberta de ligantes e/ou mecanismos envolvidos na

ativação/inibição de DGCs, estudos de caracterização da cinética enzimática são também de fundamental importância para um completo entendimento do papel dessas proteínas na rede de sinalização por c-di-GMP. Entretanto, provavelmente, devido à dificuldade na obtenção de métodos práticos para a quantificação de c-di-GMP e possível ocorrência de efeitos complexos provocados pela inibição pelo produto, poucos dados cinéticos de enzimas DGC foram descritos até o momento na literatura. Uma descrição rápida dos estudos cinéticos até o momento realizados com enzimas DGCs está disponibilizada na Tabela 2.

1.4. Estrutura e função de domínios GAF e PAS

Os domínios PAS e GAF constituem-se nos mais comuns e versáteis domínios proteicos de sinalização, e são encontrados em todos os domínios da vida: *Bacteria*, *Archaea*, e *Eucarya* (Taylor & Zhulin, 1999, Ho et al., 2000, Anantharaman et al., 2001, Galperin et al., 2001, Hurley, 2003, Galperin, 2004, Cheung & Hendrickson, 2010, Henry & Crosson, 2011). Particularmente abundantes no genoma de bactérias, estes domínios proteicos aparecem frequentemente acompanhados por domínios regulatórios adicionais, como REC, HAMP e uma grande variedade de domínios efetores como HisK (*Histidine Kinases*), domínios HTH (*helix-turn-helix*) de ligação ao DNA e domínios GGDEF, EAL e HD-GYP, envolvidos no metabolismo de c-di-GMP (Galperin et al., 2001, Galperin, 2004, Martinkova et al., 2013). Embora apresentem baixa homologia de sequência, os domínios GAF e PAS possuem uma estrutura tridimensional muito similar, indicando que se trata de domínios que compartilham uma origem evolutiva comum (Ho et al., 2000, Anantharaman et al., 2001, Martinez et al., 2002a, Hefti et al., 2004, Moglich et al., 2009, Schultz, 2009, De Franceschi et al., 2014). A estrutura

destes domínios geralmente é composta por uma única folha-beta, contendo cinco (PAS) ou seis (GAF) fitas-beta antiparalelas, a qual é flanqueada por alfa-hélices de tamanho e número variáveis (Figuras 7 e 8). A cavidade formada entre o cerne de folha-beta e as alfa-hélices flanqueadoras, frequentemente, está associada à ligação de cofatores e/ou pequenas moléculas pelos domínios PAS e GAF (Figuras 7 e 8) (Ho et al., 2000, Heikaus et al., 2009, Moglich et al., 2009, Henry & Crosson, 2011). Análises estruturais sugerem também que os domínios GAF e PAS podem ter dado origem a outras famílias de domínios protéicos, como o domínio de ligação a actina da proteína profilina de eucariotos (Schluter et al., 1997, De Franceschi et al., 2014), e domínios extracitoplasmáticos incluindo o domínio cache, envolvido no reconhecimento de sinais extracelulares (Anantharaman & Aravind, 2000, Anantharaman et al., 2001, Szurmant et al., 2007, Chang et al., 2010, Henry & Crosson, 2011).

Figura 7 – Estrutura tridimensional do domínio PAS. A) Estrutura do domínio PAS(A) da proteína NifL de *Azotobacter vinelandii* ligado a uma molécula de FAD (flavina-adenina dinucleótido). B) Representação da topologia do domínio PAS(A) de NifL mostrando a disposição dos elementos de estrutura secundária (hélices α e fitas β) geralmente conservados entre os domínios PAS (Moglich et al., 2009).

Figura 8 – Estrutura tridimensional do domínio GAF. A) Estruturas dos domínios GAF das fosfodiesterases de mamíferos PDE2A, PDE5A, PDE6C, e PDE10A, ligados a nucleotídeos cíclicos (cNMP). Alfa-hélices estão mostradas em vermelho, fitas-beta em azul, e as moléculas de cNMP estão representadas em bastonetes amarelos. B) Representação da topologia do domínio GAF mostrando a disposição dos elementos de estrutura secundária (hélices α e fitas β), que com exceção das hélices $\alpha 1$ e $\alpha 2/3$, são comumente conservados entre os domínios GAF destas PDEs (Heikaus et al., 2009).

A sigla GAF foi originada a partir dos nomes das três primeiras classes de proteínas caracterizadas por apresentarem esse domínio em comum: fosfodiesterases de mamíferos que ligam cGMP, Adenilato ciclases de *Anabaena* sp. e o ativador transcricional FhlA de *E. coli* (Aravind & Ponting, 1997). Atualmente existem mais de 7400 proteínas nos bancos de dados anotadas contendo um ou até seis domínios GAF na mesma cadeia polipeptídica (Schultz, 2009). A caracterização de algumas dessas proteínas indicam que os domínios GAF podem exercer uma grande variedade de funções, incluindo ligação a pequenas moléculas (Anantharaman et al., 2001), interação proteína-proteína (inclusive dimerização) (Pandit et al., 2009) e, até mesmo, função catalítica, como no caso da enzima fRMsR de *E. coli*, envolvida na redução do aminoácido sulfóxido de metionina [free Met-(R)-O] (Lin et al., 2007). No entanto, a

grande maioria das proteínas contendo domínios GAF ainda não foi estudada em detalhes, de modo que as funções e os potenciais ligantes dos domínios GAF são, em geral, pouco compreendidos (Heikaus et al., 2009).

A percepção de sinais ou a ligação de pequenas moléculas pelos domínios GAF estão algumas vezes associados com a ativação ou inativação da atividade enzimática ou efetora de domínios adjacentes (Zoraghi et al., 2004). Em mamíferos, os domínios GAF são encontrados principalmente em fosfodiesterases de nucleotídeos cíclicos (PDEs), que são enzimas envolvidas no controle dos níveis celulares dos segundos mensageiros cGMP e cAMP (Bender & Beavo, 2006). A ligação alostérica do substrato cGMP pelo domínio GAF da fosfodiesterase PDE2, por exemplo, provoca um aumento de cerca de 10 vezes na atividade de hidrólise de cGMP e/ou cAMP no sítio catalítico da enzima (Beavo et al., 1971, Moss et al., 1977, Martinez et al., 2002b, Jager et al., 2010). Outros ligantes de domínios GAF, até o momento, caracterizados incluem: cromóforos, como tetrapirrólicos e fotopigmentos, encontrados em plantas e cianobactérias (Montgomery & Lagarias, 2002, Lamparter, 2004); grupos heme, como nos sensores DosT e DosS de *Mycobacterium tuberculosis*, envolvidos na percepção de O₂ e potencial redox, respectivamente (Sardiwal et al., 2005, Podust et al., 2008, Cho et al., 2009, Green et al., 2009); óxido nítrico (NO), como no regulador transcricional NorR de *E. coli* (Gardner et al., 2003, D'Autreaux et al., 2005, Outten & Theil, 2009); compostos orgânicos, como formato e 2-oxoglutarato, monitorados pelos reguladores transcricionais FhlA de *E. coli* (Maupin & Shanmugam, 1990, Self et al., 2001) e NifA de *Azotobacter vinelii* (Little & Dixon, 2003, Martinez-Argudo et al., 2004), respectivamente; cAMP e íons Na²⁺, como nas adenilato ciclases CyaB1 e CyaB2 de cianobactérias (Martinez et al., 2005, Bruder et al., 2005, Cann, 2007b, Cann, 2007a).

Além do papel sensorial, os domínios GAF participam também em interações proteína-proteína que possibilitam, por exemplo, a formação de homo- ou heterodímeros pelas PDEs de nucleotídeos cíclicos (Martinez et al., 2002b, Muradov et al., 2003). Com apenas uma exceção, todas as PDEs de nucleotídeos cíclicos de mamíferos formam dímeros. Acredita-se que a dimerização possa ser importante para a regulação, estabilidade e localização subcelular dessas enzimas (Zoraghi et al., 2004).

Assim como os domínios GAF, os domínios PAS são frequentemente encontrados em proteínas de sinalização, onde também estão envolvidos na ligação de pequenas moléculas e/ou em interações proteína-proteína (Ponting & Aravind, 1997, Taylor & Zhulin, 1999, Moglich et al., 2009). O domínio PAS foi observado pela primeira vez em estudos por comparação de sequência entre as proteínas: **P**ER (*period clock protein*) de *Drosophila*, **A**RNT (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) de vertebrados, e **S**IM (*single-minded protein*) de *Drosophila* (Huang et al., 1993). Atualmente, cerca de 33000 domínios PAS são encontrados nos bancos de dados de sequências não redundantes de proteínas. Oitenta e sete por cento dos domínios PAS preditos são codificados pelos genomas procarióticos, e podem aparecer em uma, duas ou até várias cópias dentro de uma mesma proteína (Henry & Crosson, 2011).

Durante o curso da evolução, os domínios PAS foram selecionados para se ligarem a uma grande variedade de cofatores e/ou pequenas moléculas (Henry & Crosson, 2011). A detecção pelos domínios PAS de sinais como gases, luz visível ou potencial redox, quase sempre, dependem de cofatores como grupos heme (Gong et al., 1998, Delgado-Nixon et al., 2000, Rao et al., 2011, Shimizu, 2013), centros de ferro-enxofre (Fu et al., 1994, Agar et al., 2000), cromóforos (Baca et al., 1994, Borgstahl et al., 1995, Anderson et al., 2004), grupos FAD (flavina-adenina dinucleótido) (Hill et al.,

1996, Bibikov et al., 1997, Bibikov et al., 2000, Key et al., 2007, Qi et al., 2009, Ukaegbu & Rosenzweig, 2009) ou FMN (flavina mononucleotídeo) (Christie et al., 1998, Salomon et al., 2000, Crosson & Moffat, 2001). Por exemplo, o domínio PAS das proteínas AxPDEA1 ou EcDos contém um grupo heme que regula a atividade de PDE de c-di-GMP do domínio EAL por meio da ligação reversível à molécula de O₂ (Chang et al., 2001, Tanaka et al., 2007).

Por outro lado, a presença de cofatores é dispensável para a detecção pelos domínios PAS de outros sinais, tais como compostos xenobióticos (Swanson & Bradfield, 1993, Wilson & Safe, 1998), cátions divalentes (Garcia Vescovi et al., 1996, Cho et al., 2006, Cheung et al., 2008), ácidos carboxílicos (Pappalardo et al., 2003, Reinelt et al., 2003, Zhou et al., 2008) e ácidos graxos (King-Scott et al., 2011, An et al., 2014).

Apesar da grande diversidade de moléculas já caracterizadas como ligantes de domínios PAS, considera-se que a capacidade completa de reconhecimento de sinais por estes domínios ainda é pouco conhecida (Moglich et al., 2009, Henry & Crosson, 2011). Além disso, é provável que muitos domínios PAS exerçam seus papéis biológicos sem a necessidade de ligantes (Moglich et al., 2009). No sistema de dois componentes ArcA/ArcB de *E. coli*, por exemplo, a formação de duas pontes dissulfeto intermolecular entre os domínios PAS da proteína sensora ArcB é utilizada para a percepção do estado redox intracelular e inibir a ativação do regulador transcricional ArcA, envolvido na expressão de genes do metabolismo respiratório ou fermentativo (Malpica et al., 2004, Bekker et al., 2010). Os domínios PAS constituem também importantes mediadores de interações proteína-proteína, possibilitando a formação de dímeros, trímeros ou oligômeros por muitas proteínas (Huang et al., 1993, Pongratz et

al., 1998, Neiditch et al., 2006, Lee et al., 2008a, Yamada et al., 2009). Como os monômeros de domínios PAS podem se associar utilizando uma grande diversidade de orientações (Ayers & Moffat, 2008, Ma et al., 2008, Nakasako et al., 2008), Moglich et al. (2009) propuseram que uma função mais geral para estes domínios seria a modulação da afinidade, tanto entre proteínas idênticas (homo-oligomerização), quanto entre proteínas diferentes (hetero-oligomerização). Para o subgrupo de domínios PAS que atuam como sensores, a modulação da afinidade se tornaria dependente de um sinal (Gilles-Gonzalez & Gonzalez, 2004, Moglich et al., 2009). A oligomerização constitui um importante componente para o funcionamento de muitas proteínas sensoras e uma orientação apropriada entre os monômeros também pode ser necessária para um correto funcionamento e/ou regulação de seus domínios efetores (Moglich & Moffat, 2007, Ayers & Moffat, 2008, Moglich et al., 2009, Cheung & Hendrickson, 2010, Moglich et al., 2010, Giardina et al., 2013, Heintz et al., 2014).

Os estudos bioquímicos e funcionais têm revelado importantes características do mecanismo de controle da atividade de DGC por meio da interação entre domínios REC e GGDEF (Chan et al., 2004, Ryjenkov et al., 2005, Christen et al., 2006, Paul et al., 2007, Wassmann et al., 2007, De et al., 2008, De et al., 2009). Embora estejam disponíveis na literatura diversos estudos de caracterização de domínios GAF e PAS, individualmente ou em combinação com outros domínios, ainda se têm poucas informações a respeito de como esses domínios interagem e regulam a atividade de domínios GGDEF. Estudos estruturais com a proteína PelD, de *P. aeruginosa*, indicam que resíduos de aminoácidos do domínio GAF podem ser utilizados como sítio inibitório secundário para estabilizar a ligação de c-di-GMP e, possivelmente, promover a inibição alostérica de domínios GGDEF ativos (Whitney et al., 2012). Foi demonstrado também

que o domínio PAS de AxDGC2 de *G. xylinum* se liga a um grupo FAD para monitorar o estado redox celular, e com isso, controlar a atividade de DGC do domínio GGDEF adjacente (Qi et al., 2009). Análises de sequências abrangendo 867 genomas procarióticos identificaram que, de 9443 proteínas encontradas contendo um domínio GGDEF, 27% e 8.5% possuem também domínios PAS e GAF, respectivamente (Seshasayee et al., 2010). Das 31 proteínas contendo domínios GGDEF codificadas pelo genoma de *Xac*, 13 possuem também domínios PAS e/ou GAF (Figura 9). O grande número de proteínas contendo domínios PAS/GAF e GGDEF codificadas pelo genoma de *Xac* e de outras bactérias sugere que este mecanismo de controle é de extrema relevância fisiológica. Estudos bioquímicos e funcionais com proteínas de *Xac* apresentando domínios GGDEF diretamente ligados a domínios GAF e/ou PAS poderão ajudar a entender melhor o papel destes domínios na rede de sinalização por c-di-GMP e, conseqüentemente, na regulação do comportamento e da patogenicidade bacteriana.

Figura 9 – Arquiteturas das proteínas de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xac*) contendo domínios GGDEF associados a domínios PAS e/ou GAF. Figura adaptada de Andrade et al. (2006). As proteínas XAC2812, XAC1993, XAC1345 e XAC1488 são preditas possuírem também domínios transmembrana (TM) (Andrade et al., 2006).

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

Realizar estudos cinéticos, bioquímicos e funcionais com proteínas contendo, além do domínio GGDEF, domínios GAF e PAS, para melhor entender a relevância das interações entre estes domínios na sinalização por c-di-GMP em *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xac*).

Objetivos específicos:

- Clonar, expressar, purificar e realizar tentativas de cristalização de proteínas de *Xac* contendo um domínio GGDEF associado a domínios PAS e/ou GAF;
- Caracterizar *in vivo* e *in vitro* a atividade de diguanilato ciclase (DGC) de XAC0610, contendo um domínio GGDEF, um domínio GAF e quatro domínios PAS;
- Verificar a importância dos domínios GAF e PAS para a atividade de DGC de XAC0610;
- Identificar o estado oligomérico e caracterizar a cinética e regulação enzimática de XAC0610;
- Entender o papel e o modo de atuação na sinalização por c-di-GMP da proteína XAC2446, contendo um domínio GGDEF degenerado associado a um domínio GAF;
- Obter linhagens mutantes de *Xac* com inativação do gene *xac0610* ou *xac2446*;
- Analisar fenotipicamente os mutantes de *Xac* por meio de ensaios de motilidade, formação de biofilme, produção de fatores de virulência e patogenicidade no hospedeiro;
- Realizar estudos de interação proteína-proteína por duplo híbrido em levedura com as proteínas XAC0610 ou XAC2446.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Linhagens bacterianas e condições gerais de cultivo

A bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xanthomonas axonopodis* pv *citri* strain 306; *Xac*) (da Silva et al., 2002) foi utilizada como linhagem selvagem e para a construção de linhagens mutantes. As linhagens de *Xac* (Tabela 3) foram rotineiramente cultivadas a 30 °C em TYE-água (10 g/L triptona, 5 g/L extrato de levedura, 8 g/L NaCl, e 15 g/L água) ou em meio 2xTY (16 g/L triptona, 10 g/L extrato de levedura, e 5 g/L NaCl, pH 7,0) com agitação de 200 rpm.

Para o preparo de células de *Xac* competentes foram utilizadas culturas crescidas a 28°C, em 50 mL de meio CIRCLEGROW (40 g/L, Qbiogene), com agitação constante de 180 rpm durante 12-14 hs, até atingir uma DO_{600nm} de 0,5. Após o crescimento, as células foram centrifugadas e lavadas três vezes com água destilada estéril (5600 g / 15 min / 4°C). Após a última lavagem as células foram ressuspensas em 1 mL de glicerol 10%, aliqüotadas e armazenadas a -80 °C.

Linhagens de *Escherichia coli* (Tabela 3) foram rotineiramente crescidas a 37 °C em meio TYE-água ou 2xTY. Células quimicamente competentes de *E. coli* foram preparadas de acordo com Hanahan (1983).

Tanto para *Xac*, quanto para *E.coli*, antibióticos foram adicionados quando necessário nas seguintes concentrações: 100 µg/mL ampicilina, 50 µg/mL kanamicina, 100 µg/mL cloranfenicol, 100 µg/mL estreptomicina, 100 µg/mL spectinomicina e 10 µg/mL gentamicina.

Tabela 3 – Linhagens bacterianas utilizadas neste estudo.

Linhagens	Características relevantes	Referência
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	F $^{-}$ Φ 80d/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR</i> 17(<i>r_K⁻, m_K⁺</i>) <i>phoA supE</i> 44 <i>thi-1 gyrA</i> 96 <i>relA</i> 1 λ^{-}	Invitrogen
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA</i> 96 <i>thi-1 hsdR</i> 17(<i>r_K⁻, m_K⁺</i>) <i>supE</i> 44 <i>relA</i> 1 $^{-}$ [F' <i>proAB lacI^q Z</i> Δ M15 Tn10(Tet R)]	Stratagene
KC8	<i>hsdR leuB</i> 600 <i>trpC</i> 9830 <i>pyr::Tn5 hisB</i> 463 <i>lacDeltaX</i> 74 <i>strA galU galK</i>	Stratagene
BL21(DE3)	F $^{-}$ <i>dcm ompT hsdS</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) <i>gal</i> λ (DE3)	Novagen
BL21(DE3) Star	F $^{-}$ <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) <i>gal dcm rne</i> 131 (DE3)	Novagen
BL21(DE3)RP	F $^{-}$ <i>ompT hsdS</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) <i>dcm⁺ Tet^R gal</i> λ (DE3) <i>endA Hte</i> [<i>argU proLCam^R</i>]	Stratagene
BL21(DE3)RIL	F $^{-}$ <i>ompT hsdS</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) <i>dcm⁺ Tet^R gal</i> λ (DE3) <i>endA Hte</i> [<i>argU ileYleuW Cam^R</i>]	Stratagene
BL21(DE3) pLysS	F $^{-}$ <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysS, Cam R	Novagen
<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>		
Xac str. 306	Linhagem selvagem (Wt), Ap R	da Silva et al. (2002)
Xac Δ 0610	Xac str. 306 com o gene <i>xac0610</i> inativado, Ap R	Este trabalho
Xac Δ 0610 + XAC0610	Xac Δ 0610 complementada com pUFR0610, Gm R e Ap R	Este trabalho
Xac Δ 0610 + GAF_PAS(A-D)	Xac Δ 0610 complementada com pUFR0610_GAF_PAS(A-D), Gm R e Ap R	Este trabalho
Xac Δ 0610 + GGDEF	Xac Δ 0610 complementada com pUFR0610_GGDEF, Gm R e Ap R	Este trabalho
Xac Δ 0610 + D797A/E798A	Xac Δ 0610 complementada com pUFR0610_D797A/E798A, Gm R e Ap R	Este trabalho
XacWt + XAC2810	Xac str.306 contendo o vetor pBRA2810, Spc R e Ap R	Andrade (2011)
XacWt + XAC2446	Xac str.306 contendo o vetor pBRA2446, Spc R e Ap R	Este trabalho
Xac Δ FliC	Xac str.306 com o gene <i>FliC</i> (<i>xac1975</i>) inativado, Ap R	Andrade (2011)
Xac Δ 1185	Xac str.306 com o gene <i>xac1185</i> inativado, Ap R	Andrade (2011)
Xac Δ rpfG	Xac str.306 com o gene <i>rpfG</i> (<i>xac1877</i>) inativado, Ap R	Andrade (2011)

Tabela 3 – Continuação...

Linhagens	Características relevantes	Referência
<i>Xac</i> Δ2446	<i>Xac</i> str.306 com o gene <i>xac2446</i> inativado, Ap ^R	Este trabalho
<i>Xac</i> Δ2446 + XAC2446	<i>Xac</i> Δ2446 complementada com pBRA2446, Spc ^R e Ap ^R	Este trabalho
<i>Xac</i> Δ2446 + XAC1185	<i>Xac</i> Δ2446 contendo o vetor pBRA1185, Spc ^R e Ap ^R	Este trabalho

Tabela 4 – Oligonucleotídeos utilizados neste estudo.

Oligonucleotídeo	Sequência 5' – 3'	Propósito
3272-NdeI Fwd	CTCAAATCATATGGCTGGGCTAGAAGACACCG	Amplificação de <i>xac3272</i> a partir do aa. 12
3272-EcoRI Rev	GGACGAATTCTAAGGATGACTGGTATTGCC	Amplificação de <i>xac3272</i> até o aa. 307
2810-NheI Fwd	GATTTGCTAGCATGGTGGATTCGCCGCGCG	Amplificação de <i>xac2810</i> a partir do aa. 23
2810-BamHI Rev	GTCCGGATCCTACTCCAGCGCAACCACC	Amplificação de <i>xac2810</i> até o aa. 356
2446-NdeI Fwd	GACAAAATCATATGGACACCTCACCGGAGCCG	Amplificação de <i>xac2446</i> a partir do aa. 32
2446-BamHI Rev	GTAAGGATCCTCAGGCCCGCAGCTGC	Amplificação de <i>xac2446</i> até o aa. 346
4358-GAF-NdeI Fwd	GAATTAATCATATGGACACCGCCGCGGAGCCG	Amplificação de <i>xac4358</i> a partir do aa. 21
4358-BamHI Rev	CAAAGGATCCCGGTCAGCGCTGGTCG	Amplificação de <i>xac4358</i> até o aa. 575
4358-PAS2-NdeI Fwd	GAATTATACATATGAGCGGCCTGATCTGCACCCACG	Amplificação de <i>xac4358</i> a partir do aa. 316
0610-GAF-NdeI Fwd	GAATTAATCATATGGACGACGCCTTGCGCG	Amplificação de <i>xac0610</i> a partir do aa. 35
0610-HindIII Rev	GTTTAAGCTTCTACGATCGAGGCGCG	Amplificação de <i>xac0610</i> até o aa. 880
0610-PAS4-NdeI Fwd	CAATTAATCATATGTCCACCCTGGTCGCCCA	Amplificação de <i>xac0610</i> a partir do aa. 604
1345-MRE-NheI Fwd	GTTTTGCTAGCTTGATGCGCGAATTGC	Amplificação de <i>xac1345</i> a partir do aa. 205
1345-HindIII Rev	CATAAAGCTTTCAGTCCGATTGTCCGTGC	Amplificação de <i>xac1345</i> até o aa. 569
1345-CIS-NdeI Fwd	GAATTAATCATATGTCCATCAGTGCCGAAGAAGCG	Amplificação de <i>xac1345</i> a partir do aa. 253
1488-CRD-NdeI Fwd	GAATTAAACATATGTCCCGCGATGCCGAAGAAGC	Amplificação de <i>xac1488</i> a partir do aa. 252

Tabela 4 – Continuação...

Oligonucleotídeo	Sequência 5' – 3'	Propósito
1488-SRE-NdeI Fwd	GAATTAAACATATGTCGCGCGAGCTGGAACGGC	Amplificação de <i>xac1488</i> a partir do aa. 205
1488-HindIII Rev	GATAAAGCTTTTCAGGCCACGGATGCAAG	Amplificação de <i>xac1488</i> até o aa. 566
Fwd717_GGDEF_0610_NdeI	GTTAATTACATATGACCCGCGATGCCTTGAC	Amplificação de <i>xac0610</i> a partir do aa. 717
Rev872_GGDEF_0610_XhoI	CTATACTCGAGTTACTGCCGCGCGCGCTTG	Amplificação de <i>xac0610</i> até o aa. 872
Fwd209_1PAS_0610_NdeI	CTTAATTACATATGGATGGGGTGGTGGCCTGCG	Amplificação de <i>xac0610</i> a partir do aa. 209
Rev314_1PAS_0610-HindIII	GATTGAAGCTTTTAGGTGATGTCGTGCATGAC	Amplificação de <i>xac0610</i> até o aa. 316
Rev701_4PAS_0610-HindIII	CTCATAAGCTTCTAATCGTGCGCCATCAGGAAAA	Amplificação de <i>xac0610</i> até o aa. 701
Δ0610_upFwd_HindIII	CTTTGAAGCTTGTTTGCCGGACGGGATATCG	Amplificação de 1 kb “ <i>upstream</i> ” a <i>xac0610</i>
Δ0610_upRev_XhoI	GCGTACTCGAGGTCAGAATAGTTGCCCCAGG	Amplificação de 1 kb “ <i>upstream</i> ” a <i>xac0610</i>
Δ0610_downFwd_XhoI	GATATACTCGAGCGCGCGCGGCAGCCAGATG	Amplificação de 1 kb “ <i>dowstream</i> ” a <i>xac0610</i>
Δ0610_downRev_EcoRI	GACATGAATTCCCGAAGTGCGCGCCCTGGC	Amplificação de 1 kb “ <i>dowstream</i> ” a <i>xac0610</i>
0610_XbaI_Fw	CATTTATCTAGAGCTCGTCGCCTCGCCGTTAC	Amplificação de <i>xac0610</i> a partir do aa. 2
0610_XbaI_Rev	CATTATTCTAGACTACGATCGAGGCGCGTGC	Amplificação de <i>xac0610</i> até o aa. 880
0610_NcoI_Fw	CTATATGCCATGGTCGCCTCGCCGTTAC	Amplificação de <i>xac0610</i> a partir do aa. 2
0610_XmaI_Rev	TATTTACCCGGGCTACGATCGAGGCGCG	Amplificação de <i>xac0610</i> até o aa. 880
0610_up(977nt)XbaI_Fwd	CATTGCTTCTAGAGTTTGCCGGACGGGATATCG	Amplificação de 1 kb “ <i>upstream</i> ” a <i>xac0610</i>
0610_NdeI(aa23)Rev	GGACGGTCATATGGTGATCGACAGGCGG	Amplificação de <i>xac0610</i> até o aa. 23
0610_NdeI(aa50)Fwd	GTACAATCATATGGACACCGAGGCCGAAGTC	Amplificação de <i>xac0610</i> a partir do aa. 50
0610_NdeI(aa315)Fwd	GAAGTACCATATGATCAGCCAGCTCAAGGATG	Amplificação de <i>xac0610</i> a partir do aa. 315
0610_HindIII(aa339)Rev	CATTCTTAAGCTTCTACGAGGCATCCACCAAGTG	Amplificação de <i>xac0610</i> até o aa. 339
0610_NdeI(aa339)Fwd	GTTCAATCATATGTCGAGGACGTGGCCATC	Amplificação de <i>xac0610</i> a partir do aa. 339
0610_NdeI(aa453)Fwd	GATCTATCATATGACCGCCGAATTGCAGG	Amplificação de <i>xac0610</i> a partir do aa. 453

Tabela 4 – Continuação...

Oligonucleotídeo	Sequência 5' – 3'	Propósito
0610_NdeI(aa577)Fwd	GATCTATCATATGCAGGACGTTACCGAGCG	Amplificação de <i>xac0610</i> a partir do aa. 577
0610_NdeI(aa701)Fwd	GAAC TACCATATGGATGTCACTGCGCACAAGAC	Amplificação de <i>xac0610</i> a partir do aa. 701
0610_NdeI(aa166)Fwd	GAAC TACCATATGGACGAGAACCGCAAGCAGGC	Amplificação de <i>xac0610</i> a partir do aa. 166
2446_NcoI_Fw	CTATATACCATGGTGCCAGGCGGCGTCAACG	Amplificação de <i>xac2446</i> a partir do aa. 2
2446_XhoI_Rev	CATCTTTCTCGAGTCAGGCCCGCAGCTGC	Amplificação de <i>xac2446</i> até o aa. 346
0610_D797A_E798A_Fw	CGCCTGGCCGGCGCCGCATTCGTCTGTGTTG	Mutação sítio dirigida de <i>xac0610</i>
0610_D797A_E798A_Rv	CAACACGACGAATGCGGCGCCGGCCAGGCG	Mutação sítio dirigida de <i>xac0610</i>
0610_NcoI(aa452)Fwd	CTATATCCCATGGTCACCGCCGAATTGCAGG	Amplificação de <i>xac0610</i> a partir do aa. 452
0610_XmaI (aa476)Rev	CTTTATCCCGGGCTACGCGTTTTCGAATGCAC	Amplificação de <i>xac0610</i> até o aa. 476
0610_NcoI(aa698)Fwd	CTATTTCCCATGGCGCACGATGTCACTG	Amplificação de <i>xac0610</i> a partir do aa. 698
0610_XmaI (aa722)Rev	CATTATCCCGGGCTAGGTCAAGGCATCGCG	Amplificação de <i>xac0610</i> até o aa. 722
0610_K759A_Fwd	CTGGATCTGGACGGCTTCGCGCGCATCAATGATGTCTA	Mutação sítio dirigida de <i>xac0610</i>
0610_K759A_Rev	TAGACATCATTGATGCGCGCGAAGCCGTCCAGATCCAG	Mutação sítio dirigida de <i>xac0610</i>
Δ2446_upFwd_HindIII	CTTTGAAGCTTCGGACGATTGGCAGCAGGTG	Amplificação de 1 kb “upstream” a <i>xac2446</i>
Δ2446_upRev_XhoI	GTTTACTCGAGATCTTCGTTGGCCGGCAGG	Amplificação de 1 kb “upstream” a <i>xac2446</i>
Δ2446_downFwd_XhoI	GTTTACTCGAGTTCGACGGGTGGCAGCTGC	Amplificação de 1 kb “downstream” a <i>xac2446</i>
Δ2446_downRev_EcoRI	GACCAGAATTCGATCGTGCCAGCATCAAG	Amplificação de 1 kb “downstream” a <i>xac2446</i>
pOBD_Fwd	GAGACAGCATAGAATAAGTGCGAC	Sequenciamento de genes ligados em pOBD
pOAD_Fwd	TGGACGGACCAAACTGCGTAT	Sequenciamento de genes ligados em pOAD
T7 promoter primer	TAATACGACTCACTATAGGG	Sequenciamento de genes ligados em pET28a
T7 terminator primer	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	Sequenciamento de genes ligados em pET28a

3.2. Desenho dos oligonucleotídeos e amplificação de genes por PCR

Com base no genoma anotado de *Xac* (da Silva et al., 2002) depositado no banco de dados do KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>), os oligonucleotídeos (Tabela 4) que permitem a amplificação dos genes de interesse foram desenhados utilizando o programa Gene Runner (Hastings Software, Inc.). Quando necessário, sítios de reconhecimento para enzimas de restrição foram adicionados na extremidade 5' dos oligonucleotídeos.

Para o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nos experimentos de clonagem de genes em vetores de expressão de proteínas (seção 3.6.1), foram feitas análises prévias de predição de domínios conservados utilizando o banco de dados do Pfam (Punta et al., 2012), alinhamento da seqüência de aminoácidos dos domínios das proteínas de *Xac* utilizando o programa ClustalW2 (Larkin et al., 2007), além de predições de estruturas secundárias por meio do servidor Jpred v3 (Cole et al., 2008) e também análises da presença de domínios transmembrana por meio do servidor TMHMM v.2.0 (Krogh et al., 2001).

Os genes de *Xac* foram amplificados por PCR utilizando um termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Uma reação típica de PCR continha 300 ng de DNA genômico de *Xac*, 0,5 μ M de cada oligonucleotídeo iniciador, 250 μ M de cada dNTP (Fermentas), 3% DMSO, 1X Phusion GC buffer e 1U de Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific), em um volume final de 50 μ L. As reações foram inicialmente desnaturadas a 98 °C por 30 segundos, e então submetidas a ciclos de desnaturação a 98 °C por 10 segundos, hibridização a 60-65 °C por 30 segundos, e extensão a 72 °C por 30 segundos/kb. Ao final de 30-35 ciclos foi adicionado uma etapa final de extensão a 72 °C por 10 minutos. O produto da PCR foi purificado utilizando o

GeneJET PCR Purification Kit (Fermentas) ou GeneJET Gel Extraction Kit (Fermentas) após checagem por eletroforese em gel de agarose 1% (Sambrook & Russell, 2001).

3.3. Clonagem e mutação sítio dirigida de *xac0610*

3.3.1. Clonagem de *xac0610* com promotor nativo

Os oligonucleotídeos iniciadores *Δ0610_upFwd_HindIII* e *0610-HindIII Rev* (Tabela 4) foram utilizados para amplificar um fragmento de DNA de 3,62 kb contendo a ORF anotada do gene *xac0610* (2,643 kb) mais 977 pb de sua região flanqueadora 5'. Após a amplificação da PCR, o fragmento de DNA de 3,62 kb foi purificado e submetido a uma etapa de adenilação de suas extremidades 3'. A reação de adenilação foi realizada em um volume final de 10 µL contendo: 6 µL do produto da PCR, 0,2 mM de dATP, 2 mM de MgCl₂, 1X Taq Buffer e 5U de *Taq* DNA Polymerase (Fermentas). A reação foi incubada a 70 °C por 30 minutos.

O produto da PCR adenilado foi submetido a uma reação de ligação ao vetor pGEM-T (Promega). A reação de ligação foi realizada em um volume final de 20 µL contendo: 5 µL do produto da PCR adenilado, 50 ng de vetor, 1X Rapid Ligation Buffer e 3U de T4 DNA Ligase (Promega). A reação foi incubada a 16 °C por 12-16 h.

2-3 µL da reação de ligação foram utilizados para transformar células competentes de *E. coli* DH5α pelo método de choque térmico (Sambrook & Russell, 2001). As células transformadas foram selecionadas em meio TYE-ágar contendo ampicilina (100 µg/mL), IPTG (0,5 mM) e X-Gal (80 µg/mL). Algumas colônias brancas obtidas foram inoculadas, individualmente, em 4 mL de meio 2xTY contendo ampicilina (100 µg/mL) e incubadas a 37 °C com agitação de 200 rpm por 12-16 h. A extração de

DNA plasmidial foi realizada utilizando o GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas), seguindo as orientações do fabricante. O vetor positivo pGEM-0610 (Tabela 5) foi selecionado após análises do perfil de restrição do DNA plasmidial utilizando a enzima *HindIII* e, posteriormente, sequenciamento de DNA (seção 3.4).

3.3.2. Mutação sítio dirigida

A substituição K759A ou a mutação dupla D797A/E798A foram introduzidas no gene *xac0610*, ligado no vetor pGEM-0610 (Tabela 5), por meio de uma única etapa de PCR utilizando o QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) (Figura 10). Os oligonucleotídeos utilizados para produzir as mutações estão descritos na Tabela 4. As reações foram feitas em um volume final de 25 µL contendo 1X tampão de reação, 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 50 ng de DNA plasmidial, 0,5 µL de dNTP mix, 2,5 µL de QuikSolution, e 1,25 U de *PfuUltra* HF DNA polymerase. As reações foram inicialmente desnaturadas a 95 °C por 30 segundos, e então submetidas a ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, hibridização a 55 °C por 1 minuto, e extensão a 68 °C por 10 minutos. Ao final de 25 ciclos foi adicionada uma etapa final de extensão a 68 °C por 7 minutos.

Após as amplificações de DNA, 10 U da enzima de restrição *DpnI* foram adicionadas as reações e estas foram incubadas a 37 °C por 4 horas. 6 µL das reações de mutação sítio dirigida foram utilizadas para transformar células competentes de *E. coli* XL1-Blue pelo método de choque térmico (Sambrook & Russell, 2001). As células transformadas foram selecionadas em meio TYE-ágar contendo ampicilina (100 µg/mL). As colônias obtidas foram inoculadas, individualmente, em 4 mL de meio 2xTY contendo ampicilina (100 µg/mL) e incubadas a 37 °C com agitação de 200 rpm por 12-

16 horas. A extração de DNA plasmidial foi realizada utilizando o GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas), seguindo as orientações do fabricante. Os vetores pGEM-0610_K759A e pGEM-0610_D797A/E798A (Tabela 5), contendo as mutações sítio dirigidas no gene *xac0610*, foram selecionados após análises do perfil de restrição do DNA plasmidial utilizando a enzima de restrição *Hind*III e as mutações introduzidas foram confirmadas por sequenciamento de DNA (seção 3.4).

Figura 10 – Etapas do método de mutação sítio dirigida utilizando o kit QuickChange II XL (Stratagene).

Tabela 5 – Plasmídeos utilizados neste estudo.

Plasmídeo	Características relevantes	Referência
pGEM-T	Vetor de clonagem, Ap ^R	Promega
pGEM-0610	<i>xac0610</i> (aa. 1-880) + 1 kb promotor ligado em pGEM-T, Ap ^R	Este trabalho
pGEM-0610_K759A	pGEM-0610 contendo a mutação K759A, Ap ^R	Este trabalho
pGEM-0610_D797A/E798A	pGEM-0610 contendo as mutações D797A e E798A, Ap ^R	Este trabalho
pNPTS138	Kan ^R derivado de pLITMUS28 com <i>sacB</i> e oriT	Jenal & Fuchs (1998)
pNPTSΔ0610	Cassete de deleção de <i>xac0610</i> ligado em pNPTS138 _{HindIII/EcoRI} , <i>sacB</i> e Kan ^R	Este trabalho
pNPTSΔ2446	Cassete de deleção de <i>xac2446</i> ligado em pNPTS138 _{HindIII/EcoRI} , <i>sacB</i> e Kan ^R	Este trabalho
pBRA	Derivado do vetor pBAD24 contendo a origem de replicação BBR1, Spc ^R e Str ^R	Miriam Marroquin
pBRA2446	<i>xac2446</i> (aa. 2-346) ligado em pBRA _{NcoI/SalI} , Spc ^R e Str ^R	Este trabalho
pBRA2810	<i>xac2810</i> (aa. 1-356) ligado em pBRA _{NcoI/SalI} , Spc ^R e Str ^R	Andrade (2011)
pBRA1185	<i>xac1185</i> (aa. 1-212) ligado em pBRA _{NcoI/SalI} , Spc ^R e Str ^R	Andrade (2011)
pUFR047	IncW, Gm ^R , Ap ^R , Mob ⁺ , <i>mob</i> (P), <i>lacZα</i> ⁺ , Par ⁺	De Feyter et al. (1993)
pUFR0610	<i>xac0610</i> (aa. 1-880) + 1 kb promotor ligado em pUFR047 _{HindIII} , Gm ^R e Ap ^R	Este trabalho
pUFR0610_GAF_PAS(A-D)	<i>xac0610</i> (aa. 1-701) + 1 kb promotor ligado em pUFR047 _{HindIII} , Gm ^R e Ap ^R	Este trabalho
pUFR0610_GGDEF	<i>xac0610</i> (aa. 1-23 + 701-880) + 1 kb promotor ligado em pUFR047 _{HindIII} , Gm ^R e Ap ^R	Este trabalho
pUFR0610_D797A/E798A	<i>xac0610_D797A/E798A</i> (aa. 1-880) + 1 kb promotor ligado em pUFR047 _{HindIII} , Gm ^R e Ap ^R	Este trabalho
pProExHTb	Vetor de clonagem e expressão, Ap ^R	Invitrogen
p2446 _{His-1-346}	<i>xac2446</i> (aa. 1-346) ligado em pProExHTb _{NcoI/XhoI} , Ap ^R	Andrade (2011)
p2810 _{His-1-356}	<i>xac2810</i> (aa. 1-356) ligado em pProExHTb _{NcoI/XhoI} , Ap ^R	Andrade (2011)
pET3a	Vetor de clonagem e expressão, Ap ^R	Novagen
pET28a	Vetor de clonagem e expressão, Kan ^R	Novagen
p0610 _{His-35-880}	<i>xac0610</i> (aa. 35-880) ligado em pET28a _{NdeI/HindIII} , Kan ^R	Este trabalho
p0610_K759A _{His-35-880}	<i>xac0610_K759A</i> (aa. 35-880) ligado em pET28a _{NdeI/HindIII} , Kan ^R	Este trabalho

Tabela 5 – Continuação...

Plasmídeo	Características relevantes	Referência
p0610 _{His-701-880}	<i>xac0610</i> (aa. 701-880) ligado em pET28a _{Ndel/HindIII} , Kan ^R	Este trabalho
p0610_D797A/E798A _{His-35-880}	<i>xac0610_D797A/E798A</i> (aa. 35-880) ligado em pET28a _{Ndel/HindIII} , Kan ^R	Este trabalho
p0610 _{His-604-880}	<i>xac0610</i> (aa. 604-880) ligado em pET28a _{Ndel/HindIII} , Kan ^R	Este trabalho
p0610 _{His-35-316}	<i>xac0610</i> (aa. 35-316) ligado em pET28a _{Ndel/HindIII} , Kan ^R	Este trabalho
p0610 _{His-717-880}	<i>xac0610</i> (aa. 717-880) ligado em pET28a _{Ndel/HindIII} , Kan ^R	Este trabalho
p0610 _{His-604-701}	<i>xac0610</i> (aa. 604-701) ligado em pET28a _{Ndel/HindIII} , Kan ^R	Este trabalho
p0610 _{His-209-316}	<i>xac0610</i> (aa. 209-316) ligado em pET28a _{Ndel/HindIII} , Kan ^R	Este trabalho
p1345 _{His-253-569}	<i>xac1345</i> (aa. 253-569) ligado em pET28a _{Ndel/HindIII} , Kan ^R	Este trabalho
p1345 _{His-205-569}	<i>xac1345</i> (aa. 205-569) ligado em pET28a _{NheI/HindIII} , Kan ^R	Este trabalho
p1488 _{His-252-566}	<i>xac1488</i> (aa. 252-566) ligado em pET28a _{Ndel/HindIII} , Kan ^R	Este trabalho
p1488 _{His-205-566}	<i>xac1488</i> (aa. 205-566) ligado em pET28a _{Ndel/HindIII} , Kan ^R	Este trabalho
p2446 _{His-32-346}	<i>xac2446</i> (aa. 32-346) ligado em pET28a _{Ndel/BamHI} , Kan ^R	Este trabalho
p3272 _{His-12-307}	<i>xac3272</i> (aa. 12-307) ligado em pET28a _{Ndel/EcoRI} , Kan ^R	Este trabalho
p4358 _{His-21-575}	<i>xac4358</i> (aa. 21-575) ligado em pET28a _{Ndel/BamHI} , Kan ^R	Este trabalho
p4358 ₃₁₆₋₅₇₅	<i>xac4358</i> (aa. 316-575) ligado em pET3a _{Ndel/BamHI} , Ap ^R	Este trabalho
p1185 _{His⁺1-212}	<i>xac1185</i> (aa. 1-212) ligado em pProExHTb _{NcoI/XhoI} , Ap ^R	Andrade (2011)
p1185 ₁₋₂₁₂	<i>xac1185</i> (aa. 1-212) ligado em pET28a _{NcoI/XhoI} , Kan ^R	Andrade (2011)
pOBD2	Vetor para clonagem da isca em fusão ao DBD de Gal4, Ap ^R e TRP1	Uetz et al. (2000)
pOBD0610 ₂₋₈₈₀	<i>xac0610</i> (aa. 2-880) ligado em pOBD2 _{NcoI/XmaI} , Ap ^R e TRP1	Este trabalho
pOBD0610 ₂₋₄₇₆	<i>xac0610</i> (aa. 2-476) ligado em pOBD2 _{NcoI/XmaI} , Ap ^R e TRP1	Este trabalho
pOBD0610 ₄₅₂₋₇₂₂	<i>xac0610</i> (aa. 452-722) ligado em pOBD2 _{NcoI/XmaI} , Ap ^R e TRP1	Este trabalho
pOBD0610 ₆₉₈₋₈₈₀	<i>xac0610</i> (aa. 698-880) ligado em pOBD2 _{NcoI/XmaI} , Ap ^R e TRP1	Este trabalho
pOBD2446 ₂₋₃₄₆	<i>xac2446</i> (aa. 2-346) ligado em pOBD2 _{NcoI/SalI} , Ap ^R e TRP1	Este trabalho

3.4. Sequenciamento de DNA

Para o sequenciamento de DNA (Sanger et al., 1977, Prober et al., 1987) foi utilizado o reagente BigDye Terminator v3.0 (Applied Biosystems) (Rosenblum et al., 1997). As reações de sequenciamento de DNA foram preparadas em um volume final de 15 µL contendo: 100-200 ng de DNA plasmidial, 9,6 pmol de oligonucleotídeo iniciador (Tabela 4), 3 µL de tampão Save Money (200 mM Tris-HCl pH 9,0; 5 mM MgCl₂) e 2 µL de Big Dye Terminator. As reações foram inicialmente desnaturadas a 96 °C por 2 minutos, e então submetidas a 35 ciclos de desnaturação a 96 °C por 45 segundos, hibridização a 50 °C por 30 segundos, e extensão a 60 °C por 4 minutos.

Posteriormente, aos 15 µL da reação de sequenciamento foram adicionados 25 µL de solução de precipitação de DNA (37 µg/mL glicogênio e 110 mM acetato de sódio pH 5,2 em etanol). Após um banho de gelo de 15 minutos, as reações foram centrifugadas a 4000 rpm por 20 minutos, a temperatura ambiente, e o sobrenadante descartado. O DNA precipitado foi lavado com 50 µL de etanol 70%, ressuspendido em 10 µL de formamida Hi-Di e analisado em um sequenciador automático ABI 3700 (Applied Biosystems).

3.5. Análise de sequência e modelagem de proteínas

Inspeções de cromatogramas de sequenciamento de DNA foram feitas utilizando os programas Chromas Lite (Technelysium Pty Ltd) ou Sequencher (Gene Codes Corporation). Buscas por similaridade de sequências foram feitas utilizando as ferramentas de BLAST (Altschul et al., 1990) com o auxílio dos bancos de dados: GenBank (Benson et al., 2013), KEGG (Kanehisa & Goto, 2000), Pfam (Punta et al., 2012) e PDB (Berman et al., 2000). Alinhamento de sequências foram feitos utilizando o

programa ClustalW2 (Larkin et al., 2007) e analisados com o programa Jalview (Waterhouse et al., 2009). Análises de sequência de proteínas foram feitas utilizando as ferramentas do servidor ExPASy (Wilkins et al., 1999). Modelagens por homologia de sequência dos domínios proteicos foram feitas por meio do servidor Phyre v.0.2 (Kelley & Sternberg, 2009). Estruturas tridimensionais de proteínas foram visualizadas com o programa PyMOL (Schrodinger, 2010).

3.6. Expressão heteróloga e purificação de proteínas

3.6.1. Clonagem de genes em vetores de expressão de proteínas

As *orfs* dos genes de interesse foram amplificadas por PCR a partir do DNA genômico de *Xac*, utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos (Tabela 4). O produto da PCR foi digerido com enzimas de restrição (New England Biolabs), purificado e ligado no vetor de expressão de proteínas heterólogas digerido com as mesmas enzimas de restrição. As reações de ligação foram realizadas a 16 °C, durante 16h, em um volume final de 10 µL contendo: 7 µL do produto da PCR purificado, 1 µL de DNA vetorial (20-50 ng), 1 µL de tampão de reação 10X (New England Biolabs) e 1 µL da enzima T4 DNA ligase (New England Biolabs). Os vetores utilizados foram os plasmídeos da série pET (pET28a ou pET3a – Novagen) (Rosenberg et al., 1987).

As reações de ligação foram utilizadas para transformar células quimicamente competentes de *E. coli* DH5α (Sambrook & Russell, 2001). As células transformadas foram selecionadas em meio TYE-ágar contendo 50 µg/mL de kanamicina (pET28a) ou 100 µg/mL de ampicilina (pET3a). As colônias obtidas foram inoculadas,

individualmente, em meio líquido, contendo o antibiótico adequado, para realizar a extração de DNA plasmidial. Os vetores para a expressão das proteínas de interesse (Tabela 5) foram selecionados após análises do perfil de restrição do DNA plasmidial utilizando enzimas de restrição e também por sequenciamento de DNA.

3.6.2. Expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*

Os vetores para a expressão das proteínas de interesse (Tabela 5) foram utilizados para transformar células competentes de *E. coli* BL21(DE3) ou células derivadas desta linhagem (BL21(DE3)RP, BL21(DE3)RIL, BL21(DE3)Star e BL21(DE3)pLysS). As células transformadas foram selecionadas em meio TYE-ágar contendo os antibióticos adequados.

Experimentos de expressão em pequena escala foram realizados para avaliar o nível de expressão das proteínas recombinantes pelas diferentes linhagens de *E. coli* e a solubilidade destas proteínas em diferentes temperaturas de indução da expressão proteica. As células foram crescidas em 20 mL de meio 2xTY, suplementado com os antibióticos adequados, e após atingir uma DO_{600nm} de 0,6-0,8 a indução da expressão proteica foi realizada pela adição de 0,4 mM IPTG. As células foram lisadas por sonicação e os lisados foram centrifugados para separar a fração solúvel e insolúvel de proteínas. O nível de expressão das proteínas recombinantes foi avaliado por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE).

Após determinar as melhores condições de temperatura e célula hospedeira, a indução da expressão de proteínas recombinantes solúveis (Tabela 6) foi realizada em larga escala, utilizando 500 mL de meio 2xTY, em frasco Erlenmeyer de 2L, sob agitação de 200 rpm.

3.6.3. Purificação de proteínas recombinantes

Após a indução da expressão das proteínas recombinantes (XAC0610_{HIS-35-880}, XAC0610_K759A_{HIS-35-880}, XAC0610_{HIS-604-880}, XAC0610_{HIS-35-316}, XAC0610_{HIS-701-880}, XAC1488_{HIS-205-566} e XAC2446_{HIS-1-346}), as células de *E. coli* foram centrifugadas a 4200 rpm, 4 °C, durante 10 minutos e ressuspensas em 30 mL de tampão de lise (glicerol 10%; 50 mM Tris-HCl pH 8; 300 mM NaCl; 1 mM EDTA; 50 mM arginina, 50 mM glutamato; 0,5% Inibidor de protease P 8465 - Sigma). A lise das células foi realizada por sonicação (VC 750 - SONICS), com pulsos de 15 segundos a 40% de amplitude e intervalos entre os pulsos de 1 minuto, com a amostra mantida em banho de gelo. O lisado foi centrifugado a 16000 rpm, 4°C, por 45 min e o sobrenadante foi aplicado numa coluna de 5 mL HiTrap HP (GE Healthcare) carregada com Ni²⁺, previamente equilibrada com tampão A (Tabela 6). A coluna foi lavada com 20 volumes de coluna de tampão A, e as proteínas foram eluídas em um gradiente linear de Imidazol (Tabela 6).

Após a purificação por afinidade, as proteínas recombinantes foram submetidas a mais uma etapa de purificação (Tabela 6) em uma coluna de gel filtração, Superdex75 ou Superdex200 (GE Healthcare). As frações contendo a proteína recombinante foram reunidas e concentradas utilizando um dispositivo Amicon (cutoff de 10 kDa; Millipore). As proteínas foram estocada a -20 °C após adição de 50% glicerol.

Em todas as etapas cromatográficas a eluição das proteínas recombinantes foi monitorada a 280 nm, utilizando um sistema ÄKTApurifier (Amersham Biosciences). Alíquotas das frações cromatográficas também foram misturadas com tampão de amostra (1X: 10% glicerol, 2% SDS, 50 Mm Tris-HCl pH 6,8, 0,1% azul de bromofenol, 5% β-mercaptoetanol), fervidas em banho maria por 5 min e analisadas por SDS-PAGE, utilizando um sistema Mini-PROTEAN (Bio-Rad).

Tabela 6 – Etapas da purificação das proteínas recombinantes.

Proteína	Indução	Cromatografia de afinidade	Cromatografia de exclusão molecular
XAC0610 _{HIS-35-880}	<i>E. coli</i> BL21(DE3) com vetor p0610 _{HIS-35-880} . Crescimento a 25 °C até DO _{600nm} de 0,8 e indução por 0,4 mM IPTG a 18 °C durante 12-14 hs.	Coluna de 5 mL HiTrap HP (GE Healthcare). Tampão A: 50 mM Tris-HCl pH 8; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol. Tampão B: 50 mM Tris-HCl pH 8; 300 mM NaCl; 500 mM Imidazol. Eluição: gradiente linear de 20 a 500 mM de Imidazol utilizando 20 volumes de coluna.	Coluna de 320 mL Superdex200 (GE Healthcare). Tampão: 20 mM Tris-HCl pH 8; 100 mM NaCl; 2 mM β-mercaptoetanol.
XAC0610_K759A _{HIS-35-880}	<i>E. coli</i> BL21(DE3) com vetor p0610_K759A _{HIS-35-880} . Crescimento a 25 °C até DO _{600nm} de 0,8 e indução por 0,4 mM IPTG a 18 °C durante 12-14 hs.	Coluna de 5 mL HiTrap HP (GE Healthcare). Tampão A: 50 mM Tris-HCl pH 8; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol. Tampão B: 50 mM Tris-HCl pH 8; 300 mM NaCl; 500 mM Imidazol. Eluição: gradiente linear de 20 a 500 mM de Imidazol utilizando 20 volumes de coluna.	Coluna de 320 mL Superdex200 (GE Healthcare). Tampão: 20 mM Tris-HCl pH 8; 100 mM NaCl; 2 mM β-mercaptoetanol.
XAC0610 _{HIS-604-880}	<i>E. coli</i> BL21(DE3)Star com vetor p0610 _{HIS-604-880} . Crescimento a 18 °C até DO _{600nm} de 0,8 e indução por 0,25 mM IPTG a 18 °C durante 8 hs.	Coluna de 5 mL HiTrap HP (GE Healthcare). Tampão A: glicerol 10%; 50 mM Tris-HCl pH 8; 300 mM NaCl; 30 mM imidazol. Tampão B: glicerol 10%; 50 mM Tris-HCl pH 8; 300 mM NaCl; 500 mM imidazol. Eluição: gradiente linear de 30 a 500 mM de Imidazol utilizando 15 volumes de coluna.	Coluna de 320 mL Superdex75 (GE Healthcare). Tampão: 5 mM Tris-HCl pH 8; 10 mM NaCl; 2 mM β-mercaptoetanol, glicerol 10%.
XAC0610 _{HIS-35-316}	<i>E. coli</i> BL21(DE3)Star com vetor p0610 _{HIS-35-316} . Crescimento a 25 °C até DO _{600nm} de 0,8 e indução por 0,4 mM IPTG a 18 °C durante 12-14 hs.	Coluna de 5 mL HiTrap HP (GE Healthcare). Tampão A: 50 mM Tris-HCl pH 8; 300 mM NaCl; 30 mM Imidazol. Tampão B: 50 mM Tris-HCl pH 8; 300 mM NaCl; 500 mM Imidazol. Eluição: gradiente linear de 30 a 500 mM de Imidazol utilizando 15 volumes de coluna.	Coluna de 320 mL Superdex75 (GE Healthcare). Tampão: 25 mM Tris-HCl pH 8; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA.

Tabela 6 – Continuação...

Proteína	Indução	Cromatografia de afinidade	Cromatografia de exclusão molecular
XAC0610 _{HIS-701-880}	<i>E. coli</i> BL21(DE3) com vetor p0610 _{HIS-701-880} . Crescimento a 25 °C até DO _{600nm} de 0,6 e indução por 0,4 mM IPTG a 18 °C durante 12-14 hs.	Coluna de 5 mL HiTrap HP (GE Healthcare). Tampão A: 50 mM Tris-HCl pH 8; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol. Tampão B: 50 mM Tris-HCl pH 8; 300 mM NaCl; 500 mM Imidazol. Eluição: gradiente linear de 20 a 500 mM de Imidazol utilizando 20 volumes de coluna.	Coluna de 320 mL Superdex75 (GE Healthcare). Tampão: 20 mM Tris-HCl pH 8; 100 mM NaCl; 2 mM β-mercaptoetanol.
XAC2446 _{HIS-1-346}	<i>E. coli</i> BL21(DE3) com vetor p2446 _{HIS-1-346} . Crescimento a 25 °C até DO _{600nm} de 0,6 e indução por 0,4 mM IPTG a 20 °C durante 12-14 hs.	Coluna de 5 mL HiTrap HP (GE Healthcare). Tampão A: 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 300 mM NaCl; 50 mM Imidazol. Tampão B: 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 300 mM NaCl; 500 mM Imidazol. Eluição: gradiente linear de 50 a 500 mM de Imidazol utilizando 15 volumes de coluna.	Coluna de 320 mL Superdex75 (GE Healthcare). Tampão: 20 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM NaCl.
XAC1488 _{HIS-205-566}	<i>E. coli</i> BL21(DE3) com vetor p1488 _{HIS-205-566} . Crescimento a 25 °C até DO _{600nm} de 0,6 e indução por 0,4 mM IPTG a 20 °C durante 12-14 hs.	Coluna de 5 mL HiTrap HP (GE Healthcare). Tampão A: 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 300 mM NaCl; 50 mM Imidazol. Tampão B: 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 300 mM NaCl; 500 mM Imidazol. Eluição: gradiente linear de 50 a 500 mM de Imidazol utilizando 15 volumes de coluna.	Coluna de 320 mL Superdex75 (GE Healthcare). Tampão: 20 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM NaCl.

Para a quantificação das proteínas purificadas, alíquotas foram diluídas em solução de guanidina 6 M e posteriormente dosadas por meio de leitura de absorbância em 280 nm. Para correlacionar a absorção a 280 nm com a concentração protéica foi utilizado o coeficiente de extinção molar, calculado a partir da seqüência primária da proteína utilizando a ferramenta ProtParam (Wilkins et al., 1999).

3.6.4. Testes de cristalização de proteínas

Testes de cristalização das proteínas recombinantes foram feitos imediatamente após a etapa de cromatografia de exclusão molecular, utilizando proteínas concentradas no mesmo tampão cromatográfico. Alternativamente, alíquotas das frações cromatográficas foram dialisadas em tampão contendo 5 mM Tris-HCl pH 8 e 10 mM NaCl, concentradas utilizando dispositivos Amicon (cutoff de 10 kDa; Millipore), e submetidas a novas triagens de cristalização.

As triagens de cristalização foram feitas utilizando os Kits comerciais: Crystal Screen 1 e 2, Index 1 e 2, SaltRx 1 e 2, PEG/Ion Screen 1 e 2, Crystal Screen Lite e MembFac (Hampton Research). Foi empregado o método de difusão de vapor com gotas sentadas em placas de 24 poços (*sitting drop*). No poço foi aplicada 300 µL de solução de precipitação e na gota foi aplicado 1,0 µL de proteína concentrada (1-6 mg/mL, dependendo da proteína) e 1,0 µL da solução do poço. As placas foram incubadas a 18 °C na sala de cristalização de proteínas do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Periodicamente as placas foram examinadas quanto a presença de cristais utilizando uma lupa com luz polarizada (Leica S6E).

3.7. Avaliação indireta da atividade de DGC de proteínas heterólogas em *E. coli*

BL21 (DE3)

A atividade de diguanilato ciclase das proteínas de interesse dentro de células de *E. coli* foi verificada por meio de ensaios fenotípicos em meio de cultura Congo Red (CR) (De et al., 2008, Christen et al., 2006). Células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas com o vetor controle (pET28a) ou com vetores de expressão das proteínas de interesse foram crescidas até uma densidade ótica de 0,5 (600 nm) em meio 2xTY suplementado com o antibiótico adequado. Uma alíquota de 2,5 µL de cada cultura foi transferida para um ponto em placas com meio TYE-ágar suplementado com o antibiótico adequado, 50 mg/L de Congo Red (Sigma-Aldrich), e IPTG em diferentes concentrações (0-0,1 mM). As placas foram incubadas a 30°C por 24 horas.

3.8. Análise do estado oligomérico de XAC0610_{His-35-880}

3.8.1. Gel filtração analítica

Cromatografia de exclusão molecular (SEC) foi realizada em coluna Superdex 200 (GE Healthcare) de 220 mL. A coluna foi equilibrada com 2 volumes de coluna de tampão de gel filtração, contendo 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl e 1 mM MgCl₂. Em alguns experimentos, 150 µM GTP foram adicionados ao tampão de gel filtração. Alíquotas de 500 µL de amostra (15-42 µM de proteína) foram aplicadas na coluna a um fluxo de 0,5 mL/min. O volume de retenção das proteínas aplicadas foi monitorado a 280 nm, utilizando um sistema ÄKTApurifier (Amersham Biosciences), e comparado a uma curva de calibração da coluna, obtida a partir de padrões de peso molecular contendo proteínas de 29-669 kDa (MWGF1000 Kit, Sigma-Aldrich).

3.8.2. Experimentos de fluorescência de proteína

Experimentos de fluorescência foram realizados a 25 °C em um espectropolarímetro J-815 (Jasco). Adicionou-se na cubeta (quartzo) da amostra 1 µM de proteína em 3 mL de solução tampão contendo 20mM Tris-Cl pH 8,0 e 100mM NaCl. A mesma solução tampão foi adicionada na cubeta de referência. A amostra foi pré-equilibrada por 5 minutos, excitada a 285 nm, e a fluorescência foi detectada entre 290-420 nm, com intervalos de 1 nm. Após o término da leitura, a quantidade de proteína na cubeta foi diluída (1 mL da amostra foi retirado e substituído por 1 mL de solução tampão) e a amostra foi submetida a nova análise de fluorescência. Diluições sucessivas da amostra contendo a proteína (1 µM a 58,5 nM) foram realizadas e os dados de fluorescência foram coletados para cada diluição.

3.8.3. Native-PAGE

Análises de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante foram realizadas de acordo com o protocolo descrito por Walker (2002). As amostras contendo proteínas foram misturadas com tampão de amostra (tampão 5X: 310 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,05% azul de bromofenol e 50% glicerol) e aplicadas em gel nativo de poliacrilamida 4% (gel concentrador) e 6% (gel separador). As corridas foram realizadas em ambiente com baixa temperatura (banho de gelo) a uma amperagem constante de 20 mA, utilizando um sistema Mini-PROTEAN (Bio-Rad).

3.8.4. Cross-linking com glutaraldeído

Experimentos de ligação cruzada ("cross-linking") de XAC0610_{HIS-35-880} com glutaraldeído foram realizados em tampão 25 mM Hepes pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM

DTT, 0,5 mM EDTA e 10% glicerol. A reação contendo 3 μ M XAC0610_{HIS-35-880} foi pré-incubada por 10 min a 30°C antes da adição de 0,001% (v/v) glutaraldeído. Alíquotas de 17 μ L da reação foram retiradas em diferentes intervalos de tempo (5-150 min) e interrompidas pela adição de 2 μ L Tris-HCl 1M pH8 e 10 μ L de tampão de amostra para SDS-PAGE. As amostras foram aquecidas a 60°C por 15 min e posteriormente os produtos da reação foram analisados por SDS-PAGE 6%.

3.8.5. Espalhamento de luz: DLS e SLS

As medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e estático (SLS) foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química – USP utilizando o equipamento Malvern Zetasizer Nano-ZS90.

A técnica de espalhamento de luz dinâmico baseia-se na determinação das flutuações na intensidade da luz espalhada pelas partículas, em função do tempo [ou seja, obtenção do gráfico: $I(t')$ vs t'], e no cálculo da respectiva função de auto-correlação (Berne & Pecora, 1976, Pecora, 1985, Schmitz, 1990). No DLS as flutuações da intensidade de espalhamento de luz detectada estão relacionadas ao movimento Browniano das partículas, que por sua vez são relacionadas ao tamanho das partículas. Isto é, partículas grandes tem movimento Browniano lento e a luz espalhada apresenta flutuações lentas. Já pequenas partículas se movem rapidamente no solvente, de modo que o feixe de luz espalhada mostra flutuações rápidas (Brown, 1993). Por meio de um tratamento estatístico, as flutuações de intensidade de luz espalhada pela partícula ao longo do tempo podem ser representadas através de uma função de auto-correlação:

$$G(t) = \langle I(t').I(t' + t) \rangle = A[1 + B \exp(-2Dq^2t)] \quad (1).$$

Esta função descreve o grau de dependência do sinal de espalhamento de luz em um tempo (t') comparado com um tempo posterior ($t'+t$), onde A e B representam, respectivamente, a linha base e o intercepto da função de auto-correlação; q é igual a $(4\pi n/\lambda_0)\sin(\theta/2)$, em que n é o índice de refração do meio, λ_0 o comprimento de onda do laser, e θ o ângulo de espalhamento; e D é o coeficiente de difusão translacional da partícula.

Se os sinais de espalhamento nos tempos $t'+t$, $t'+2t$, $t'+3t$ etc., forem comparados com o sinal em t' , a correlação entre os sinais irá decair com o tempo até não existir mais correlação, ou seja, quando $t' = \infty$. Flutuações lentas da intensidade, caso de partículas grandes, levam a uma função de correlação que precisa de um longo período de tempo para decair. Por outro lado, flutuações rápidas, caso de partículas pequenas, originam funções de correlação com taxas de decaimento, relativamente, mais elevadas.

Como pode ser visto na Eq. (1), as flutuações no espalhamento de luz podem ser correlacionadas com o coeficiente de difusão (D) das espécies espalhadoras. Partículas menores movem-se mais rapidamente que partículas grandes, e possuem, portanto, coeficiente de difusão maior. Assim, uma vez obtida a curva de auto-correlação da intensidade, é possível obter o diâmetro de uma esfera com o mesmo coeficiente de difusão da partícula espalhadora. Para uma dispersão de partículas com viscosidade η , em uma temperatura T, o coeficiente de difusão D é inversamente proporcional ao diâmetro hidrodinâmico d_h das partículas, como mostra a equação de Stokes-Einstein,

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta d_h} S \quad (2).$$

onde k é a constante de Boltzmann.

As medidas de espalhamento de luz dinâmico foram feitas a 30°C utilizando 2.5 mg/mL (26,5 μ M) de XAC0610_{HIS-35-880} em tampão contendo 20 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 2 mM β -mercaptoetanol e 5% glicerol. Com o Zetasizer software (Malvern), o sinal de DLS foi analisado por uma função de auto-correlação da intensidade e os dados foram utilizados para calcular o diâmetro hidrodinâmico (em nm) e o índice de polidispersidade (Pdl) das partículas em solução. O índice de polidispersidade é obtido pelo desvio padrão do histograma de distribuição de tamanhos, e fornece informações sobre o grau de homogeneidade de uma amostra. No Zetasizer software, o Pdl é representado em valores que variam de 0 a 1. Um Pdl próximo de zero indica uma população de partículas monodispersa (valores de Pdl de cerca de 0,05 são obtidos com partículas esféricas monodispersas de látex), já valores de Pdl maiores que 0,5 indicam uma distribuição muito ampla de tamanhos de partículas (Schwarz & Mehnert, 1999).

Nas análises por espalhamento de luz estático (SLS) mede-se a intensidade média da luz espalhada por um conjunto de partículas ao invés de medir as flutuações da intensidade do espalhamento em função do tempo, como ocorre nas análises por espalhamento dinâmico (DLS). A intensidade da luz espalhada depende do ângulo de medida. Contudo, no limite de Rayleigh R_θ (espalhamento de pequenas partículas) a intensidade torna-se independente do ângulo (o limite de Rayleigh é definido como $L_r < \lambda/20$, onde L_r é o raio da partícula e λ é o comprimento da luz incidente). Moléculas de proteína geralmente são menores do que o comprimento de onda da luz incidente, o que significa estar dentro do limite de Rayleigh (Stacey, 1956, Harding, 1994, Narayanan & Liu, 2003). Nesse caso, o limite de Rayleigh, R_θ , por definição é

proporcional à intensidade de luz espalhada e está relacionado à massa molecular média (M) e a concentração da partícula (C) pela equação (Zimm, 1948):

$$\frac{KC}{R_\theta} = \left(\frac{1}{M} + 2A_2C \right) \quad (3).$$

onde A_2 é o segundo coeficiente de expansão virial e K é uma constante ótica ou instrumental calculada a partir das propriedades do sistema:

$$K = \frac{4\pi^2 n_o^2}{N_A \lambda^4} \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 \quad (4).$$

onde n_o é o índice de refração do solvente, dn/dc é o incremento do índice de refração com a concentração do soluto, N_A é o número de Avogadro e λ é o comprimento de onda. As equações acima indicam que um gráfico linear de KC/R_θ versus C (gráfico de Debye) permite a determinação da massa molecular ($1/M$ é obtido pela extrapolação da reta até $C=0$) e de A_2 (inclinação da reta). O segundo coeficiente virial (A_2) corresponde a uma função complexa de temperatura, pressão e outros parâmetros do sistema polímero-solvente e classifica a interação desse sistema. Valores de A_2 positivos indicam boa interação polímero-solvente e valores negativos indicam que as interações polímero-polímero são maiores do que as interações polímero-solvente.

As medidas de espalhamento de luz estático foram realizadas a 25°C utilizando diferentes concentrações de XAC0610_{HIS-35-880} (0,97-3,88 mg/mL) em tampão contendo 25 mM Tris-HCl pH 8 e 100mM NaCl. A massa molar e o segundo coeficiente virial (A_2) da amostra foram calculados pelo gráfico de Debye assumindo um incremento no índice de refração (dn/dc) igual a 0,185 mL/g (Theisen, 2000, Zhao et al., 2011).

3.8.6. SEC-MALS (Multi-angle laser light-scattering coupled with size exclusion chromatography)

Análises por cromatografia de exclusão molecular acoplada a um detector de espalhamento de luz em múltiplos-ângulos (SEC-MALS) (Wen et al., 1996, Arakawa & Wen, 2001, Mogridge, 2004, Sahin & Roberts, 2012) foram também realizadas para determinar a massa molar de XAC0610_{HIS-35-880} em solução. Alíquotas de 500 µL de amostra, contendo diferentes concentrações de XAC0610_{HIS-35-880} (0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL e 5,0 mg/mL) em tampão 25 mM Tris-HCl (pH 8,0) e 100 mM NaCl, foram aplicadas com um fluxo de 0,5 mL/min a uma coluna 1 cm x 30 cm Superdex 200 (GE Healthcare) acoplada em série com os sistemas miniDAWN TREOS multi-angle light scattering (MALS) detector e Optilab rEX refractive index detector (Wyatt Technology Corp), no laboratório do Dr. Carlos Ramos do IQ-UNICAMP. Os dados foram analisados utilizando o software Astra version 6 (Wyatt Technology Corp). A massa molar de XAC0610_{HIS-35-880} foi calculada assumindo um incremento no índice de refração (dn/dc) igual a 0,185 mL/g.

3.9. Cinética enzimática

3.9.1. Detecção espectrofotométrica da atividade de DGC de proteínas recombinantes

A atividade de diguanilato ciclase (DGC) de proteínas recombinantes foi monitorada pela produção de pirofosfato (PP_i) por meio de um ensaio colorimétrico. O corante verde malaquita, molibdato e ortofosfato livre formam um complexo verde que pode ser quantificado pela sua absorbância em 650 nm (Baykov et al., 1988, Geladopoulos et al., 1991). Para monitorar a produção de PP_i pela reação de DGC foi

adicionado uma pirofosfatase no meio reacional (Chan et al., 2004). As reações foram feitas em placas de poliestireno de 96 poços (fundo chato) em um volume final de 50 μ L por reação, contendo tipicamente: 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 0,5 Unidades/ml pirofosfatase (New England Biolabs), e concentrações apropriadas de GTP (Sigma) e das proteínas recombinantes. Antes da adição do substrato (GTP) a mistura reacional foi pré-incubada a 30 °C por 10 minutos. Após a adição da quantidade apropriada de substrato, utilizando uma pipeta multicanal, as reações foram incubadas novamente a 30 °C e em intervalos regulares de tempo a reação de DGC foi parada pela adição de 200 μ L do reagente colorimétrico para detecção de fosfato inorgânico (P_i). Reações independentes foram preparadas para cada intervalo de tempo.

O reagente colorimétrico, contendo 3 volumes de 0,045 % verde malaquita (Sigma), 1 volume de molibdato de amônio (4,2 % em 4 N HCl), e 1/100 volumes de 1 % Triton X-100, foi preparado no mesmo dia, incubado no escuro a temperatura ambiente por pelo menos 30 minutos e filtrado antes do uso utilizando um filtro de 0,22 μ m. Após a adição do reagente colorimétrico as reações foram mantidas a temperatura ambiente por 10 minutos e a leitura da densidade óptica a 650 nm foi imediatamente realizada utilizando um leitor de microplacas (Epoch – BioTek ou SpectraMax – Molecular Devices). As reações foram feitas com pelo menos uma duplicata por placa para cada concentração de substrato e tempo de reação. Os ensaios foram realizados com pelo menos três repetições independentes para cada proteína testada. Em cada placa foi adicionado uma curva padrão de 0 a 100 μ M de pirofosfato. As reações da curva padrão foram feitas em um volume final de 50 μ L contendo: 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 0,5 Unidades/ml pirofosfatase (New England Biolabs),

e 0 – 100 μM pirofosfato (Sigma). As reações foram preparadas em triplicata para cada concentração de PP_i .

3.9.2. Avaliação do efeito da temperatura, pH e íons metálicos na atividade de XAC0610_{HIS-35-880}

Medidas da atividade enzimática de XAC0610_{HIS-35-880} foram realizadas em duas temperaturas diferentes: 30 °C e 37 °C. As reações foram feitas em um volume final de 20 μL por reação, contendo: 1 μM XAC0610_{HIS-35-880}, 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 0,5 Unidades/ml pirofosfatase (New England Biolabs), e 1 mM GTP (Sigma). As reações foram incubadas a 30 °C ou 37 °C e após diferentes intervalos de tempo as reações foram paradas pela adição de 500 μL do reagente colorimétrico para detecção de fosfato inorgânico (P_i). As reações foram mantidas a temperatura ambiente por 10 minutos antes da leitura da densidade óptica a 650 nm.

Para avaliar o efeito do pH na atividade de DGC de XAC0610_{HIS-35-880} medidas da velocidade inicial (V_o) da reação foram feitas em diferentes valores de pH (pH 6,5-9,0). As reações foram feitas em placas de poliestireno de 96 poços (fundo chato) em um volume final de 50 μL por reação, contendo: 0,5 μM XAC0610_{HIS-35-880}, 20 mM Tris-HCl (pH 6,5-9,0), 100 mM NaCl, 2-4 mM MgCl_2 , 0,5 Unidades/ml pirofosfatase (New England Biolabs), e 450 μM GTP (Sigma). Antes da adição do substrato (GTP) a mistura reacional foi pré-incubada a 30 °C por 10 minutos. O substrato foi adicionado às reações, e em intervalos regulares de tempo as reações foram paradas pela adição de 200 μL do reagente colorimétrico para detecção de fosfato inorgânico (P_i). Reações independentes foram preparadas para cada intervalo de tempo. Após a adição do reagente colorimétrico as reações foram mantidas a temperatura ambiente por 10

minutos e a leitura da densidade óptica a 650 nm foi imediatamente realizada utilizando um leitor de microplacas (Epoch – BioTek ou SpectraMax – Molecular Devices).

Medidas da atividade enzimática de XAC0610_{HIS-35-880} também foram realizadas na presença de diferentes íons metálicos: Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺, Co²⁺ e Zn²⁺. As reações foram feitas em um volume final de 50 µL por reação, contendo: 0,25 µM XAC0610_{HIS-35-880}, 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM NaCl, 0,5-2,5 mM de íons metálicos, 0,5 Unidades/ml pirofosfatase (New England Biolabs), e 500 µM GTP (Sigma). Antes da adição do substrato (GTP) a mistura reacional foi pré-incubada a 30 °C por 10 minutos. O substrato foi adicionado às reações e após 30 min de incubação a 30 °C as reações foram paradas pela adição de 10 µL de solução contendo 1 M Tris-HCl pH 6,5 e 60 mM MgCl₂. Para permitir a completa degradação do PP_i pela pirofosfatase, as reações foram incubadas a 30 °C por mais 30 minutos antes da adição de 200 µL do reagente colorimétrico para detecção de fosfato inorgânico (P_i). As reações foram mantidas a temperatura ambiente por 10 minutos e a leitura da densidade óptica a 650 nm foi imediatamente realizada utilizando um leitor de microplacas (Epoch – BioTek ou SpectraMax – Molecular Devices).

As análises gráficas dos dados foram realizadas usando o programa OriginPro v8 (OriginLab Co.).

3.9.3. Separação cromatográfica de nucleotídeos

Ensaio de atividade *in vitro* com a proteína recombinante XAC0610_{HIS-35-880} foram realizados e analisados por cromatografia de troca iônica. As reações foram feitas a 30°C em um volume de 100 µL contendo 0,25 µM de XAC0610_{HIS-35-880}, 20 mM Tris-HCl pH 8, 2 mM MgCl₂, 100 mM NaCl e 1 mM GTP. As reações foram paradas em

diferentes intervalos de tempo, pela adição de 900 µL de uma solução de 10 mM HCl, e aplicadas em uma coluna de 1 mL Resource Q (GE Healthcare) utilizando um sistema ÄKTApurifier (Amersham Biosciences) a um fluxo de 1 mL/min. Os nucleotídeos foram eluídos em um gradiente linear de 0 a 125 mM NaCl, formado pela mistura da Solução A (10 mM HCl) e Solução B (10 mM HCl e 500 mM NaCl) durante 20 volumes de coluna (CV). Para determinar o tempo de retenção de compostos padrões, soluções contendo 200 nmols GTP (Sigma) ou 20 nmols c-di-GMP (Biolog) foram aplicados na coluna, individualmente ou em uma mistura contendo ambos os nucleotídeos. Frações contendo os produtos da reação de DGC foram coletadas e analisadas por espectrometria de massa.

3.9.4. Identificação de c-di-GMP por espectrometria de massa

As frações da cromatografia de troca iônica, contendo o c-di-GMP sintetizado enzimaticamente pela proteína recombinante XAC0610_{HIS-35-880}, foram dessalinizadas utilizando uma coluna de 200 mg / 3 mL Strata-X 33 µm (Phenomenex). A coluna foi ambientada aplicando 3 mL de 100 % metanol e, posteriormente, 3 mL de água deionizada. Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com 3 mL de água deionizada, 3 mL de 10 % metanol e 3 mL de 15 % metanol. O c-di-GMP foi eluído em 3 mL de 95 % metanol e analisado por HPLC-ESI-MS. A amostra foi aplicada em uma coluna C18 equilibrada com 98 % de Solução A (25 mM formiato de amônio pH 7) e 2 % de Solução B (100 % metanol). A corrida foi realizada a um fluxo de 0,6 mL/min com os seguintes parâmetros: 2 % de B até 7 min, gradiente linear de 2 % a 80 % de B até 17 min e 80% de B até 25 min. Após a separação por HPLC a amostra foi analisada por espectrometria de massas com ionização por *electrospray* em um equipamento Esquire

3000 Plus (Bruker Daltonics), da Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, com analisador de massas do tipo *Ion Trap* e aquisição no modo de ionização negativo.

3.9.5. Modelo cinético e análise de dados

Para o cálculo das constantes cinéticas de proteínas recombinantes de XAC0610 os dados foram analisados assumindo o modelo cinético ilustrado na Figura 54 (C). Os valores de velocidade inicial (V_0) foram obtidos pela inclinação do gráfico de formação do produto, $[PP_i]$ *versus* tempo. As medições foram sempre restritas ao intervalo linear do gráfico de formação do produto. Os dados foram analisados de acordo com o modelo cinético proposto por meio da equação de velocidade:

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]^2}{K_1K_2 + 2K_2[S] + [S]^2} \quad (5).$$

Onde K_1 representa a constante de dissociação para a ligação da primeira molécula de GTP, ao primeiro domínio GGDEF, e K_2 representa a constante de dissociação para a ligação do segundo substrato (GTP), ao segundo domínio GGDEF. A Equação (5) também pode ser escrita na forma de duplo-recíproco:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{2K_2}{V_{max}} \left(\frac{1}{[S]} \right) + \frac{K_1K_2}{V_{max}} \left(\frac{1}{[S]^2} \right) \quad (6).$$

Uma dedução detalhada das equações de velocidade está disponível no Apêndice no final deste trabalho.

Todas as análises numéricas dos dados foram realizadas usando o programa OriginPro v8 (OriginLab Co.).

3.10. Espectroscopia de dicroísmo circular

Análises por espectroscopia de dicroísmo circular foram realizadas utilizando um espectrômetro JASCO J-815 CD equipado com um sistema Peltier de controle de temperatura. Experimentos de desnaturação térmica foram realizados em uma cubeta de quartzo, caminho óptico de 1 mm, utilizando 2 μ M XAC0610_{HIS-35-880} em tampão 1,25 mM Tris-HCl pH 8,0 e 5 mM NaCl na presença e ausência de 50 μ M c-diGMP. As amostras foram aquecidas de 20 a 95 °C a uma taxa de 0,5 °C/min e os dados foram coletados a 222 nm com uma largura de banda espectral de 1 nm.

3.11. Construção de mutantes nocautes *in frame* de *Xac*

3.11.1. Produção das linhagens nocaute *Xac* Δ 0610 e *Xac* Δ 2446

Para a construção dos mutantes nocautes *in frame*, fragmentos de DNA de aproximadamente 1 kb, correspondentes as regiões flaqueadoras (“upstream” e “downstream”) aos genes de interesse, foram amplificados por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos (Tabela 4). Os 2 fragmentos de DNA amplificados foram digeridos com a enzima *Xho*I e posteriormente ligados, utilizando a enzima T4 DNA ligase (New England Biolabs), de forma a produzir uma deleção no gene de interesse mantendo, na mesma janela de leitura, alguns poucos códons das regiões 5’ e 3’ da ORF do gene. O fragmento de DNA resultante, de aproximadamente 2 kb, contendo o gene *xac0610* ou *xac2446* deletado na região central e com aproximadamente 1 kb flaqueadores (“upstream” e “downstream”), foi amplificado por PCR, digerido com enzimas de restrição e ligado nos sítios *Hind*III/*Eco*RI do vetor pNPTS138 dando origem ao vetor pNPTS Δ 0610 ou pNPTS Δ 2446 (Tabela 5). O plasmídio suicida pNPTS138 (Jenal &

Fuchs, 1998) contém marcadores de resistência a kanamicina e suscetibilidade a sacarose (Figura 11).

Os vetores pNPTSΔ0610 e pNPTSΔ2446 foram utilizados, separadamente, para transformar células competentes de *Xac* por eletroporação. Para a eletroporação foi utilizado o aparelho GenePulser (BIO-RAD) a uma voltagem de 2,0 kV, 25 μF, 200 Ω, em cubetas de 0,2 cm. Após a eletroporação as células foram incubadas a 28°C sob agitação em meio 2xTY por 3-4 hs e plaqueadas em meio TYE-ágar suplementado com ampicilina (100 μg/mL) e kanamicina (50 μg/mL). As placas foram incubadas a 30°C por 3-4 dias.

A presença do gene *sacB* torna os mutantes para o primeiro evento de recombinação sensíveis a sacarose. As colônias resistentes a kanamicina foram repicadas para duas placas réplicas, uma contendo meio TYE-ágar suplementado com ampicilina e kanamicina, e outra contendo meio TYE-ágar suplementado com ampicilina, kanamicina e sacarose 5%. As placas foram incubadas a 30°C por 2-3 dias. As colônias transformantes de *Xac* resistentes a kanamicina e sensíveis a sacarose foram selecionadas para os passos subsequentes. Elas foram inoculadas em meio 2xTY suplementado com ampicilina e crescidas a 28°C sob agitação durante 12-14 hs. Após o crescimento as culturas foram diluídas e plaqueadas em meio TYE-ágar suplementado com ampicilina e sacarose. As placas foram incubadas a 30°C por 3-4 dias. Nestes procedimentos foram selecionados os clones que, por meio de um segundo evento de recombinação, eliminaram o plasmídeo inserido incluindo uma das cópias dos genes *xac0610* ou *xac2446* e os marcadores Kan^R e SacB.

Os mutantes obtidos contendo o gene *xac0610* ou *xac2446* inativado foram confirmados por PCR. Uma pequena quantidade de massa celular proveniente das

colônias de *Xac* foram transferidas para 20 µL de água milliQ estéril e aquecida a 96°C por 15 minutos. Cinco microlitros deste lisado foram utilizados nas reações da PCR. As reações da PCR foram realizadas num volume total de 50 µL utilizando os pares de oligonucleotídeos *Δ0610_upFwd_HindIII* e *0610-HindIII Rev* ou *0610-GAF-NdeI Fwd* e *Rev314_1PAS_0610_HindIII*, para a verificação do nocaute de *xac0610*, e o par de oligonucleotídeos *Δ2446_upFwd_HindIII* e *Δ2446_downRev_EcoRI*, para a verificação do nocaute de *xac2446* (Tabela 4).

Figura 11 – Mapa do vetor suicida pNPTS138 (Jenal & Fuchs, 1998).

3.11.2. Complementação da linhagem nocaute *XacΔ0610*

Para complementar a linhagem *XacΔ0610* com o gene *xac0610* sob o controle do seu promotor nativo foi utilizado um plasmídeo derivado do vetor pUFR047 (De Feyter et al., 1993) (Figura 12). O vetor pGEM-0610 (Tabela 5) foi clivado com a enzima

de restrição *HindIII* e o fragmento de DNA de 3,62 kb contendo a ORF do gene *xac0610* mais 977 pb de sua região flanqueadora 5' foi subclonado no sítio *HindIII* do vetor pUFR047, produzindo o vetor pUFR0610 (Tabela 5). O vetor pUFR0610 foi utilizado para transformar células competentes da linhagem *Xac* Δ 0610 e os transformantes contendo o plasmídeo foram selecionadas em meio TYE-ágar suplementado com gentamicina (10 μ g/mL) e ampicilina (100 μ g/mL).

Figura 12 – Mapa do vetor pUFR047 (De Feyter et al., 1993).

A linhagem *Xac* Δ 0610 também foi complementada com versões mutantes do gene *xac0610*. Para complementar a linhagem *Xac* Δ 0610 apenas com os domínios GAF_PAS(A-D), os oligonucleotídeos Δ 0610_upFwd_*HindIII* e Rev701_4PAS_0610_*HindIII* (Tabela 4) foram utilizados para amplificar um fragmento de DNA que codifica para os resíduos de aminoácidos 1-701 de XAC0610 mais 977 pb

de sua região flanqueadora 5'. Este fragmento de DNA foi ligado no sítio *HindIII* do vetor pUFR047, dando origem ao vetor pUFR0610_GAF_PAS(A-D) (Tabela 5). Para complementar a linhagem *Xac*Δ0610 apenas com o seu domínio GGDEF C-terminal, uma construção foi preparada a partir de dois fragmentos de DNA que codificam para os resíduos de aminoácidos 1-23 e 701-880 de XAC0610. Primeiro, os oligonucleotídeos Δ0610_upFwd_HindIII e 0610_NdeI(aa23)Rev (Tabela 4) foram utilizados para amplificar um fragmento de DNA que contém 977 pb da região flanqueadora 5' do gene *xac0610* mais a região que codifica para os resíduos de aminoácidos 1-23. Segundo, os oligonucleotídeos 0610_NdeI(aa701)Fwd e 0610-HindIII Rev (Tabela 4) foram utilizados para amplificar um fragmento de DNA que codifica para os resíduos de aminoácidos 701-880 de XAC0610. Após clivagem com a enzima de restrição *NdeI* os dois fragmentos de DNA foram ligados, na mesma janela de leitura, e a construção foi amplificada por PCR utilizando os oligonucleotídeos Δ0610_upFwd_HindIII e 0610-HindIII Rev (Tabela 4). Esta construção, contendo a região promotora do gene *xac0610* e apenas o seu domínio GGDEF, foi clonada no sítio *HindIII* do vetor pUFR047, dando origem ao vetor pUFR0610_GGDEF (Tabela 5). Para complementar a linhagem *Xac*Δ0610 com a proteína enzimaticamente inativa XAC0610_D797A/E798A, o vetor pGEM-0610_D797A/E798A (Tabela 5) foi clivado com a enzima de restrição *HindIII* e o fragmento de DNA de 3,62 kb contendo a ORF do gene *xac0610* mutado mais 977 pb de sua região flanqueadora 5' foi subclonado no sítio *HindIII* do vetor pUFR047, produzindo o vetor pUFR0610_D797A/E798A (Tabela 5).

3.11.3. Complementação da linhagem nocaute *Xac*Δ2446

Para a complementação da linhagem *Xac*Δ2446, o gene *xac2446* foi ligado no vetor pBRA (Figura 13). O vetor pBRA (“Broad Host Range Arabinose inducible”) é um derivado do vetor pBAD24 (Guzman et al., 1995) construído pela Dra. Miriam Marroquin (dados não publicados). Os oligonucleotídeos 2446_NcoI_Fw e 2446_XhoI_Rev (Tabela 4) foram utilizados para amplificar um fragmento de DNA de aproximadamente 1 kb contendo a região codificadora do gene *xac2446* correspondente aos resíduos de aminoácidos 2-346. Este fragmento de DNA foi digerido com as enzimas de restrição *NcoI* e *XhoI*, e ligado em fusão ao promotor induzível por L-arabinose (pBAD), nos sítios *NcoI*/*SalI* do vetor pBRA. O vetor resultante, pBRA2446 (Tabela 5), foi utilizado para transformar células competentes da linhagem *Xac*Δ2446 e os transformantes contendo o plasmídeo foram selecionadas em meio TYE-água suplementado com spectinomicina (100 µg/mL) e ampicilina (100 µg/mL).

Figura 13 – Mapa do vetor pBRA.

3.12. Ensaios funcionais com os mutantes nocautes de *Xac*

3.12.1. Ensaios de motilidade em meio semi-sólido

Ensaios de motilidade de *Xac* em meio semi-sólido foram realizados, como descrito por Guzzo et al. (2009), em meio SB (sacarose 5 g/L, extrato de leveduras 5 g/L, peptona 5 g/L, glutamato 1 g/L, pH 7,0) solidificado com 0,5% Bacto™ ágar (BD-Becton, Dickinson & Company). As culturas de *Xac* foram crescidas em meio 2xTY a 28°C sob agitação de 200 rpm até DO_{600nm} de 0,5 e 4 µL da cultura foram aplicados em um único ponto em placa contendo meio SB. As placas foram mantidas na capela de fluxo por aproximadamente 30 minutos, para a secagem do inóculo, e depois incubadas a 30°C durante 2-3 dias. Os ensaios foram realizados com pelo menos três repetições independentes para cada linhagem testada.

3.12.2. Ensaios de virulência na planta hospedeira

Culturas de *Xac* foram crescidas em meio 2xTY a 28 °C e 200 rpm até DO_{600nm} de aproximadamente 0,3-0,4. As células foram lavadas duas vezes em água destilada estéril (5000 rpm / 5 min / 4°C), diluídas até DO_{600nm} de 0,1 e inoculadas em plantas de citrus mantidas em sala com temperatura (28 °C) e luminosidade controlada (12 h/dia). Foram utilizadas plantas da variedade Pera Rio, Poncán e Limão Siciliano. Para o inóculo nas plantas foi feita um pequeno furo na face abaxial da folha utilizando uma agulha, e um pouco de suspensão bacteriana foi injetado no local utilizando seringas de 1 mL sem agulha. Os sintomas foram monitorados durante 13 dias.

3.12.3. Sobrevivência bacteriana na presença de peróxido de hidrogênio

Ensaio de sobrevivência de *Xac* na presença de peróxido de hidrogênio foram realizados como descrito por Tondo et al. (2010). Culturas de *Xac* foram crescidas em 10 mL de meio 2xTY a 30°C e 200 rpm até DO_{600nm} de 0,5. Após o crescimento uma alíquota da cultura foi retirada, diluída e plaqueada (controle não tratado). Peróxido de hidrogênio (1 mM) foi adicionado à cultura e esta foi incubada por mais 15 min a 30°C e 200 rpm. Após o tratamento com peróxido de hidrogênio, uma nova alíquota da cultura foi retirada, diluída e plaqueada. As placas foram incubadas a 30°C por 48h e, após o crescimento, as colônias foram contadas. A porcentagem de sobrevivência foi calculada utilizando o número de UFC obtido após o tratamento com 1 mM de H_2O_2 dividido pelo número de UFC antes do tratamento (controle não tratado). Os ensaios foram realizados com pelo menos três repetições independentes para cada linhagem testada.

3.12.4. Ensaio de produção de enzimas extracelulares por *Xac*

Ensaio para avaliar a atividade de enzimas extracelulares foram realizados de acordo com métodos previamente publicados (Tang et al., 1991, Dow et al., 2003, Hsiao et al., 2011).

Para avaliar a produção de proteases extracelulares, culturas de *Xac* foram crescidas em meio 2xTY até DO_{600nm} de 0,5. Um volume de 4 μ L da cultura foi aplicado em um único ponto em placa contendo meio TYE-ágar suplementado com 1 % de leite desnatado. Após a secagem do inóculo, as placas foram incubadas a 30°C durante 2-3 dias. A atividade proteolítica sobre a caseína do leite foi visualizada pela formação de um halo transparente ao redor da colônia de *Xac*. Os ensaios foram realizados com pelo menos três repetições independentes para cada linhagem testada.

Para avaliar a produção de endoglucanases extracelulares, culturas de *Xac* foram crescidas em meio 2xTY até DO_{600nm} de 0,5. Um volume de 4 μ L da cultura foi aplicado em um único ponto em placa contendo meio TYE-ágar suplementado com 0,5 % de carboximetilcelulose (CMC). Após a secagem do inóculo, as placas foram incubadas a 30°C durante 2-3 dias. Para a visualização do halo de degradação da CMC ao redor da colônia de *Xac* as placas foram coradas com uma solução de vermelho congo 0,1% e o excesso do corante foi lavado com 1M NaCl. Os ensaios foram realizados com pelo menos três repetições independentes para cada linhagem testada.

3.12.5. Ensaios de formação de biofilme por *Xac*

Ensaios de formação de biofilme pelas linhagens de *Xac* em uma superfície abiótica foram realizados como descrito por Malamud et al. (2011). Culturas de *Xac* foram crescidas *overnight* em meio 2xTY, lavadas e diluídas em novo meio de cultura SB ou 2xTY até obter uma DO_{600nm} de 0,1. Alíquotas de 150 μ L de cada cultura diluída foram transferidas para placas de poliestireno de 96 poços e as placas foram incubadas a 30 °C por 24, 48 ou 72 horas. Em cada intervalo de tempo indicado, o meio de cultura em cada poço foi gentilmente removido e as células não aderidas foram removidas com uma lavagem com 200 μ L de 0,9 % NaCl. As células aderidas foram coradas com 150 μ L de 0,1 % cristal violeta (O'Toole & Kolter, 1998) por 30 minutos a temperatura ambiente. O excesso de corante foi removido e o poço foi lavado três vezes com 200 μ L de água destilada. O cristal violeta de cada poço foi solubilizado pela adição de 150 μ L de 70 % etanol e quantificado utilizando um leitor de microplaca (Epoch – BioTek) no comprimento de ondas de 570 nm. Os ensaios foram realizados com pelo menos três repetições independentes para cada linhagem testada.

3.13. Ensaios de duplo-híbrido em leveduras

3.13.1. Clonagem dos genes *xac0610* e *xac2446* no vetor pOBD

Os oligonucleotídeos 2446_NcoI_Fw e 2446_XhoI_Rev (Tabela 4) foram utilizados para amplificar a região codificadora do gene *xac2446* (resíduos de aminoácidos 2-346). Este fragmento de DNA foi digerido com as enzimas de restrição *NcoI* e *XhoI*, e ligado em fusão com o domínio de ligação a DNA (DBD) de Gal4, nos sítios *NcoI/SalI* do vetor pOBD2 (Figura 14) (Uetz et al., 2000), originando o vetor pOBD2446₂₋₃₄₆.

Figura 14 – Mapa do vetor pOBD2 (Uetz et al., 2000).

Quatro combinações de pares dos oligonucleotídeos 0610_NcoI_Fw; 0610_XmaI_Rev; 0610_NcoI(aa452)Fwd; 0610_XmaI(aa476)Rev; 0610_NcoI(aa698)Fwd; e 0610_XmaI(aa722)Rev (Tabela 4) foram utilizadas para amplificar fragmentos de DNA da região codificadora do gene *xac0610* (resíduos de aminoácidos 2-880; 2-476; 452-722; e 698-880). Estes fragmentos de DNA foram digeridos com as enzimas de restrição *NcoI* e *XmaI*, e ligados em fusão com o DBD de Gal4, nos sítios *NcoI/XmaI* do vetor pOBD2, originando os vetores pOBD0610₂₋₈₈₀, pOBD0610₂₋₄₇₆, pOBD0610₄₅₂₋₇₂₂, e pOBD0610₆₉₈₋₈₈₀.

Todos os vetores construídos, contendo as iscas de interesse, foram confirmados utilizando análises com enzimas de restrição e por sequenciamento de DNA.

3.13.2. Transformação da linhagem PJ69-4a com a isca de interesse

Os vetores contendo as construções de interesse (iscas) foram utilizados, individualmente, para transformar a linhagem de *Sacharomyces cerevisiae* PJ69-4a (*MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ*) (James et al., 1996). Para a transformação de levedura foi utilizado o método de acetato de lítio (LiAc/ssDNA/PEG) (Gietz & Woods, 2006, Gietz, 2006). A levedura foi crescida a 30 °C durante 2-3 dias em placa de Petri contendo o meio YAPD ágar (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de bacto-peptona, 20 g/L de glicose, 40 mg/L de sulfato de adenina, 16 g/L de bacto-ágar, pH 5,8). Uma quantidade de células correspondente a um volume de 25 µL foi coletada da placa e lavada três vezes em 1 mL de água destilada estéril (6000 rpm / 1 min). Após a última lavagem, ao precipitado de células foi adicionado: 240 µL de 50% PEG 3350, 36 µL de 1M acetato

de lítio, 50 µL de ssDNA de esperma de salmão (2 mg/L, Sigma), 4 µL de DNA plasmidial (100-200 ng) e 30 µL de água deionizada. As células foram ressuspensas e submetidas a um choque térmico a 42 °C durante 30 minutos, com agitação a cada 10 minutos. Após este período, as células foram centrifugadas a 6000 rpm por 1 minuto, ressuspensas em 200 µL de água e incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos. Aliquotas de 100 µL da suspensão de células foram plaqueadas em meio de cultura sem triptofano Sc-W ágar (0,67% de base de nitrogênio sem aminoácidos, 2% de glicose, 1,6% de bacto-ágar, pH 5,8 e suplemento auxotrófico apropriado) e as placas foram incubadas a 30 °C até o aparecimento de colônias (2-4 dias).

3.13.3. Teste de auto-ativação das células de levedura contendo a isca

As células transformadas foram submetidas a um ensaio para verificar a possibilidade de auto-ativação do gene repórter *HIS3* pela proteína isca. Uma suspensão de células com DO_{600nm} de 0,1 (1×10^6 UFC/mL) foi preparada, em água estéril, a partir das colônias crescidas em meio Sc-W ágar. Esta suspensão foi diluída 1000 vezes e 100 µL da diluição foram plaqueados em meio Sc-WH ágar (Sc sem triptofano e sem histidina) e em meio Sc-WH ágar contendo diferentes concentrações (3-200 mM) de 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT), um inibidor competitivo na biossíntese de histidina. Como tratamento controle, 100 µL da diluição de células também foram plaqueados em meio Sc-W ágar. As placas foram incubadas a 30 °C por 5 dias e a concentração inibitória de 3-AT foi determinada para cada construção.

3.13.4. Transformação com a biblioteca genômica de *Xac* e confirmação dos clones positivos

Células de levedura PJ69-4a, previamente transformadas com as construções em pODB (iscas) e que não apresentaram auto-ativação do gene repórter *HIS3*, foram utilizadas para a transformação em larga escala com a biblioteca genômica de *Xac*. A biblioteca genômica de *Xac*, construída previamente (Alegria et al., 2004), possui fragmentos de DNA entre 500-3000 pb ligados no vetor pOAD (Figura 15) (Bartel et al., 1996, Hudson et al., 1997).

Figura 15 – Mapa do vetor pOAD (Bartel et al., 1996, Hudson et al., 1997).

Para a transformação de levedura em larga escala, as células foram crescidas a 30 °C em 50 mL de meio Sc-W sob agitação de 200 rpm durante 14-16 horas.

Posteriormente, as células foram centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos, ressuspensas em 150 mL de meio YAPD líquido, e incubadas novamente a 30 °C sob agitação até a obtenção de uma DO_{600nm} de 2,0 (2×10^7 UFC/mL), aproximadamente 4 horas. Após este período, as células foram coletadas e lavadas três vezes em 25 mL de água destilada estéril (4000 rpm / 1 min). Em seguida as células foram ressuspensas em 3 mL de acetato de lítio (100 mM), incubadas a 30 °C por 15 min e centrifugadas a 6000 rpm por 1 minuto. Ao precipitado de células foi adicionado: 7,2 mL de 50% PEG 3350, 1,08 mL de 1M acetato de lítio, 1,5 mL de ssDNA de espermatozoides de salmão (2 mg/L, Sigma), 30 µL de DNA da biblioteca genômica de *Xac* (30 µg) e 990 µL de água deionizada. As células foram ressuspensas, incubadas a 30 °C durante 15 minutos e submetidas a um choque térmico a 42 °C durante 30 minutos, com agitação a cada 10 minutos. Após este período, as células foram centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos, ressuspensas em 100 mL de meio YPD líquido (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de bacto-peptona, 20 g/L de glicose, pH 5,8) e incubadas a 30 °C por 45 minutos sob agitação de 200 rpm. As células foram novamente centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos e ressuspensas em 5 mL de água destilada estéril. Aliquotas de 700 µL da suspensão de células foram plaqueadas em meio de cultura Sc-WHL ágar (Sc sem triptofano, histidina e leucina), contendo a quantidade apropriada de 3-AT, e as placas (150x15mm) foram incubadas a 30 °C até o aparecimento de colônias (14 dias).

Após o aparecimento das colônias em meio Sc-WHL ágar, os clones foram repicados para placas contendo o meio de cultura Sc-WHLA ágar (Sc sem triptofano, histidina, leucina e adenina), suplementado com 3-AT na concentração inibitória apropriada, e as placas foram incubadas a 30 °C por 4 dias. Os clones que cresceram

no meio seletivo e apresentaram coloração branca foram considerados positivos, pois foram capazes de ativar simultaneamente os genes repórteres *ADE2* e *HIS3*.

3.13.5. Extração do DNA plasmidial de levedura

A extração do DNA plasmidial de leveduras foi realizada em placas de 96 poços, de acordo com Sambrook & Russell (2001). Cada clone positivo foi inoculado em um poço contendo 1,2 mL de meio Sc-L líquido (Sc sem leucina) e as placas foram incubadas 30 °C sob agitação de 200 rpm por 48 horas. Após o crescimento, as células foram centrifugadas a 2700 rpm por 8 minutos, lavadas em 1 mL de Tampão Rescue (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM EDTA, 0,3% β -mercaptoetanol), centrifugadas novamente e ressuspensas no volume residual de Tampão Rescue. À suspensão de células foram adicionados 25 μ L de Solução de Lise (Tampão Rescue suplementado com 2 mg/mL de Zymoliase e 0,2 mg/mL de RNase) e as placas foram incubadas a 37 °C sob agitação de 150 rpm por 1 hora. Posteriormente foram adicionados 25 μ L de 10% SDS em cada poço e as placas foram incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos, e em seguida a -80 °C por 15 minutos. Após o descongelamento, um volume de 100 μ L de acetato de potássio 3 M (pH 5,2) foi adicionado em cada poço e as placas foram incubadas no gelo por 10 minutos. As placas foram centrifugadas a 4 °C e 4000 rpm por 15 minutos e 120 μ L do sobrenadante de cada poço foram transferidos para uma nova placa. Ao sobrenadante recolhido foi adicionado 90 μ L de isopropanol, as placas foram centrifugadas a 4 °C e 4000 rpm por 15 minutos e o DNA precipitado foi lavado com 100 μ L de etanol 70%. Após a secagem do precipitado, o DNA foi ressuspendido em 10 μ L de água deionizada e armazenado a -20 °C.

3.13.6. Transformação de *E. coli* KC8 e sequenciamento dos clones

O DNA plasmidial de levedura foi utilizado para transformar células competentes de *E. coli* KC8. Para a eletroporação, 1-2 μL de DNA plasmidial foram adicionados a 30 μL de células KC8 eletrocompetentes e a mistura foi transferida para cubetas de eletroporação de 0,2 cm. Foi utilizado um eletroporador MicroPulser (BIO-RAD) a uma voltagem de 2,5 kV. Imediatamente após a eletroporação, foi adicionado 1 mL de meio 2xTY e as células foram incubadas a 37 °C, durante 1 hora, sob agitação de 200 rpm. Após este período, as células foram plaqueadas em meio mínimo M9 ágar (Sambrook & Russell, 2001) suplementado com uracila (20 mg/L), histidina (20 mg/L), triptofano (40 mg/L) e ampicilina (100 $\mu\text{g/mL}$), para a seleção de bactérias contendo o vetor pOAD. As placas foram incubadas a 37 °C por 1-2 dias.

A extração do DNA plasmidial dos clones de *E. coli* KC8 selecionados foi também realizada em placas de 96 poços (Sambrook & Russell, 2001). Cada clone positivo foi inoculado em um poço contendo 1,2 mL de meio 2xTY líquido, suplementado com ampicilina (100 $\mu\text{g/mL}$), e as placas foram incubadas 37 °C sob agitação de 200 rpm por 16 horas. Após o crescimento, as células foram centrifugadas a 2700 rpm por 8 minutos, lavadas em 240 μL de Solução I (25 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM EDTA, 50 mM Glicose), centrifugadas novamente e ressuspensas em 85 μL de Solução I, suplementada com RNase (100 $\mu\text{g/mL}$). À suspensão de células foram adicionados 60 μL de Solução de Lise (0,2 M NaOH, 1 % SDS) e as placas foram incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente, após a homogeneização suave da solução por inversão manual das placas. Posteriormente foi dado um pulso de 1000 rpm e foram adicionados à cada poço 60 μL de Solução III (Acetato de potássio 3M pH

6). A solução foi misturada suavemente por inversão e as placas foram incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos. Após este período, foi dado um pulso de 1000 rpm e as placas foram incubadas a 90 °C por 30 minutos, e em seguida no gelo por 15 minutos. As placas foram centrifugadas a 4 °C e 4000 rpm por 15 minutos e 100 µL do sobrenadante de cada poço foram transferidos para placas de purificação de DNA MultiScreen HTS (Millipore). O sobrenadante filtrado foi recolhido e o DNA foi precipitado com 100 µL de isopropanol durante a centrifugação das placas, a 4 °C e 4000 rpm por 40 minutos. O DNA precipitado foi lavado com 200 µL de etanol 70%. Após a secagem do precipitado, o DNA foi ressuscitado em 10 µL de água deionizada e armazenado a -20 °C.

O DNA plasmidial purificado foi sequenciado, utilizando o oligonucleotídeo pOAD_Fwd (Tabela 4), e as sequências de DNA foram analisadas com base no banco de dados do genoma de *Xac* para a identificação do gene presa.

3.13.7. Cotransformação da linhagem PJ69-4a com os vetores pOAD e pOBD para confirmar as interações

Os vetores pOAD recuperados, contendo os genes de proteínas identificadas nos ensaios de duplo híbrido (presas), foram utilizados para transformar células de levedura PJ69-4a, previamente transformadas com as construções em pOBD (iscas). A transformação de levedura foi realizada seguindo os procedimentos descritos no item 3.12.2. As leveduras transformadas, carregando ambos os vetores pOBD e pOAD, foram estriadas em placas réplicas contendo meio Sc com diferentes restrições auxotróficas: Sc-W, Sc-L, Sc-WHA, Sc-LHA e Sc-WLHA.

4. RESULTADOS

4.1. Predição da atividade de diguanilato ciclase das proteínas de *Xac*

A bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (também conhecida como *X. axonopodis* pv. *citri* ou *Xac*) é o agente causal do cancro cítrico, uma doença que ataca todas as variedades e espécies de citros. O genoma de *Xac* codifica 31 proteínas contendo domínios GGDEF (Andrade et al., 2006, da Silva et al., 2002). Várias destas proteínas possuem também domínios PAS e/ou GAF, que são ubíquos domínios sensores e de sinalização.

Figura 16 – Arquitetura de domínios das proteínas de *Xac* estudadas neste trabalho. Todos os domínios foram identificados de acordo com o banco de dados do Pfam (Punta et al., 2012). As letras dentro do domínio GGDEF são maiúsculos se seguem o consenso GG(^D/_E)EF e minúsculos se não seguem este consenso.

Para tentar investigar a razão pela qual os domínios PAS e GAF estão frequentemente associados a domínios GGDEF, e entender melhor o papel destas proteínas na rede de sinalização por c-di-GMP, algumas proteínas de *Xac* contendo domínios PAS e/ou GAF diretamente ligados ao domínio GGDEF foram selecionadas como alvo deste estudo. As proteínas selecionadas foram: XAC1345, XAC4358, XAC2810, XAC1488, XAC0610, XAC3272, e XAC2446 (Figura 16).

As diguanilato ciclases catalisam a formação de c-di-GMP a partir de duas moléculas de GTP. Estas proteínas atuam como dímeros em que cada subunidade contém um domínio GGDEF. O sítio ativo (sítio A) é formado na interface de dimerização dos domínios GGDEF, onde cada um deles se liga a uma molécula de GTP (Chan et al., 2004, Paul et al., 2007). Especificamente, o sítio A corresponde ao motivo GG(^D/_E)EF, além de outros resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação ao substrato e coordenação à íons de magnésio (Chan et al., 2004, Wassmann et al., 2007).

Proteínas contendo domínios GGDEF se caracterizam por serem abundantes nos genomas bacterianos. Entretanto nem todos os domínios GGDEF encontrados em proteínas de uma mesma bactéria possuem atividade de diguanilato ciclase (DGC). Muitas proteínas possuem domínios GGDEF degenerados que não possuem alguns resíduos de aminoácidos importantes para a catálise enzimática (Seshasayee et al., 2010). Assim, para inferir sobre a atividade de DGC das proteínas de *Xac*, foi feito um alinhamento da sequência de aminoácidos do domínio GGDEF das proteínas de *Xac* estudadas com a sequência do domínio GGDEF de proteínas bem caracterizadas: PleD, de *Caulobacter crescentus*, e WspR, de *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 17). As proteínas XAC1345, XAC4358 e XAC2810 possuem todos os resíduos de aminoácidos necessários a catalise e devem ser enzimaticamente ativas. As proteínas XAC0610 e XAC1488 possuem uma substituição no motivo GG(^D/_E)EF. XAC0610 possui o motivo AGDEF e XAC1488 possui o motivo GGEEL. Estas substituições podem não afetar a atividade da proteína uma vez que se trata de substituições por aminoácidos com características físico-químicas similares. Já as proteínas XAC3272 e XAC2446 não possuem vários resíduos importantes para a catálise e são provavelmente inativas (Figura 17, Tabela 7).

Figura 17 – Resíduos importantes para a catálise e regulação alostérica do domínio GGDEF. Painel superior: representação do sítio ativo (esquerda) e do sítio inibitório (direita) do domínio GGDEF da proteína PleD (PDB: 2V0N) em complexo com um análogo do substrato (GTP α S). Painel inferior: alinhamento múltiplo de sequências entre os domínios GGDEF das proteínas PleD e WspR com o das proteínas de Xac em estudo. Os resíduos de aminoácidos coloridos em ciano estão envolvidos na coordenação aos íons de magnésio. Os resíduos de aminoácidos coloridos em vermelho estão envolvidos na acomodação da base de guanina. Os resíduos de aminoácidos coloridos em amarelo fazem interações iônicas com os fosfatos β e γ do substrato. Os resíduos de aminoácidos coloridos em azul escuro formam o sítio inibitório primário (I_p).

As proteínas GGDEF também podem apresentar inibição pelo produto através da ligação de c-di-GMP no sítio inibitório (sítio-i) caracterizado pelo motivo RxxD localizado geralmente a 5 resíduos de aminoácidos antes do motivo GGDEF (Christen et al., 2006). A presença de sítio-i conservado foi verificada nas proteínas XAC1345, XAC4358, XAC1488 e XAC3272 (Figura 17, Tabela 7).

Tabela 7 – Predição de atividade e regulação das proteínas de *Xac*.

Proteína	Nº de aminoácidos	Predição de Atividade	Sítio-i Conservado
XAC1345	569	ativa	sim
XAC4358	575	ativa	sim
XAC2810	356	ativa	não
XAC1488	566	Possivelmente ativa	sim
XAC0610	880	Possivelmente ativa	não
XAC3272	307	inativa	sim
XAC2446	346	inativa	não

4.2. Expressão, purificação e tentativas de cristalização de proteínas recombinantes

4.2.1. Expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*

As sequências de nucleotídeos dos genes que codificam para as proteínas de *Xac* selecionadas para estudo foram utilizadas para desenhar oligonucleotídeos iniciadores específicos (Tabela 4). Para o desenho dos oligonucleotídeos, análises da sequência de aminoácidos deduzida das proteínas de *Xac* foram feitas para tentar minimizar as chances de produção de proteínas recombinantes insolúveis. Foram feitas análises de predição de domínios, para evitar a produção de proteínas recombinantes contendo domínios transmembranares ou domínios extracelulares, análises de predição

de estruturas secundárias, para evitar a interrupção de estruturas secundárias estáveis como α -hélice e fita- β , e análises da presença de resíduos de aminoácidos desestabilizadores no N-terminal da proteína (Varshavsky, 1997).

Utilizando os oligonucleotídeos desenhados, os genes que codificam as proteínas de *Xac* foram amplificados por PCR, a partir do DNA genômico da linhagem 306 (Tabela 3), e ligados em vetores de expressão de proteínas heterólogas (Figura 18, Tabela 5). Foram obtidos vetores para a expressão de diferentes construções de proteínas recombinantes (Tabela 8). Os vetores obtidos foram utilizados para expressar as proteínas recombinantes de *Xac* em cepas de *E. coli*. A maioria das proteínas recombinantes testadas teve boa expressão na cepa de *E. coli* BL21(DE3) (Figura 19), algumas, como por exemplo XAC0610_{HIS-604-880} e XAC0610_{HIS-35-316}, expressaram melhor em *E. coli* BL21(DE3)Star, e outras, como XAC0610_{HIS-604-701} e XAC0610_{HIS-209-316}, não tiveram expressão observada nem quando utilizadas outras cepas como BL21(DE3)RP, BL21(DE3)RIL e BL21(DE3)pLysS.

Para avaliar a solubilidade das proteínas recombinantes, as células de *E. coli* de experimentos de indução da expressão de proteínas foram coletadas e lisadas por sonicação. Os extratos celulares foram centrifugados para separar a fração de proteínas solúveis (Fs) da fração insolúvel (Fi), e as frações foram analisadas por SDS-PAGE (Figura 20). Estes experimentos mostraram que as proteínas XAC0610_{HIS-35-880}, XAC0610_{HIS-701-880}, XAC0610_{HIS-604-880}, XAC0610_{HIS-35-316}, XAC0610_{HIS-717-880}, XAC1488_{HIS-205-566}, XAC2446_{HIS-1-346} e XAC0610K759A_{HIS-35-880}, sob determinadas condições, como temperatura e cepa de expressão apropriada (Tabela 6), são solúveis ou parcialmente solúveis, enquanto que as proteínas XAC1345_{HIS-253-569}, XAC1345_{HIS-}

205-569, XAC1488_{HIS-252-566}, XAC2446_{HIS-32-346}, XAC3272_{HIS-12-307} e XAC2810_{HIS-1-356} se localizam apenas na fração insolúvel nas condições testadas (Tabela 8).

Figura 18 – Amplificação por PCR e clonagem dos genes de *Xac* em vetores para expressão de proteínas heterólogas. Exemplo de análises por eletroforese em gel de agarose (1%) das amplificações por PCR e clivagens de DNA plasmidial. M = marcador de peso molecular (O'GeneRuler DNA Ladder Mix – Fermentas); 1 = p3272_{HIS-12-307} (*NdeI/EcoRI*); 2 = PCR de XAC3272₁₂₋₃₀₇; 3 = p1488_{HIS-252-566} (*NdeI/HindIII*); 4 = PCR de XAC1488₂₅₂₋₅₆₆; 5 = p1345_{HIS-253-569} (*NdeI/HindIII*); 6 = PCR de XAC1345₂₅₃₋₅₆₉; 7 = p1345_{HIS-205-569} (*NheI/HindIII*); 8 = PCR de XAC1345₂₀₅₋₅₆₉; 9 = p1488_{HIS-205-566} (*NdeI/HindIII*); 10 = PCR de XAC1488₂₀₅₋₅₆₆; 11 = p0610_{HIS-604-880} (*NdeI/HindIII*); 12 = PCR de XAC0610₆₀₄₋₈₈₀; 13 = p2446_{HIS-32-346} (*NdeI/BamHI*); 14 = PCR de XAC2446₃₂₋₃₄₆; 15 = PCR de XAC0610₃₅₋₈₈₀; 16 = PCR de XAC4358₂₁₋₅₇₅; 17 = PCR de XAC0610₇₁₇₋₈₈₀; 18 = PCR de XAC0610₃₅₋₃₁₆; 19 = PCR de XAC0610₂₀₉₋₃₁₆; 20 = PCR de XAC0610₆₀₄₋₇₀₁; 21 = PCR de XAC4358₃₁₆₋₅₇₅; 22 = p0610_{HIS-35-880} (*NdeI/HindIII*); 23 = PCR de XAC0610₇₀₁₋₈₈₀; 24 = p0610_{HIS-701-880} (*NdeI/HindIII*).

Tabela 8 – Construções utilizadas para a expressão de proteínas recombinantes.

Proteína	Arquitetura (N-terminal → C-terminal)	PM ^δ (kDa)	pI ^δ	Expressão	Solubilidade	Purificação
XAC0610 _{HIS-35-880}	HisTag-GAF-PAS _A -PAS _B -PAS _C -PAS _D -GGDEF	94,4	5,65	+	Solúvel	+
XAC0610 _{HIS-701-880}	HisTag-GGDEF	21,8	6,72	+	Solúvel	+
XAC0610D797A/E798A _{HIS-35-880}	HisTag-GAF-PAS _A -PAS _B -PAS _C -PAS _D -GGDEF	94,3	5,72	+	N.d.	-
XAC0610K759A _{HIS-35-880}	HisTag-GAF-PAS _A -PAS _B -PAS _C -PAS _D -GGDEF	94,4	5,61	+	Solúvel	+
XAC0610 _{HIS-604-880}	HisTag-PAS _D -GGDEF	32,2	6,36	+	Solúvel*	+
XAC0610 _{HIS-35-316}	HisTag-GAF-PAS _A	33,2	5,75	+	Solúvel*	+
XAC0610 _{HIS-717-880}	HisTag-GGDEF	19,9	6,44	+	Solúvel*	-
XAC0610 _{HIS-604-701}	HisTag-PAS _D	12,8	6,28	-	N.d.	-
XAC0610 _{HIS-209-316}	HisTag-PAS _A	14,1	6,14	-	N.d.	-
XAC1345 _{HIS-253-569}	HisTag-GAF-GGDEF	36,3	6,18	+	Insolúvel	-
XAC1345 _{HIS-205-569}	HisTag-GAF-GGDEF	41,9	6,31	+	Insolúvel	-
XAC1488 _{HIS-252-566}	HisTag-GAF-GGDEF	36,0	5,95	+	Insolúvel	-
XAC1488 _{HIS-205-566}	HisTag-GAF-GGDEF	41,3	5,89	+	Solúvel	+
XAC2446 _{HIS-32-346}	HisTag-GAF-GGDEF	36,1	5,99	+	Insolúvel	-
XAC2446 _{HIS-1-346}	HisTag-GAF-GGDEF	40,2	5,56	+	Solúvel	+
XAC3272 _{HIS-12-307}	HisTag-GAF-GGDEF	34,5	5,78	+	Insolúvel	-
XAC4358 _{HIS-21-575}	HisTag-GAF-PAS _A -PAS _B -GGDEF	64,1	6,07	-	N.d.	-
XAC4358 ₃₁₆₋₅₇₅	PAS _B -GGDEF	29,5	6,06	-	N.d.	-
XAC2810 _{HIS-1-356}	HisTag-GAF-GGDEF	42,2	5,35	+	Insolúvel	-

(δ) Valores preditos. (+) Objetivo alcançado. (-) Objetivo não alcançado. (N.d.) Não determinado. (*) Parcialmente solúvel.

Figura 19 – Expressão de proteínas recombinantes em células de *E. coli* BL21(DE3). Exemplo de análises da indução da expressão, de algumas das proteínas listadas na Tabela 8, por SDS-PAGE. Células de *E. coli* BL21(DE3) contendo o vetor de expressão da proteína indicada foram crescidas a 37 °C em meio 2xTY e a expressão da proteína foi induzida após adição de 0,4 mM de IPTG. Alíquotas das culturas foram coletadas, misturadas com tampão de amostra (1X: 10% glicerol, 2% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1% azul de bromofenol, 5% β-mercaptoetanol), fervidas em banho maria por 5 min e analisadas por SDS-PAGE, em gel de poliacrilamida 15%. NI = Controle não induzido (células de *E. coli* BL21(DE3) não induzidas); M = Marcador de peso molecular. Pesos moleculares teóricos (em kDa) das proteínas recombinantes expressas: 36 (XAC1488_{HIS-252-566}), 41 (XAC1488_{HIS-205-566}), 34 (XAC3272_{HIS-12-307}), 42 (XAC1345_{HIS-205-569}), 36 (XAC1345_{HIS-253-569}), 32 (XAC0610_{HIS-604-880}) e 36 (XAC2446_{HIS-32-346}).

4.2.2. Purificação de proteínas recombinantes e tentativas de cristalização

As proteínas XAC0610_{HIS-35-880}, XAC0610_{HIS-701-880}, XAC0610_{HIS-604-880}, XAC0610_{HIS-35-316}, XAC1488_{HIS-205-566}, XAC2446_{HIS-1-346} e XAC0610K759A_{HIS-35-880}, que tiveram a expressão solúvel ou parcialmente solúvel, foram purificadas até a homogeneidade após duas etapas cromatográficas, cromatografia de afinidade e cromatografia de exclusão molecular (Tabela 6). Para avaliar a pureza das proteínas

durante as etapas de purificação, alíquotas das frações cromatográficas foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE (Figuras 21-26).

Figura 20 – Expressão e análise da solubilidade de proteínas recombinantes. Exemplo das análises por SDS-PAGE, após lise e fracionamento dos extratos celulares de culturas de *E. coli* expressando proteínas recombinantes. A) Proteína solúvel. A expressão de XAC0610_{HIS-35-880} foi induzida a 18 °C em células de *E. coli* BL21(DE3) pela adição de 0,4 mM de IPTG. B) Proteína insolúvel. A expressão de XAC2446_{HIS-32-346} foi induzida a 37 °C em células de *E. coli* BL21(DE3) pela adição de 0,4 mM de IPTG. C) Proteína parcialmente solúvel. A expressão de XAC0610_{HIS-604-880} foi induzida a 18 °C em células de *E. coli* BL21(DE3)Star pela adição de 0,4 mM de IPTG. I = Induzido; NI = Não induzido (sem adição de IPTG); M = Marcador de peso molecular; Fs = Fração solúvel; Fi = Fração insolúvel.

As proteínas purificadas foram concentradas e submetidas a ensaios de cristalização. As triagens de cristalização de proteínas foram feitas utilizando Kits da Hampton Research, empregando o método de difusão de vapor com gotas sentadas em placas de 24 poços. Entretanto, não foram obtidos cristais. As proteínas de *Xac* purificadas contêm múltiplos domínios, assim elas podem apresentar uma flexibilidade estrutural que dificulta a sua cristalização. Outra razão para o insucesso da cristalização destas proteínas pode ter sido a baixa concentração protéica utilizada (1-6 mg/mL). Entretanto, mesmo utilizando uma baixa concentração de proteína, foi observado que as proteínas testadas apresentavam em média 80-90% de precipitação nas condições testadas, ou seja, formação de precipitados amorfos em várias condições por placa, logo após a mistura com a solução precipitante.

Figura 21 – Análise por SDS-PAGE 15% da purificação de XAC0610_{HIS-604-880} (fragmento contendo os domínios PAS_D-GGDEF). A) Purificação por cromatografia de afinidade. B) Purificação por cromatografia de exclusão molecular em coluna S75. I = Induzido; M = Marcador de peso molecular; Fs = Fração solúvel aplicada na coluna de cromatografia de afinidade; Fa = Frações da cromatografia de afinidade; Fe = Frações da cromatografia de exclusão molecular. A banda correspondente a XAC0610_{HIS-604-880} (32,2 kDa) está indicada pela seta.

Figura 22 – Análise por SDS-PAGE 15% da purificação de XAC0610_{HIS-35-316} (fragmento contendo os domínios GAF-PAS_A). A) Purificação por cromatografia de afinidade. B) Purificação por cromatografia de exclusão molecular em coluna S75. Fs = Fração solúvel aplicada na coluna de cromatografia de afinidade; Fa = Frações da cromatografia de afinidade; Fe = Frações da cromatografia de exclusão molecular. A banda correspondente a XAC0610_{HIS-35-316} (33,2 kDa) está indicada pela seta.

Figura 23 – Análise por SDS-PAGE 12% da purificação de XAC0610_{HIS-35-880} (fragmento contendo todos os domínios GAF-PAS_{A-D}-GGDEF). A) Purificação por cromatografia de afinidade. B) Purificação por cromatografia de exclusão molecular em coluna S200. M = Marcador de peso molecular; Fs = Fração solúvel aplicada na coluna de cromatografia de afinidade; Fa = Frações da cromatografia de afinidade; Fe = Frações da cromatografia de exclusão molecular. A banda correspondente a XAC0610_{HIS-35-880} (94,4 kDa) está indicada pela seta.

Figura 24 – Análise por SDS-PAGE 15% da purificação de XAC0610_{HIS-701-880} (fragmento contendo o domínio GGDEF). A) Purificação por cromatografia de afinidade. B) Purificação por cromatografia de exclusão molecular em coluna S75. M = Marcador de peso molecular; Fs = Fração solúvel aplicada na coluna de cromatografia de afinidade; Fa = Frações da cromatografia de afinidade; Fe = Frações da cromatografia de exclusão molecular. A banda correspondente a XAC0610_{HIS-701-880} (21,8 kDa) está indicada pela seta.

Figura 25 – Análise por SDS-PAGE 15% da purificação de XAC2446_{HIS-1-346} (proteína inteira contendo os domínios GAF-GGDEF). A) Purificação por cromatografia de afinidade. B) Purificação por cromatografia de exclusão molecular em coluna S75. M = Marcador de peso molecular; I = Induzido; Fs = Fração solúvel aplicada na coluna de cromatografia de afinidade; Fa = Frações da cromatografia de afinidade; Fe = Frações da cromatografia de exclusão molecular. A banda correspondente a XAC2446_{HIS-1-346} (40,2 kDa) está indicada pela seta.

Figura 26 – Análise por SDS-PAGE 15% da purificação de XAC1488_{HIS-205-566} (fragmento contendo os domínios GAF-GGDEF). A) Purificação por cromatografia de afinidade. B) Purificação por cromatografia de exclusão molecular em coluna S75. I = Induzido; M = Marcador de peso molecular; Fa = Frações da cromatografia de afinidade; Fe = Frações da cromatografia de exclusão molecular. A banda correspondente a XAC1488_{HIS-205-566} (41,3 kDa) está indicada pela seta.

4.3. Caracterização da atividade enzimática de XAC0610

4.3.1. Atividade enzimática *in vivo*

A proteína XAC0610 apresenta uma substituição G para A do primeiro resíduo de glicina dentro do, geralmente, conservado motivo GGDEF de proteínas ativas (Figura 17). Esta substituição talvez pudesse comprometer a atividade de DGC da proteína. Entretanto, durante a expressão heteróloga de XAC0610_{HIS-35-880} em células de *E. coli* BL21(DE3) foi verificado que esta proteína causa um fenótipo de agregação celular (Figura 27). Este fenótipo pode ser consequência do aumento dos níveis intracelulares de c-di-GMP (D'Argenio et al., 2002, Simm et al., 2004, Kader et al., 2006, Simm et al., 2007, Hsiao et al., 2011) indicando que a proteína XAC0610_{HIS-35-880} está ativa nas células de *E. coli*.

A atividade enzimática de DGC também pode ser avaliada indiretamente por meio de um ensaio fenotípico que correlaciona o aumento da concentração intracelular de c-di-GMP ao aumento da coloração vermelha de colônias de bactérias cultivadas em

meio de cultura contendo vermelho do congo (CR - Congo Red) devido ao aumento da produção de celulose e fimbrias em *E. coli* (Zogaj et al., 2001, Christen et al., 2006, De et al., 2008).

Figura 27 – A super-expressão heteróloga de XAC0610_{HIS-35-880} causa agregação celular em *E. coli*. A) Cultura de células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas com o vetor vazio pET28a e induzidas com IPTG (0,4 mM) a 18 °C durante 12-14 hs. B) Cultura de células de *E. coli* BL21(DE3) expressando a proteína XAC0610_{HIS-35-880} utilizando as mesmas condições de (A).

Células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas com o vetor controle (pET28a) ou com vetores para a expressão das proteínas alvo foram analisadas em placas contendo CR e diferentes concentrações de IPTG (Figura 28). O aumento da expressão protéica induzida por IPTG resultou em um aumento na coloração vermelha em células expressando XAC0610_{HIS-35-880}, enquanto que a linhagem transformada com o vetor controle permaneceu com a coloração inalterada. A expressão da proteína XAC0610_{HIS-701-880}, contendo apenas o domínio GGDEF de XAC0610, provocou também um aumento na coloração vermelha das colônias de *E. coli* BL21(DE3), porém em menor intensidade quando comparado com a expressão da proteína inteira, XAC0610_{HIS-35-880},

indicando que os domínios N-terminais GAF-PAS(A_D) são necessários para uma completa ativação da atividade de DGC de XAC0610.

Figura 28 – Ensaios de atividade de DGC *in vivo* em meio de cultura contendo vermelho do congo (CR - Congo Red). Células de *E. coli* BL21(DE3) foram transformadas com vetores de expressão das proteínas XAC0610_{HIS-35-880}, XAC0610_{D797A/E798A}_{HIS-35-880}, XAC0610_{K759A}_{HIS-35-880}, XAC0610_{HIS-701-880} ou com o vetor pET28a vazio (controle negativo). As culturas foram crescidas a 37 °C até uma densidade ótica (DO 600nm) de 0,5 e alíquotas de 2,5 µL de cada cultura foram transferidas para pontos em placas com meio TYE-ágar suplementado com o 100 µg/mL de kanamicina, 50 mg/L de Congo Red (Sigma-Aldrich), e IPTG em diferentes concentrações (0-0,05 mM). As placas foram incubadas a 30°C por 24 horas.

4.3.2. Mutação sítio dirigida de XAC0610

Mutações sítio dirigidas foram realizadas no gene *xac0610* para investigar o efeito de resíduos de aminoácidos específicos na atividade de DGC de XAC0610.

Estudos estruturais e mutagênicos com a diguanilato ciclase PleD mostraram que os resíduos de aminoácidos Glu370 e Glu371 do motivo GGEEF desta proteína são indispensáveis para a catálise (Christen et al., 2006, Wassmann et al., 2007). Para alterar o sítio ativo da enzima XAC0610 de AGDEF para AGAAF e da mesma forma tentar eliminar sua atividade de diguanilato ciclase, mutações nos códons do gene *xac0610* que codificam para os resíduos de aminoácidos Asp797 e Glu798 foram introduzidas por PCR utilizando os oligonucleotídeos *0610_D797A_E798A_Fw* e

0610_D797A_E798A_Rv e estes resíduos foram substituídos por alaninas na proteína mutante XAC0610_{D797A/E798A} (Figura 29).

Figura 29 – Obtenção das mutações sítio dirigidas D797A e E798A em XAC0610. A) Alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene *xac0610* (resíduos 2377-2406 pb) com os oligonucleotídeos iniciadores (0610_D797A_E798A_Fw e 0610_D797A_E798A_Rv) utilizados para introduzir as substituições dos códons que codificam para os resíduos de aminoácidos Asp797 e Glu798 para códons de alanina. As mutações D797A e E798A (destacadas em cinza na figura) estão localizadas no motivo AGDEF da proteína XAC0610 selvagem que foi substituído pelo motivo AGAAF na proteína mutante XAC0610_{D797A/E798A} (compare os resíduos de aminoácidos sublinhados na figura). B) Cromatograma do sequenciamento de DNA após a introdução das mutações sítio dirigidas. As setas indicam a posição dos códons GCC e GCA introduzidos no lugar dos códons originais GAC (Asp797) e GAA (Glu798) no gene *xac0610*.

Na estrutura cristalográfica de PleD ligado ao análogo de substrato GTP α S (Wassmann et al., 2007), outro resíduo de aminoácido que parece ser importante no sítio ativo da enzima é Lys332 (Figura 57). Este resíduo de lisina é bastante conservado nas DGCs (Seshasayee et al., 2010), porém não existe na literatura relato de estudos

mutagênicos para avaliar a importância deste resíduo para a catálise. Para avaliar se o resíduo de lisina correspondente em XAC0610 (Lys759) é importante para a síntese de c-di-GMP, mutações no códon do gene *xac0610* que codificam para o resíduo de aminoácido Lys759 foram introduzidas por PCR utilizando os oligonucleotídeos *0610_k759A_Fw* e *0610_k759A_Rv* e este resíduo foi substituído por uma alanina na proteína mutante XAC0610_{K759A} (Figura 30).

Figura 30 – Obtenção da mutação sítio dirigida K759A em XAC0610. A) Alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene *xac0610* (resíduos 2257-2295 pb) com os oligonucleotídeos iniciadores (*0610_K759A_Fw* e *0610_K759A_Rv*) utilizados para introduzir a substituição do códon que codifica para o resíduo de aminoácido Lys759 para um códon de alanina. A mutação K759A está sublinhada e destacada em cinza na figura. B) Cromatograma do sequenciamento de DNA após a introdução da mutação sítio dirigida. As setas indicam a posição do códon GCG introduzido no lugar do códon original AAG (Lys759) no gene *xac0610*.

A expressão heteróloga das proteínas mutantes XAC0610D797A/E798A_{HIS-35-880} ou XAC0610K759A_{HIS-35-880} não afetaram a coloração das colônias de *E. coli* BL21(DE3) em meio de cultura contendo vermelho do congo (Figura 28), indicando que as

mutações sítio específicas D797A/E798A (mutação do motivo AGDEF da proteína selvagem para AGAAF) ou K759A afetam a atividade de DGC *in vivo*. Entretanto, culturas de *E. coli* BL21(DE3) expressando XAC0610K759A_{HIS-35-880} apresentaram o fenótipo de agregação celular em meio líquido (dados não mostrados), enquanto que culturas de *E. coli* BL21(DE3) expressando XAC0610D797A/E798A_{HIS-35-880} não causaram o fenótipo de agregação celular, mesmo após longos períodos de incubação (16-18h). Estes resultados indicam que as mutações sítio específicas D797A/E798A causam a perda total da atividade de DGC de XAC0610 *in vivo*, enquanto que a mutação K759A provoca uma diminuição da atividade de DGC *in vivo* suficiente para provocar a perda do fenótipo avermelhado em meio de cultura contendo vermelho do congo, nas condições testadas (Figura 28).

4.3.3. Detecção da atividade enzimática *in vitro* por cromatografia de troca iônica

Ensaio de atividade *in vitro* com a proteína recombinante XAC0610_{HIS-35-880} foram realizados e analisados por cromatografia de troca iônica utilizando uma coluna Resource Q (1 mL) (Figura 31). Padrões de GTP (200 nmols) e c-di-GMP (20 nmols) foram aplicados na coluna, individualmente e em uma mistura contendo ambos, e o tempo de retenção destes nucleotídeos foi determinado (Figura 31). Por meio da análise das reações contendo a proteína recombinante XAC0610_{HIS-35-880} foi verificado a atividade de DGC com o consumo do substrato (GTP) e formação do produto (c-di-GMP). O pico 1, com volume de retenção de aproximadamente 8,5 mL, corresponde a c-di-GMP e pode ser detectado em 20 minutos de reação de DGC catalisada por XAC0610_{HIS-35-880} (Figura 31). O pico 2, com volume de retenção de aproximadamente

22 mL, corresponde ao substrato GTP que foi quase totalmente exaurido pela reação de DGC catalisada por XAC0610_{HIS-35-880} após 66 minutos de reação, nas condições testadas (Figura 31).

Frações da cromatografia de troca iônica contendo o produto da reação de DGC de XAC0610_{HIS-35-880} (Pico 1, Figura 31) foram coletadas e analisadas por espectrometria de massa (HPLC-ESI-MS) para confirmar a presença de c-di-GMP. No espectro de massas (Figura 32) foi verificada a existência do íon molecular de c-di-GMP com valor de m/z de 689, devido a desprotonação (ionização no modo negativo) do c-di-GMP que possui massa molar igual a 690 g/mol.

Figura 31 – Análise da atividade enzimática de XAC0610_{HIS-35-880} por cromatografia de troca iônica. As reações foram feitas em um volume de 100 μ L contendo 0,25 μ M de XAC0610_{HIS-35-880}; 20 mM Tris-HCl pH 8,0; 2 mM MgCl₂; 100 mM NaCl; 1 mM GTP e incubadas a 30°C por diferentes intervalos de tempo (0, 20, 66, 166 min e 23 hrs). As reações foram paradas pela adição de 900 μ L de 10 mM HCl pH 2,0 e analisadas em uma coluna Resource Q (1 ml) utilizando um sistema ÄKTApurifier

(Amersham Biosciences) com monitoramento da absorção a 280nm. Os nucleotídeos foram eluídos em um gradiente linear de 0 a 125 mM NaCl. Na parte superior (inserto), soluções contendo padrões de nucleotídeos GTP (Sigma) e/ou c-di-GMP (Biolog) foram aplicadas na coluna para identificação dos picos: 1 (c-di-GMP) e 2 (GTP).

Figura 32 – Análise por espectrometria de massas (HPLC-ESI-MS) do produto da reação catalisada por XAC0610_{HIS-35-880}. A) Cromatograma da separação em HPLC. O produto da reação de DGC (Pico 1 – Figura 31) foi separado em uma coluna C18 utilizando os parâmetros descritos nos “Materiais e Métodos” (Seção 3.9.4.). O eixo horizontal representa o tempo de retenção em minutos e o eixo vertical representa a absorção da amostra a 253 nm em mAU. B) Espectro de massas obtido pela amostra após separação em HPLC no tempo de retenção entre 16,6 e 16,7 minutos. O eixo horizontal representa a relação entre a massa (m) e a carga (z) das moléculas ionizadas presentes na amostra. O eixo vertical representa a abundância relativa dessas moléculas. O pico a 689,2 m/z corresponde a $[(c\text{-di-GMP})\text{-H}^+]$ (ionização no modo negativo de c-di-GMP MM = 690,4 g/mol). C) Ampliação do espectro de massas mostrado em (B) na faixa de 676 a 704 m/z .

4.3.4. Detecção espectrofotométrica da atividade enzimática *in vitro*

A atividade de DGC de XAC0610_{HIS-35-880} foi também verificada indiretamente por meio da monitoração da produção de pirofosfato (PP_i) através de um ensaio colorimétrico (Baykov et al., 1988, Geladopoulos et al., 1991). O corante verde malaquita, molibdato e ortofosfato livre formam um complexo verde que pode ser quantificado pela sua absorbância em 650 nm. Para monitorar a produção de PP_i pela reação de DGC foi adicionado uma pirofosfatase no meio reacional (Chan et al., 2004). A atividade de DGC de XAC0610_{HIS-35-880} acoplada a atividade da pirofosfatase comercial (Thermostable Inorganic Pyrophosphatase, New England Biolabs) permitiu a detecção de fosfato inorgânico (P_i) livre pelo corante verde malaquita, nos tempos de reação testados, sendo que a reação acoplada apresentou maior atividade a 30°C que a 37°C (Figura 33).

Figura 33 – Detecção da atividade de DGC de XAC0610_{HIS-35-880} pelo ensaio com verde malaquita. As reações foram feitas a 30°C e 37°C em um volume de 50 µL contendo: 1 mM GTP (Sigma); 20 mM Tris-HCl pH 8; 10 mM MgCl₂; 100 mM NaCl; 0,5 U/mL de pirofosfatase e 1 µM XAC0610_{HIS-35-880}. As reações foram paradas em

diferentes intervalos de tempo pela adição de 500 μL do reagente colorimétrico para detecção de fosfato inorgânico (P_i). (C1) Reação controle sem adição de XAC0610_{HIS-35-880}. (C2) Reação controle sem adição de GTP. (C3) Reação controle sem adição de pirofosfatase. As reações controles C1, C2 e C3 foram incubadas a 30°C e 37°C durante 3h, antes da adição do reagente colorimétrico.

Para verificar se agentes redutores exercem efeito na atividade de DGC de XAC0610_{HIS-35-880} ou da reação acoplada com a pirofosfatase, ensaio de atividade enzimática foram realizados na presença e ausência de 5 mM β -Mercaptoetanol ou ditioneína (DTT). Como pode ser visto na Figura 34 a adição de agentes redutores na mistura reacional não alterou os níveis de atividade enzimática detectada pelo ensaio com verde malaquita.

Figura 34 – Efeito de compostos redutores na atividade de DGC de XAC0610_{HIS-35-880} pelo ensaio com verde malaquita. A) Atividade enzimática na presença ou ausência de 5 mM β -Mercaptoetanol. B) Atividade enzimática na presença ou ausência de 5 mM DTT. As reações foram feitas a 30°C em um volume de 50 μL contendo: 1 mM GTP; 20 mM Tris-HCl pH 8; 10 mM MgCl_2 ; 100 mM NaCl; 0,5 U/mL de pirofosfatase e 0,6 μM XAC0610_{HIS-35-880}. As reações foram pré-incubadas a 30°C por 10 min e após a adição do substrato (GTP) as reações foram incubadas por mais 1h (A) ou 30 min (B) antes da adição de 500 μL do reagente colorimétrico para detecção de fosfato inorgânico (P_i). As reações foram diluídas (1:5) antes da leitura da densidade óptica a 650 nm. Reações controle, paradas logo após a adição de GTP foram utilizadas como branco para as leituras.

O ensaio com verde malaquita, escalonada para placas de 96 poços (Ver material e métodos), possibilitou a obtenção de uma correlação linear ($R^2 = 0,999$) entre a DO_{650nm} e a quantidade de pirofosfato inicial na faixa de concentração de 1 a 64 μM (Figura 35A). Uma curva padrão com $R^2 = 0,995$ também pode ser obtida na faixa de concentração de 1 a 100 μM (dados não mostrados), acima de 100 μM PP_i ocorre uma perda acentuada da linearidade entre a concentração de PP_i e a absorção a 650 nm, nas condições testadas (Figura 35B).

Ensaio de atividade de DGC *in vitro* com as proteínas recombinantes XAC0610_{HIS-701-880} (contendo apenas o domínio GGDEF) ou XAC0610K759A_{HIS-35-880} (contendo a mutação sítio dirigida K759A) mostraram uma grande redução de atividade, quando comparados com os ensaios utilizando a proteína recombinante WT XAC0610_{HIS-35-880} (Figura 36). Os níveis de atividade enzimática obtidos utilizando apenas 0,25 μM XAC0610_{HIS-35-880} não foram alcançados mesmo quando a concentração das proteínas XAC0610_{HIS-701-880} ou XAC0610K759A_{HIS-35-880} foram aumentadas 20 vezes (de 0,25 a 5 μM) (Figura 36). Assim como observado nos ensaios de atividade enzimática *in vivo* (Figura 28), estes resultados indicam que os domínios N-terminais GAF-PAS(A_D) são necessários para uma completa ativação da atividade de DGC de XAC0610, provavelmente por contribuírem para uma correta oligomerização da proteína, necessária para a formação do sítio catalítico. A baixa atividade de DGC *in vivo* (Figura 28) e *in vitro* (Figura 36) apresentada por XAC0610K759A_{HIS-35-880} indica que o conservado resíduo Lys759 possui um importante papel na catálise, provavelmente por fornecer estabilização de cargas durante o estado de transição substrato-produto, como sugerido previamente (Wassmann et al., 2007).

Figura 35 – Quantificação de pirofosfato (PP_i) pelo ensaio com verde malaquita. As reações foram feitas a 30°C em um volume de 50 μL contendo: 1-64 μM PP_i (A) ou 4,6-293 μM PP_i (B); 20 mM Tris-HCl pH 8; 5 mM MgCl₂ (A) ou 2 mM MgCl₂ (B); 100 mM NaCl e 1 U/mL de pirofosfatase. Para permitir a completa degradação do PP_i pela pirofosfatase, as reações foram incubadas a 30 °C por pelo menos 15 minutos antes da adição de 200 μL do reagente colorimétrico para detecção de fosfato inorgânico (P_i). O reagente colorimétrico, contendo 3 volumes de 0,045 % verde malaquita, 1 volume de molibdato de amônio (4,2 % em 4 N HCl), e 1/100 volumes de 1 % Triton X-100, foi preparado no mesmo dia, incubado no escuro a temperatura ambiente por pelo menos 30 minutos e filtrado antes do uso utilizando um filtro de 0,22 μm. Após a adição do

reagente colorimétrico as reações foram mantidas a temperatura ambiente por 10 minutos e a leitura da densidade óptica a 650 nm foi imediatamente realizada utilizando um leitor de microplacas.

Figura 36– Detecção da atividade de DGC de XAC0610 pelo ensaio com verde malaquita em placas de 96 poços. As reações foram feitas a 30°C em um volume de 50 μ L contendo: 500 μ M GTP; 20 mM Tris-HCl pH 8; 2 mM $MgCl_2$; 100 mM NaCl; 1 U/mL de pirofosfatase e 0,25 μ M XAC0610_{HIS-35-880} (WT) ou 0,25-5 μ M XAC0610_{HIS-701-880} (GGDEF) ou 0,25-5 μ M XAC0610K759A_{HIS-35-880} (K759A). As reações foram paradas após 20 min (colunas cinza-claras) ou 2 h (colunas cinza-escuras) pela adição de 200 μ L do reagente colorimétrico para detecção de fosfato inorgânico (P_i). Reações controle, paradas logo após a adição de GTP foram utilizadas como branco para as leituras.

4.3.5. Efeito da concentração enzimática, pH e íons metálicos na atividade

de XAC0610_{HIS-35-880}

O ensaio de detecção da atividade de DGC com o corante verde malaquita foi utilizado para estudar o efeito do pH, íons metálicos e da concentração enzimática na velocidade inicial da reação de DGC catalisada por XAC0610_{HIS-35-880}.

Para estudar o efeito do pH, medidas de atividade enzimática de DGC ao longo do tempo foram realizadas em tampão com diferentes valores de pH (6,5-9,0). A velocidade inicial da reação em cada valor de pH foi calculada por regressão linear

utilizando o gráfico $[PP_i]$ x Tempo (Figura 37 A e C). Com estas análises foi verificado que XAC0610_{HIS-35-880} apresenta máxima atividade enzimática em tampão pH 8,0-8,5 (Figura 37 B e D). Estes resultados são consistentes com valores descritos na literatura para a reação de DGC. Estudos com a diguanilato ciclase PleD mostraram que esta enzima possui máxima atividade enzimática em pH 7,5-8,5 (Paul et al., 2007).

Figura 37 – Efeito do pH na atividade enzimática de XAC0610_{HIS-35-880}. (A) e (C) Medidas da atividade enzimática de XAC0610_{HIS-35-880} ao longo do tempo em diferentes valores de pH. (B) e (D) Medidas da velocidade inicial da reação de DGC em função do pH. Os valores de velocidade inicial foram calculados pela análise da inclinação das retas obtidas em (A) ou (C), assumindo uma concentração de proteína dimérica igual a 0,25 μM (equivalente à metade dos 0,5 μM de proteína total). As reações foram feitas a

30°C em um volume de 50 μL contendo: 450 μM GTP; 20 mM Tris-HCl (pH 6,5-9,0); 2 mM MgCl_2 (A e B) ou 4 mM MgCl_2 (C e D); 100 mM NaCl; 1 U/mL de pirofosfatase e 0,5 μM XAC0610_{HIS-35-880} (proteína total). Reações independentes foram paradas em diferentes intervalos de tempo pela adição de 200 μL do reagente colorimétrico.

A pirofosfatase (Thermo Stable Inorganic Pyrophosphatase, New England Biolabs, catalog# M0296), utilizada na reação acoplada para a detecção da atividade de DGC, possui atividade ótima em pH 8,5, segundo informações do fabricante. Para verificar se o efeito do pH observado corresponde especificamente a atividade de DGC de XAC0610_{HIS-35-880}, e não devido a perda de atividade da pirofosfatase, ensaios para a quantificação de pirofosfato inorgânico foram realizados em diferentes valores de pH (6,5-9,0). Como observado na Figura 38 (A) a pirofosfatase comercial apresentou níveis similares de atividade em todos os valores de pH testados. Mesmo em pH 6,5, em que há perda total de atividade de DGC de XAC0610_{HIS-35-880} (Figura 37), a pirofosfatase é capaz de consumir de 1-20 μM PP_i em 6 minutos de reação ou menos (Figura 38 B).

Similar a outras DGCs, a atividade enzimática de XAC0610_{HIS-35-880} é também dependente da presença de íons metálicos, principalmente Mg^{2+} ou Mn^{2+} (Figura 39). Utilizando uma proporção de 1:1, 500 μM GTP e 500 μM cátion divalente, a atividade de DGC de XAC0610_{HIS-35-880} foi maior na presença de Mn^{2+} do que na presença de Mg^{2+} (Figura 39 A). Uma maior atividade de DGC na presença de Mn^{2+} do que na presença de Mg^{2+} também foi observada em estudos com PleD (Paul et al., 2007). As Figuras 39 (B) e (C) mostram que 500 μM de Ca^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} ou Zn^{2+} inibem a atividade de DGC de XAC0610_{HIS-35-880} mesmo na presença de 2 mM Mg^{2+} ou Mn^{2+} . Interessantemente, XAC0610_{HIS-35-880} apresentou maior atividade de DGC na presença

de Mg^{2+} do que na presença de Mn^{2+} , quando a concentração destes íons foi aumentada de 500 μM para 2,5 mM (Compare as Figuras 39 B e C).

A

B

Figura 38 – Efeito do pH na atividade enzimática da pirofosfatase. A) Quantificação de pirofosfato pelo ensaio com verde malaquita em diferentes valores de pH. As reações foram feitas em um volume de 50 μL contendo: 1-73 μM PPi (Sigma);

20 mM Tris-HCl (pH 6,5-9,0); 2 mM MgCl_2 ; 100 mM NaCl e 1 U/mL de pirofosfatase (New England Biolabs, catalog# M0296). As reações foram incubadas a 30 °C por 30 minutos antes da adição de 200 μL do reagente colorimétrico. B) Medidas da atividade da pirofosfatase ao longo do tempo em pH 6,5. As reações foram feitas a 30°C em um volume de 50 μL contendo: 1-20 μM PP_i ; 20 mM Tris-HCl (pH 6,5); 2 mM MgCl_2 ; 100 mM NaCl e 1 U/mL de pirofosfatase. Reações independentes foram paradas em diferentes intervalos de tempo pela adição de 200 μL do reagente colorimétrico.

O efeito da concentração de Mg^{2+} na atividade de DGC de XAC0610_{HIS-35-880} foi mais profundamente estudado utilizando diferentes concentrações de MgCl_2 (0,5-8 mM). Como pode ser visto na Figura 40, para a obtenção de altos níveis de atividade de XAC0610_{HIS-35-880} a concentração de MgCl_2 na reação dever ser igual ou superior a 4 mM.

Como a dimerização é requerida para a atividade de DGC, uma vez que o sítio ativo (sítio A) é formado na interface de dimerização entre dois domínios GGDEF, ensaios para avaliar o efeito da concentração de proteína na atividade enzimática de XAC0610_{HIS-35-880} foram realizados (Figura 41). A Figura 41 (C) mostra que a atividade específica de XAC0610_{HIS-35-880} é relativamente constante em concentrações de enzima maior ou igual a 0,25 μM .

Figura 39 – Efeito de íons metálicos na atividade enzimática de XAC0610_{HIS-35-880}. A) Medidas da atividade enzimática de XAC0610_{HIS-35-880} na presença de 500 µM de

diferentes cátions divalentes. O efeito de vários cátions divalentes (500 μM) na atividade enzimática de XAC0610_{HIS-35-880} foi também avaliado quando adicionado um excesso de 2 mM magnésio (B) ou 2 mM manganês (C). As reações foram feitas em um volume de 50 μL contendo: 500 μM GTP; 20 mM Tris-HCl (pH 8,0); 0,5-2,5 mM cátions divalentes; 100 mM NaCl; 0,5 U/mL de pirofosfatase e 0,25 μM XAC0610_{HIS-35-880}. As reações foram incubadas a 30°C por 30 min e depois paradas pela adição de 10 μL de solução contendo 1 M Tris-HCl pH 6,5 e 60 mM MgCl_2 . Para permitir a completa degradação do PP_i pela pirofosfatase, as reações foram incubadas a 30 °C por mais 30 minutos antes da adição de 200 μL do reagente colorimétrico para detecção de fosfato inorgânico (P_i). Em todos os gráficos a atividade enzimática específica foi expressa em min^{-1} , ou seja, μM de $\text{PP}_i/\text{min}/\mu\text{M}$ de proteína total.

Figura 40 – Efeito da concentração de MgCl_2 na atividade enzimática de XAC0610_{HIS-35-880}. (A) Medidas da atividade enzimática de XAC0610_{HIS-35-880} ao longo do tempo em diferentes concentrações de MgCl_2 . (B) Medidas da velocidade inicial da reação de DGC em função da concentração de MgCl_2 . Os valores de velocidade inicial foram calculados pela análise da inclinação das retas obtidas em (A) assumindo uma concentração de proteína dimérica igual a 0,25 μM (equivalente à metade dos 0,5 μM de proteína total). As reações foram feitas em um volume de 50 μL contendo: 450 μM GTP; 20 mM Tris-HCl (pH 8,0); 0,5-8 mM MgCl_2 ; 100 mM NaCl; 1 U/mL de pirofosfatase e 0,5 μM XAC0610_{HIS-35-880} (proteína total). Reações independentes foram paradas em diferentes intervalos de tempo pela adição de 200 μL do reagente colorimétrico.

Figura 41 – Efeito da concentração de proteína na atividade enzimática de XAC0610_{HIS-35-880}. (A) Medidas da atividade enzimática ao longo do tempo em diferentes concentrações de XAC0610_{HIS-35-880}. (B) Medidas da velocidade inicial da reação de DGC em função da concentração de XAC0610_{HIS-35-880}. Os valores de velocidade inicial foram calculados pela análise da inclinação das retas obtidas em (A). As reações foram feitas em um volume de 50 μL contendo: 450 μM GTP; 20 mM Tris-HCl (pH 8,0); 5 mM MgCl_2 ; 100 mM NaCl; 1 U/mL de pirofosfatase e 0,0625-0,75 μM XAC0610_{HIS-35-880} (proteína total). Reações independentes foram paradas em diferentes intervalos de tempo pela adição de 200 μL do reagente colorimétrico. (C) Atividade enzimática específica em função da concentração de XAC0610_{HIS-35-880}. A atividade específica está expressa em min^{-1} , ou seja, μM de $\text{PP}_i/\text{min}/\mu\text{M}$ de proteína dimérica (equivalente à metade dos valores de proteína total indicados no gráfico).

4.3.6. Estudos de inibição pelo produto

Embora XAC0610 não apresente um sítio inibitório conservado (Figura 17, Tabela 7), experimentos de atividade enzimática de XAC0610_{HIS-35-880} com adição de c-di-GMP exógeno foram realizados para verificar a ausência de inibição pelo produto. As medidas da atividade enzimática de XAC0610_{HIS-35-880} ao longo do tempo na presença de diferentes concentrações de c-di-GMP (Figura 42 A) mostraram uma perfeita sobreposição dos dados obtidos utilizando 0-4 μ M c-di-GMP, e uma pequena redução de atividade na presença de 8 μ M c-di-GMP. Entretanto, a diferença na velocidade inicial da reação na ausência ou presença de 8 μ M c-di-GMP não foi significativa quando a reação foi acompanhada durante um intervalo de tempo maior (Figura 42 B). Curiosamente, um efeito inibitório da atividade de DGC foi observado quando XAC0610_{HIS-35-880} foi pré-incubada com c-di-GMP antes da adição do substrato (GTP). Como pode ser visto na Figura 42 C, a pré-incubação da enzima com 8 μ M c-di-GMP durante 3-10 min provoca uma diminuição na velocidade da reação de DGC, enquanto que a adição de c-di-GMP em uma mistura com GTP (0 min de pré-incubação, curva verde da Figura 42 C) não altera significativamente a velocidade da reação de DGC quando comparado com a reação controle sem a adição de c-di-GMP exógeno (compare as curvas verde e preta, respectivamente, na Figura 42 C). O efeito inibitório da atividade de DGC de XAC0610_{HIS-35-880} devido à pré-incubação com o c-di-GMP, ainda precisa ser mais profundamente estudada. Embora o c-di-GMP comercial (Kerafast) seja descrito contendo >95% de pureza, é possível que a presença de algum contaminante (como íons metálicos, por exemplo. Ver Figura 39), mesmo em pequenas

quantidades possa provocar efeitos adversos na atividade enzimática ou estabilidade da proteína XAC0610_{HIS-35-880}.

Figura 42 – Medidas da atividade enzimática de XAC0610_{HIS-35-880} ao longo do tempo na presença de diferentes concentrações de c-di-GMP. As reações foram feitas em um volume de 50 μL contendo: 20 mM Tris-HCl pH 8,0; 5 mM MgCl₂; 100 mM NaCl; 450 μM GTP; 0,5 μM XAC0610_{HIS-35-880}; 1 U/mL de pirofosfatase e a quantidade de c-di-GMP indicada na figura. As reações foram iniciadas pela adição de misturas GTP/c-di-GMP nas concentrações apropriadas. Reações independentes foram paradas pela adição de 200 μL do reagente colorimétrico em diferentes intervalos de tempo, 0-3,5 min (A) ou 0-7 min (B). Os valores da velocidade inicial da reação na ausência ou na presença de 8 μM c-di-GMP não foram significativamente diferentes de acordo com a análise da inclinação das retas obtidas em (B). C) Inibição da atividade de DGC de XAC0610_{HIS-35-880} após pré-incubação com c-di-GMP comercial (Kerafast). Reações de 50 μL contendo: 20 mM Tris-HCl pH 8,0; 5 mM MgCl₂; 100 mM NaCl; 0,5 μM XAC0610_{HIS-35-880} e 1 U/mL de pirofosfatase foram preparadas e pré-incubadas com 8

μM c-di-GMP por diferentes intervalos de tempo, 0-10 min, antes da adição de $450 \mu\text{M}$ GTP para o início da reação de DGC. Reações sem a adição de c-di-GMP externo foram também preparadas como controle (curva preta).

Para tentar observar evidências de uma possível interação entre c-di-GMP e XAC0610_{HIS-35-880}, que poderia justificar a ocorrência de algum efeito de inibição pelo produto, foram realizados experimentos de desnaturação térmica monitorada por dicroísmo circular. Como pode ser visto na Figura 43 não foi observada diferença na estabilidade de XAC0610_{HIS-35-880} quando os experimentos foram realizados na presença ou ausência de $50 \mu\text{M}$ c-di-GMP.

Figura 43 – Experimentos de desnaturação térmica de XAC0610_{HIS-35-880} na ausência (curva vermelha) ou na presença de $50 \mu\text{M}$ c-di-GMP (curva preta), analisados por dicroísmo circular a 222 nm. Os experimentos foram realizados utilizando $2 \mu\text{M}$ XAC0610_{HIS-35-880} em tampão $1,25 \text{ mM}$ Tris-HCl pH 8 e 5 mM NaCl. As amostras foram aquecidas a uma taxa de $0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

4.4. Estudos do estado oligomérico de XAC0610 em solução

4.4.1. Gel filtração analítica

As proteínas recombinantes XAC0610_{HIS-35-880} e XAC0610K759A_{HIS-35-880} foram analisadas por gel filtração analítica utilizando uma coluna Superdex 200 (GE Healthcare) de 220 mL. Ambas as proteínas recombinantes eluíram em um único pico após a passagem pela coluna (Figura 44). Para poder estimar o peso molecular de XAC0610_{HIS-35-880} e XAC0610K759A_{HIS-35-880} uma curva de calibração para a coluna foi obtida utilizando proteínas padrões que possuem peso molecular conhecido (Figura 45). De acordo com a curva de calibração obtida ambas as proteínas XAC0610_{HIS-35-880} e XAC0610K759A_{HIS-35-880} migram pela coluna com um peso molecular aparente de aproximadamente 360 kDa (Tabela 9). Como as formas monoméricas de XAC0610_{HIS-35-880} ou XAC0610K759A_{HIS-35-880} possuem um peso molecular predito de 94,4 kDa, o peso molecular estimado nas análises por gel filtração indicam inicialmente que as proteínas recombinantes possui uma estrutura quaternária tetramérica. Entretanto, como XAC0610 é uma proteína composta por seis domínios, é possível que ela adote uma conformação estendida que influencie sua migração pela coluna de gel filtração, resultando numa superestimação de seu peso molecular por esta técnica. Assim, a estequiometria do homo-oligômero de XAC0610 pode ser menor que quatro, sendo necessário o uso de outras técnicas para confirmar seu estado oligomérico.

Figura 44 – Análises das proteínas recombinantes XAC0610_{HIS-35-880} ou XAC0610K759A_{HIS-35-880} por cromatografia de exclusão molecular. Alíquotas de 500 μ L de amostra foram aplicadas, a um fluxo de 0,5 mL/min, em uma coluna Superdex 200 de 220 mL. As corridas foram realizadas em tampão contendo 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂ e GTP na concentração de 150 μ M, quando presente. O volume de retenção das proteínas foi monitorado a 280 nm. Na parte superior da figura estão indicados os volumes de retenção das proteínas padrões utilizadas para a obtenção da curva de calibração da coluna (Ver Figura 45).

Figura 45 – Curva de calibração da coluna Superdex 200 utilizada nas análises das proteínas recombinantes por gel filtração analítica. A curva de calibração foi obtida a partir de corridas cromatográficas utilizando padrões de peso molecular constituído por proteínas de 29-669 kDa (MWGF1000 Kit, Sigma-Aldrich). A estrela na figura representa a posição na curva ocupada pelos parâmetros experimentais obtidos para XAC0610_{HIS-35-880}. V_e = Volume de eluição. V_o = Volume de exclusão (void), determinado utilizando Blue Dextran (2,000 kDa). MW = Peso molecular.

Tabela 9 – Análise de proteínas recombinantes por gel filtração analítica

Proteína	Peso molecular estimado (kDa)
XAC0610 _{HIS-35-880} GTP/Mg ²⁺	363 ± 17
XAC0610 _{HIS-35-880} Mg ²⁺	359 ± 2
XAC0610K759A _{HIS-35-880} GTP/Mg ²⁺	362 ± 3
XAC0610K759A _{HIS-35-880} Mg ²⁺	365 ± 7

Análises por gel filtração analítica também foram realizadas com XAC0610_{HIS-35-880} ou XAC0610K759A_{HIS-35-880} na presença de 150 μ M GTP no tampão cromatográfico.

Como pode ser visto na Figura 44 e na Tabela 9, a presença de GTP não alterou o volume de eluição das proteínas recombinantes, mas interessante o cromatograma da eluição apresentou um segundo pico, com volume de eluição de aproximadamente 160 mL (Figura 44). Este segundo pico, provavelmente, corresponde a c-di-GMP devido a várias observações. Em primeiro lugar, o alto volume de eluição deste segundo pico indica provavelmente a presença de uma molécula com um peso molecular relativamente baixo (c-di-GMP possui um peso molecular de 690,4 g/mol). Em segundo lugar, a altura do pico é maior no cromatograma de XAC0610_{HIS-35-880}, que possui maior atividade de DGC comparado com a proteína mutante XAC0610K759A_{HIS-35-880} (Figura 36). Finalmente, a linha base observada no perfil cromatográfico de XAC0610_{HIS-35-880} na presença de GTP foi significativamente reduzida após o pico da proteína quando comparado com a linha base antes do pico da proteína. Esta redução na absorção a 280 nm pode ter sido causada pela conversão de GTP em c-di-GMP pela atividade de DGC da proteína durante a sua passagem pela coluna de gel filtração. Esta hipótese é suportada pela observação de que c-di-GMP, na presença de íons metálicos (i.e. Mg²⁺ presente no tampão de eluição), pode assumir diferentes formas oligoméricas, que apresentam menor absorção a 280 nm, quando comparadas ao GTP (Gentner et al., 2012).

4.4.2. Experimentos de ligação cruzada com glutaraldeído

Experimentos de ligação cruzada (“cross-linking”) de XAC0610_{HIS-35-880} com glutaraldeído foram realizados para obter mais informações sobre a estequiometria de oligomerização da proteína. Como pode ser observado na Figura 46, a incubação de

XAC0610_{HIS-35-880} com glutaraldeído resultou na formação de oligômeros de alta massa com maior magnitude na medida em que se aumentou o tempo de reação.

Figura 46 – Experimentos de ligação cruzada de XAC0610_{HIS-35-880} com glutaraldeído. A reação contendo 3 μ M XAC0610_{HIS-35-880} em tampão 25 mM Hepes pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,5 mM EDTA e 10% glicerol, foi pré-incubada por 10 min a 30°C. Glutaraldeído 0,001% foi adicionado e alíquotas da reação foram retiradas em diferentes intervalos de tempo (5-150 min, ver parte superior da figura) e analisadas por SDS-PAGE 6%. C1 = Reação controle sem adição de glutaraldeído. C2 = Reação controle com adição de glutaraldeído 0,001% e SDS 1%. As reações controle C1 e C2 foram preparadas independentemente e incubadas a 30°C por 90 min. M = Marcador de peso molecular (HiMark, Life Technologies).

Os valores da mobilidade eletroforética relativa (R_f) das bandas do marcador de peso molecular (HiMark, Life Technologies) foram utilizados pelo programa HiMark Molecular Weight Estimation (Life Technologies) para obter uma equação que relaciona $R_f \times \log MW$ (Figura 47) e assim poder estimar o peso molecular aparente dos produtos da reação de ligação cruzada entre XAC0610_{HIS-35-880} e glutaraldeído. A ligação cruzada de XAC0610_{HIS-35-880} com glutaraldeído resultou na formação de duas bandas principais (Figura 46), com peso molecular estimado de 177,7 e 214,3 kDa,

respectivamente. Ambos os oligômeros formados possuem cerca de duas vezes o peso molecular teórico de XAC0610_{HIS-35-880} (94,4 kDa), sugerindo uma estrutura quaternária dimérica para esta proteína. Um dos controles negativos utilizados, em que a reação de ligação cruzada com glutaraldeído foi realizada na presença de 1% SDS (canaleta C2, Figura 46) sugere que esta dimerização é dependente da conformação nativa da proteína.

Figura 47 – Curva padrão para estimar o peso molecular de proteínas em função da mobilidade relativa em SDS-PAGE. Os valores da mobilidade eletroforética relativa (Rf) das bandas do marcador de peso molecular na Figura 46 foram utilizados pelo programa HiMark Molecular Weight Estimation (Life Technologies, disponível em https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/HiMark_Calculator_V1.xls) para obter uma equação não linear que relaciona Rf x Log MW (logaritmo do peso molecular).

4.4.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante

Análises por eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante (Figura 48) mostraram que XAC0610_{HIS-35-880} em seu estado nativo apresenta uma migração

eletroforética similar a da proteína β -amilase (200 kDa). Enquanto que pela técnica de SDS-PAGE a mobilidade eletroforética de proteínas depende principalmente de sua massa molar, na eletroforese em gel nativo ou não-desnaturante, que é realizada na ausência de SDS, a separação de proteínas depende de ambos os fatores: seu tamanho hidrodinâmico e carga nativa. Isso significa que, apesar de apresentarem uma migração eletroforética similar, os oligômeros das proteínas XAC0610_{HIS-35-880} e β -amilase não necessariamente apresentam a mesma massa molar. Entretanto, como as proteínas XAC0610_{HIS-35-880} e β -amilase também apresentam uma predição da relação massa/carga bastante similar, -0,409 e -0,375, respectivamente (Tabela 10), é possível que o oligômero nativo de XAC0610_{HIS-35-880} possua realmente uma massa molar em torno de 200 kDa, indicando a formação de um dímero (o dímero de XAC0610_{HIS-35-880} possui uma massa molar predita de 188,9 kDa).

Alíquotas contendo 9 μ M de XAC0610_{HIS-35-880} foram incubadas em tampão contendo diferentes concentrações de ureia (0-8 M) e posteriormente analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante (Figura 49). A dissociação do oligômero de XAC0610_{HIS-35-880}, com o aumento da concentração de ureia, pôde ser observada através do aparecimento de uma banda com maior mobilidade eletroforética (Figura 49). A desestabilização do oligômero de XAC0610_{HIS-35-880} provocada por ureia foi maior na ausência do que na presença de 10 mM β -mercaptoetanol (compare a intensidade da banda de XAC0610_{HIS-35-880} maior mobilidade eletroforética nas Figuras 49 A e B).

Figura 48 – Análises de XAC0610_{HIS-35-880} por eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante. Alíquotas contendo 10 µg de XAC0610_{HIS-35-880} foram diluídas em diferentes volumes de tampão 20 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,2 mM EDTA e 10% glicerol. As amostras contendo 4-21 µM XAC0610_{HIS-35-880} (ver parte superior da figura) foram incubadas por 30 min a 30°C, transferidas para um banho de gelo, e analisadas por eletroforese em gel nativo 6%. Th = Tireoglobulina (669 kDa). Ap = Apoferitina (443 kDa). Ba = β-amilase (200 kDa). Ad = Álcool desidrogenase (150 kDa). Ab = Albumina (66 kDa).

Tabela 10 – Predição da relação massa/carga das proteínas analisadas em gel nativo

Proteína	Massa molar (kDa)		Carga estimada em pH 8,8 ^a	Relação carga/massa ^b
	Monômero ^a	Oligômero		
XAC0610 _{HIS-35-880}	94,45	189 (?)	-38,6	-0,409
Tireoglobulina	303,22	669	-133,4	-0,440
Apoferitina	19,85	443	-10,1	-0,509
β-amilase	55,98	200	-21	-0,375
Álcool desidrogenase	39,62	150	-14,3	-0,361
Albumina	69,29	66	-41,9	-0,605

^aValores calculados a partir da sequência primária das proteínas utilizando a ferramenta Protein Calculator v3.4, desenvolvida por Chris Putnam, Scripps Research Institute (<http://protpcalc.sourceforge.net/>).

^bRelação entre a carga estimada em pH 8,8 e a massa (kDa) da cadeia polipeptídica monomérica.

Figura 49 – Efeito da ureia e β -mercaptoetanol na análise de XAC0610_{HIS-35-880} por eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante. Alíquotas contendo 9 μ M de XAC0610_{HIS-35-880} foram preparadas em tampão 25 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, contendo diferentes concentrações de ureia (0-8 M, ver parte inferior da figura), na presença (A) ou na ausência (B) de 10 mM β -mercaptoetanol. As amostras foram incubadas no gelo por 16 h e analisadas por eletroforese em gel nativo 6%. Th = Tireoglobulina (669 kDa). Ap = Apoferritina (443 kDa). Ba = β -amilase (200 kDa). Ad = Álcool desidrogenase (150 kDa). Ab = Albumina (66 kDa).

4.4.4. Análises por espalhamento de luz dinâmico e estático

As análises por espalhamento de luz dinâmico (DLS) mostraram que a amostra de XAC0610_{HIS-35-880} apresenta uma distribuição por tamanho monomodal, com um diâmetro hidrodinâmico (Z-Average) de 15,87 nm e um índice de polidispersidade (Pdl) de 0,060 (Figura 50).

As análises por espalhamento de luz estático (SLS), utilizando diferentes concentrações de proteína (0,97-3,88 mg/mL), permitiram o cálculo de uma massa molar de 154 kDa para XAC0610_{HIS-35-880} com um segundo coeficiente virial (A_2) de $-1,93 \times 10^{-4}$ (Figura 51).

Figura 50 – Análise de XAC0610_{HIS-35-880} por espalhamento de luz dinâmico (DLS). A) Gráfico da função de auto-correlação da intensidade de luz dispersa. B) Curva de distribuição de tamanho (diâmetro hidrodinâmico em nm) baseado na intensidade de espalhamento (%). C) Histograma da distribuição de tamanho baseado na intensidade de espalhamento (%). A amostra apresentou um diâmetro hidrodinâmico (Z-Average) de 15,87 nm e um o índice de polidispersidade (Pdl) de 0,060. As medidas foram feitas a 30°C utilizando 2,5 mg/mL (26,5 μM) de XAC0610_{HIS-35-880} em tampão contendo 20 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 2 mM β-Mercaptoetanol e 5% glicerol.

Figura 51 – Análise de XAC0610_{HIS-35-880} por espalhamento de luz estático (SLS). As medidas de intensidade de luz espalhada (Razão de Rayleigh, R_θ) em função da concentração da amostra (em verde) foram utilizadas para a obtenção do gráfico de Debye (em vermelho). A regressão linear do gráfico de Debye ($R^2 = 0,955$) permitiu o cálculo de uma massa molar de $154 \pm 3,64$ kDa (intercepto no eixo y) e de um segundo coeficiente virial (A_2) igual a $-1,93e-4 \pm 2,97e-5$ (inclinação da reta) para a amostra de XAC0610_{HIS-35-880}. Os dados foram analisados assumindo um incremento no índice de refração (dn/dc) igual a 0,185 mL/g. As medidas foram realizadas a 25°C utilizando diferentes concentrações de XAC0610_{HIS-35-880} (0,97-3,88 mg/mL) em tampão contendo 25 mM Tris-HCl pH 8 e 100mM NaCl. kcps = kilocount per second.

4.4.5. Análises por SEC-MALS

Análises por cromatografia de exclusão molecular acoplada a um detector de espalhamento de luz em multi-ângulos (SEC-MALS) foram também realizadas para determinar a massa molar de XAC0610_{HIS-35-880} em solução. A Figura 52 mostra a distribuição da massa molar calculada ao longo do pico de eluição de XAC0610_{HIS-35-880} para um típico experimento de SEC-MALS em que uma amostra contendo 1,0 mg/mL (cerca de 10 μ M, considerando a massa molar teórica para o monômero de

XAC0610_{HIS-35-880}) foi aplicada na coluna e uma massa molar média de 182 kDa foi obtida. Resultados similares foram obtidos quando as análises foram realizadas utilizando 0,5 mg/mL (5 μ M) ou 5 mg/mL (50 μ M) de proteína (Tabela 11). Estes resultados indicam que a estequiometria do homo-oligômero de XAC0610_{HIS-35-880} é predominantemente dimérica em concentrações micromolares de proteína.

Figura 52 – Determinação da massa molar de XAC0610_{HIS-35-880} por SEC-MALS. Uma alíquota de 500 μ L de amostra (1,0 mg/mL) foi aplicada em uma coluna Superdex 200 (GE Healthcare) acoplada em série com os sistemas miniDAWN TREOS multi-angle light scattering (MALS) detector e Optilab rEX refractive index detector (Wyatt Technology Corp). Os círculos vazios representam a distribuição da massa molar calculada ao longo do pico de eluição de XAC0610_{HIS-35-880} monitorado a 280 nm (linha contínua). XAC0610_{HIS-35-880} apresentou uma massa molar média de 182 kDa e uma polidispersidade de 1,02 ($\pm$ 3%).

Tabela 11 – Análises de XAC0610_{HIS-35-880} por SEC-MALS.

Concentração da amostra injetada	0,5 mg/mL	1,0 mg/mL	5,0 mg/mL
Massa Molar (M_w)	173,5 ± 5,7 kDa	182,2 ± 4,4 kDa	182,1 ± 0,7 kDa
Polidispersidade (M_w/M_n)	1,008 ± 4,1%	1,024 ± 3,4%	1,016 ± 0,6%

4.4.6. Análises por fluorescência

Medidas de fluorescência intrínseca foram realizadas para tentar detectar alterações do estado oligomérico de XAC0610_{HIS-35-880} em baixas concentrações de proteína (1 μ M a 58,5 nM) (Figura 53 A). Entretanto a intensidade de fluorescência intrínseca detectada se mostrou diretamente proporcional à concentração de XAC0610_{HIS-35-880} (Figura 53 B), indicando que não há alteração no ambiente químico de resíduos de triptofano devido a mudança no estado oligomérico da proteína ou que não houve alterações no estado oligomérico XAC0610_{HIS-35-880} na faixa de concentração testada.

4.5. Cinética enzimática de XAC0610

As propriedades cinéticas de XAC0610_{HIS-35-880} foram estudadas pela medida da velocidade inicial (V_0) da reação de DGC utilizando diferentes concentrações de substrato (9,4-450 μ M). Os dados obtidos não puderam ser ajustados satisfatoriamente à curva de Michaelis-Menten, pois apresentaram um comportamento levemente sigmoidal ao invés de hiperbólico (Figura 54 A). Além disso, o gráfico de duplo recíproco mostrou uma relação parabólica entre $1/V_0$ e $1/[S]$ (Figura 54 B), ao contrário da relação linear esperada para o modelo de Michaelis-Menten. Mesmo os dados podendo ser ajustados à equação de Hill, com um coeficiente de Hill de 1,6 (Figura 55),

o modelo de Hill não é apropriado para descrever o mecanismo de ação enzimática das DGCs, que possuem características particulares.

Figura 53 – Análises da fluorescência intrínseca de XAC0610_{HIS-35-880}. A) Espectros de fluorescência da amostra em função da redução da concentração de

proteína (1 μM a 58,5 nM). As amostras foram pré-equilibrada a 25 °C por 5 minutos, excitada a 285 nm, e a fluorescência foi detectada entre 290-420 nm, com intervalos de 1 nm, utilizando uma cubeta de 10 mm. B) Dependência da fluorescência máxima com a concentração de XAC0610_{HIS-35-880}. As medidas de intensidade máxima de fluorescência, coletadas a 337 nm, apresentaram uma correlação linear ($R^2 = 0,999$) com a concentração de XAC0610_{HIS-35-880}. u.a. = unidades arbitrárias.

Figura 54 – Cinética enzimática de XAC0610. (A) Medidas da velocidade inicial da reação de DGC catalisada por XAC0610_{HIS-35-880}. (B) Gráfico de duplo recíproco ($1/V_0$ vs $1/[S]$) dos dados cinéticos de XAC0610_{HIS-35-880}. As reações foram feitas a 30°C em um volume de 50 μL contendo: 9,4 - 450 μM GTP, 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM MgCl_2 , 100 mM NaCl; 1 U/mL de pirofosfatase e 0,75 μM XAC0610_{HIS-35-880}. As medidas de velocidade inicial foram expressas em função do k_{cat} (min⁻¹), assumindo uma concentração de proteína dimérica igual a 0,375 μM (equivalente à metade de 0,75 μM de proteína total). Para o cálculo das constantes cinéticas (Tabela 12) os dados foram ajustados ao modelo cinético para a atividade de DGC (curva preta), utilizando as Equações 5 e 6 (Ver material e métodos, seção 3.9.5.). Os dados também foram ajustados à equação de Michaelis-Menten (curva azul) ou ao modelo cinético para a atividade de DGC com a restrição $K_1 = K_2$ (curva vermelha). (C) Modelo cinético para a

atividade de DGC de XAC0610. “E” representa uma proteína previamente dimerizada (homodímero). “S” representa o substrato (GTP) e “P” representa os produtos da reação de DGC (c-di-GMP + 2PP_i). Assumindo que os dois domínios GGDEF de XAC0610 são cineticamente equivalentes, eles podem se ligar a primeira molécula de GTP com a mesma afinidade K_1 . A segunda molécula de GTP liga-se ao segundo domínio GGDEF com uma afinidade K_2 .

Figura 55 – Análise dos dados cinéticos de XAC0610_{HIS-35-880} utilizando o modelo de Hill. Os dados cinéticos de XAC0610_{HIS-35-880} podem ser bem ajustados, tanto ao modelo cinético proposto para as DGCs, quanto à equação de Hill. Compare as curvas preta (modelo cinético de DGC, Equações 5 e 6) e verde (modelo de Hill). Com a análise dos dados pela equação de Hill obtém-se um coeficiente de Hill (n) de 1,6 ($\pm 0,1$), $k_{cat} = 61$ (± 1) min^{-1} e $K_d = 42$ ($\pm 1,5$) μM . Os dados cinéticos de XAC0610_{HIS-35-880} representados no gráfico foram obtidos utilizando 0,75 μM de proteína total (equivalente a 0,375 μM de proteína dimérica), e estão descritos na Tabela 12.

Na Figura 54 (C) está representado um mecanismo cinético básico que deve ser comum a todas as DGCs (Chan et al., 2004, Wassmann et al., 2007). Este mecanismo envolve a união de duas moléculas de substrato idênticas, por meio da ligação de cada uma destas moléculas a uma metade do sítio ativo formada entre dois domínios GGDEF. De acordo com a nomenclatura introduzida por Cleland (Cleland, 1963, Purich, 2010), as DGCs são enzimas Bi Ter (dois substratos, três produtos). O mecanismo

representado na Figura 54 (C) descreve um modelo de ligação, sequencial e aleatória, de dois substratos idênticos a dois domínios GGDEF equivalentes que se juntam para formar um sítio ativo simétrico (Chan et al., 2004, Wassmann et al., 2007, Schirmer & Jenal, 2009, Giardina et al., 2013). Por outro lado, o mecanismo representado na Figura 54 (C) não trata da questão da liberação dos produtos, se é aleatória ou ordenada, e nem propõe detalhes sobre as etapas de formação e quebra de ligações durante a conversão dos substratos em produtos, mais especificamente, se os dois ataques nucleofílico 3'-OH sobre os α -fosfatos (que levam à formação das ligações fosfodiésteres) são simultâneos ou se há formação de uma molécula de pppGpG intermediária (ver Ross et al. (1987) para evidências de tal molécula intermediária e Wassmann et al. (2007) para modelos propostos para um dímero de domínios GGDEF ligado a substratos e produtos).

Assumindo as condições de equilíbrio rápido e estado estacionário, o mecanismo representado na Figura 54 (C) é descrito pelas equações 5 ou 6 (ver Material e Métodos, seção 3.9.5.). O ajuste dos dados cinéticos de XAC0610_{HIS-35-880} as equações 5 ou 6 (Figura 54 A e B) permitiu o cálculo dos parâmetros cinéticos K_1 , K_2 e k_{cat} , utilizando diferentes concentrações de enzima (Tabela 12). À luz do mecanismo cinético proposto para a reação de DGC, descrito na Figura 54 (C), o valor de aproximadamente 3 - 5 para a razão K_1/K_2 (Tabela 12) implica que XAC0610 exibe um comportamento cooperativo com relação à ligação ao substrato.

Tabela 12 – Parâmetros cinéticos calculados para XAC0610_{HIS-35-880} e seu mutante K759A.

	XAC0610 _{HIS-35-880} (0,25 µM)			XAC0610 _{HIS-35-880} (0,5 µM)			XAC0610 _{HIS-35-880} (0,75 µM)			XAC0610-K759A _{HIS-35-880} (2,5 µM)		
	Michaelis-Menten	Cooperativo ($K_1 \neq K_2$)	Não-cooperativo ^b ($K_1 = K_2$)	Michaelis-Menten	Cooperativo ($K_1 \neq K_2$)	Não-cooperativo ^b ($K_1 = K_2$)	Michaelis-Menten	Cooperativo ($K_1 \neq K_2$)	Não-cooperativo ^b ($K_1 = K_2$)	Michaelis-Menten	Cooperativo ($K_1 \neq K_2$)	Não-cooperativo ^b ($K_1 = K_2$)
K_M (µM)	25±2,3 [22±1,5] ^c	-	-	47±5,3 [38±3,1] ^d	-	-	61±8,1 [47±4,3] ^e	-	-	38±4,3 [30±2,7] ^f	-	-
K_1 (µM)	-	26±11 [21±6,7] ^c	9,7±0,5 [9,2±0,3] ^c	-	38±13 [41±8,6] ^d	18±1,1 [17±1] ^d	-	67±27 [61±13] ^e	23±1,6 [20±1,2] ^e	-	64±25 [59±12] ^f	15±1,0 [13±0,7] ^f
K_2 (µM)	-	7,0±1,3 [7,7±0,8] ^c	9,7±0,5 [9,2±0,3] ^c	-	13±2,5 [12±1,2] ^d	18±1,1 [17±1] ^d	-	13±3,8 [14±1,5] ^e	23±1,6 [20±1,2] ^e	-	7,6±1,7 [7,8±0,7] ^f	15±1,0 [13±0,7] ^f
K_1/K_2	-	3,8±1,6 [2,7±0,8] ^c	1	-	3,0±1,1 [3,4±0,7] ^d	1	-	5,5±2,6 [4,4±0,9] ^e	1	-	8,7±3,6 [7,6±1,5] ^f	1
V_{max} (µM/min)	8,4±0,2	8,0±0,2	8,1±0,1	17±0,6	15±0,5	16±0,4	27±1,2	24±1,3	26±0,9	1,05±0,03	0,96±0,02	1,04±0,03
k_{cat} ^a (min ⁻¹)	67±1,6	64±1,3	65±0,9	67±2,4	62±1,8	65±1,6	72±3,2	65±2,5	70±2,3	0,84±0,03	0,77±0,02	0,83±0,02

^aCalculado assumindo 100% das proteínas dimerizadas (equivalente à metade da concentração de proteína total, indicada na parte superior da tabela).

^bOs dados foram ajustados ao modelo cinético de DGC impondo a restrição $K_1 = K_2$.

^{c,d,e,f}Valores obtidos para as constantes de equilíbrio quando k_{cat} é fixado em 64, 62, 65 ou 0,77 min⁻¹, respectivamente.

O valor de k_{cat} , aproximadamente $62\text{-}65\text{ min}^{-1}$ (Tabela 12), foi razoavelmente bem determinado utilizando diferentes concentrações de XAC0610_{HIS-35-880} (0,25 - 0,75 μM de proteína total) e concentrações saturantes de GTP. Entretanto, os valores das constantes de equilíbrio K_1 e K_2 se mostraram mais difíceis de serem determinados com precisão utilizando os dados disponíveis. As Figuras 56 (A) e (B) mostram que, mesmo assumindo $K_1 > K_2$, diferentes combinações de valores para K_1 e K_2 podem ser utilizadas para a obtenção de curvas de simulação cinética que se ajustam bem aos dados experimentais, indicando que os valores relatados na Tabela 12 são provavelmente imprecisos. Os dados cinéticos também podem ser ajustados a um modelo não-cooperativo, impondo a restrição $K_1 = K_2$ (Tabela 12). No entanto, este modelo não-cooperativo não se ajusta tão bem aos dados experimentais como o modelo cooperativo, em que K_1 é maior que K_2 (compare as curvas preta e vermelha, cooperativo e não-cooperativo, respectivamente, nas Figuras 54 A e B). Simulações cinéticas assumindo uma ligação anti-cooperativa dos substratos, em que $K_1 < K_2$, são ainda menos satisfatórias na modelagem dos dados (Figura 56 C e D). Estas observações indicam que, apesar das constantes K_1 e K_2 não poderem ser calculadas com precisão, a relação $K_1 > K_2$ é a que melhor se ajusta aos dados experimentais, revelando assim um mecanismo de cooperatividade positiva de ligação dos substratos ao sítio ativo, onde a primeira molécula de substrato se liga com uma afinidade relativamente baixa a um dos domínios GGDEF seguida por uma segunda molécula de substrato com maior afinidade para o domínio GGDEF adjacente.

Figura 56 – Simulações cinéticas. Os dados cinéticos experimentais de XAC0610_{HIS-35-880} foram comparados com curvas de simulação cinética obtidas utilizando o modelo proposto para DGC (Eq. 5 e 6) ou o modelo de Michaelis-Menten. (A e B) Simulações para $K_1 > K_2$. (C e D) Simulações para $K_1 < K_2$. Os valores de K_1 e K_2 utilizados para a obtenção das curvas de simulação estão indicados na figura. k_{cat} foi fixado a 65 min^{-1} em todas as simulações. Para as simulações com o modelo de Michaelis-Menten K_M foi fixado a $47 \mu\text{M}$ (ver Tabela 12). Os dados cinéticos de XAC0610_{HIS-35-880} representados nos gráficos (quadrados pretos) foram obtidos utilizando $0,75 \mu\text{M}$ de proteína total (equivalente a $0,375 \mu\text{M}$ de proteína dimérica).

Figura 57 – Modelo proposto por Wassmann et al. (2007) para o dímero cataliticamente competente dos domínios GGDEF de PleD em complexo com GTP (A) ou c-di-GMP e pirofosfato (B). O modelo foi baseado na estrutura cristalográfica de PleD em complexo com GTP α S (Wassmann et al., 2007). Resíduos de aminoácidos

possivelmente envolvidos na catálise (D327, E332, E370 e E371) estão representados na forma de bastonetes.

Embora uma estrutura em alta resolução ainda não tenha sido obtida para a conformação dimérica cataliticamente competente de uma DGC, foi sugerido que a Lys332 de PleD poderia estar envolvida na estabilização do grupo abandonador (pirofosfato) da molécula de GTP ligado ao domínio GGDEF adjacente (Figura 57) (Wassmann et al., 2007). Para verificar se o resíduo de aminoácido correspondente em XAC0610 (Lys759) (Figura 76 C) pode contribuir para a cooperatividade através de contatos inter-domínios no dímero ativado, foi realizada uma mutação sítio-dirigida para substituir a Lys759 de XAC0610 para alanina (Figura 30). Os dados cinéticos obtidos com a proteína mutante XAC0610-K759A_{HIS-35-880} (Tabela 12) demonstraram que a substituição K759A resultou numa grande redução da atividade enzimática, com um valor de k_{cat} quase 100 vezes menor que o da proteína tipo selvagem (XAC0610_{HIS-35-880}). Apesar da razão K_1/K_2 ter aumentado um pouco (Tabela 12), esta grande redução de magnitude do k_{cat} indica que a Lys759 tem um papel mais importante na catálise da reação do que na modulação da cooperatividade.

4.6. Caracterização funcional de XAC0610

4.6.1. Produção da linhagem nocaute *Xac*Δ0610

O nocaute do gene *xac0610* foi obtido por recombinação homóloga utilizando o vetor pNPTSΔ0610 (Tabela 3). Na linhagem *Xac*Δ0610 o gene *xac0610* foi substituído por uma cópia truncada em que a região que codifica para os resíduos de aminoácidos 15 a 868 da proteína selvagem foi deletada.

Figura 58 – Verificação do nocaute de *xac0610*. A) PCR utilizando o par de oligonucleotídeos $\Delta 0610_upFwd_HindIII$ e *0610-HindIII Rev*. A seta branca indica a posição da banda esperada de ~3,6 kb na linhagem selvagem (Wt). A seta preta indica a posição da banda esperada de ~1 kb nas linhagens mutantes *Xac* $\Delta 0610$ (1, 5, 10, 13, 15 e 16). B) PCR utilizando o par de oligonucleotídeos *0610-GAF-NdeI Fwd* e *Rev314_1PAS_0610_HindIII*. A seta branca indica a posição da banda esperada de 862 pb na linhagem selvagem. A ausência desta banda na linhagem mutante confirma a deleção do gene *xac0610*. (M) = Marcador de peso molecular; (1), (5), (10), (13), (15) e (16) = Identificação das colônias de bactérias candidatas a possuírem o genótipo *Xac* $\Delta 0610$. Em (B) as amostras foram aplicadas no topo (M, Wt, 1, 5 e 10) ou no meio (M, 13, 15 e 16) do gel.

Após seleção apropriada das colônias de *Xac* candidatas a possuírem o gene *xac0610* inativado (duas etapas de seleção como descrito no Material e Métodos), a confirmação da obtenção da linhagem mutante foi feita por PCR. Nas reações da PCR utilizando o par de oligonucleotídeos $\Delta 0610_upFwd_HindIII$ e *0610-HindIII Rev*, capaz de amplificar a ORF do gene *xac0610* (2643 pb) mais uma região “upstream” de aproximadamente 1 kb, foi verificada a presença dos fragmentos de DNA esperados de ~3,6 kb na linhagem selvagem (Wt) e ~1 Kb nas linhagens mutantes (Figura 58 A). Além disso, nas reações da PCR utilizando o par de oligonucleotídeos *0610-GAF-NdeI Fwd* e *Rev314_1PAS_0610_HindIII*, capaz de amplificar uma região interna a ORF de *xac0610* (correspondente aos resíduos de aminoácidos 35 a 314), foi verificada a

presença do fragmento de DNA esperado de 862 pb na linhagem selvagem e a ausência deste fragmento nas linhagens mutantes (Figura 58 B).

4.6.2. Ensaios fenotípicos com a linhagem nocaute *Xac*Δ0610

Com a confirmação da obtenção da linhagem mutante *Xac*Δ0610, ensaios fenotípicos foram realizados a fim de investigar o papel funcional da proteína XAC0610. Em ensaios de motilidade em meio SB semi-sólido (0,5% ágar) foi verificado que o nocaute do gene *xac0610* provoca um maior espalhamento da colônia de *Xac* na superfície do meio quando comparada a linhagem selvagem (Figura 59 A). Apesar de não haver diferença na motilidade entre o selvagem e o mutante em meio SB sólido (1,5% ágar) (Figura 60 B), a maior motilidade da linhagem *Xac*Δ0610 em meio semi-sólido parece não ser dependente de flagelo (motilidade Swimming ou Swarming) pois neste mesmo ensaio não é verificada diferença na motilidade entre a linhagem selvagem e o mutante não flagelado Δ*fliC* (Figura 60 A).

Em ensaios em placas contendo carboximetilcelulose (CMC) como substrato, não foram verificadas alterações na atividade de endoglucanases extracelulares produzidas pela cultura de *Xac*Δ0610 comparada com a linhagem selvagem (Figura 61). Entretanto, análises da atividade de proteases extracelulares indicaram que o nocaute do gene *xac0610* afetou positivamente a produção de proteases extracelulares de *Xac* (Figura 62 A).

Figura 59 – Ensaio de motilidade em meio SB semi-sólido. Culturas de *Xac* foram crescidas em meio 2xTY até DO_{600nm} de 0,5 e 4 μ L da cultura foram inoculados em um único ponto em placas de meio SB contendo 0,5 % bacto-ágar. As placas foram incubadas a 30 °C durante 48h. A) O nocaute do gene *xac0610* provoca um aumento na motilidade de *Xac*. Os ensaios foram realizados em meio SB semi-sólido suplementado com 100 μ g/mL de ampicilina. B) Complementação da linhagem *XacΔ0610* com o gene selvagem, ou com versões mutantes do gene *xac0610*, sobre controle de seu promotor nativo. Os ensaios foram realizados em meio SB semi-sólido suplementado com 100 μ g/mL de ampicilina e 10 μ g/mL de gentamicina.

Figura 60 – Avaliação do papel do flagelo na motilidade de *Xac* em meio SB. A) Ensaio de motilidade em meio SB semi-sólido (0,5% bacto-ágar). B) Ensaio de motilidade em meio SB sólido (1,5% bacto-ágar).

Figura 61 – Ensaio da atividade de endoglucanases extracelulares. Culturas de *Xac* foram crescidas em meio 2xTY até DO_{600nm} de 0,5 e 4 μ L da cultura foram inoculados em um único ponto em placas com meio TYE-ágar suplementado com 0,5 % de carboximetilcelulose (CMC) e 100 μ g/mL de ampicilina. As placas foram incubadas a 30 °C durante 48h e depois coradas com vermelho congo 0,1 %. O nocaute do gene *xac0610* não apresentou alteração significativa na atividade de endoglucanases extracelulares.

Em ensaios de virulência em plantas de citrus não foi verificada diferença nos sintomas característicos do desenvolvimento do cancro cítrico (encharcamento, hiperplasia, clorose e necrose) provocados pela linhagem selvagem (Wt) ou *Xac*Δ0610, utilizando o método de inoculação testado (Figura 63). Também não foram observadas

diferenças significativas entre a linhagem selvagem (Wt) e *Xac*Δ0610 em ensaios de formação de biofilme em superfície abiótica (Figura 69 A e B).

Figura 62 – Ensaio da atividade de proteases extracelulares. Culturas de *Xac* foram crescidas em meio 2xTY até DO_{600nm} de 0,5 e 4 μ L da cultura foram inoculados em um único ponto em placas com meio de cultura apropriado. As placas foram incubadas a 30 °C durante 48h. A) O nocaute do gene *xac0610* resultou em um aumento na atividade de proteases extracelulares comparado com a linhagem selvagem (Wt). Os ensaios foram realizados em meio TYE-água suplementado com 1 % de leite desnatado e 100 μ g/mL de ampicilina. B) Complementação da linhagem *Xac*Δ0610 com o gene selvagem, ou com versões mutantes do gene *xac0610*, sobre controle de seu promotor

nativo. Os ensaios foram realizados em meio TYE-ágar suplementado com 1 % de leite desnatado, 100 µg/mL de ampicilina e 10 µg/mL de gentamicina. O halo transparente ao redor das colônias de *Xac* indica a degradação da caseína presente no leite.

Para avaliar se XAC0610 pode fazer parte do sistema de defesa de *Xac* contra o estresse oxidativo, estudos de sobrevivência bacteriana na presença de H_2O_2 foram realizados com as linhagens de *Xac*. A linhagem nocaute *Xac*Δ0610 é mais suscetível ao tratamento por 15 min com 1 mM de H_2O_2 que a linhagem selvagem (Wt). Enquanto 35 % das células do tipo selvagem sobreviveram ao tratamento, somente 10 % das células de *Xac*Δ0610 sobreviveram (Figura 64). Estes resultados indicam que XAC0610 pode estar envolvida na proteção de *Xac* contra o estresse oxidativo.

Figura 63 – Ensaio de virulência em plantas de citrus. Uma pequena quantidade de suspensão bacteriana, DO_{600nm} de 0,1, foi injetado por pressão na face abaxial da folha utilizando seringa sem agulha. A linhagem *Xac*Δ0610 foi inoculada a esquerda da folha e a linhagem selvagem (Wt) à direita. Foram utilizadas plantas da variedade Pera Rio, Poncán e Limão Siciliano. Fotografias da infecção foram registradas após 6 dias (painel superior) e 13 dias (painel inferior) a partir da inoculação.

4.6.3. Complementação da linhagem nocaute *Xac*Δ0610

O vetor pUFR0610, contendo o gene *xac0610* sob controle de seu promotor nativo (seção 3.10.2), foi utilizado para complementar a linhagem nocaute *Xac*Δ0610.

Em ensaios de motilidade em meio SB semi-sólido foi verificado que a linhagem complementada *Xac*Δ0610 + XAC0610 (Figura 65) possui menor motilidade que a linhagem selvagem transformada com o vetor pUFR047 vazio (Figura 59 B). Este fenótipo pode ter sido causado pela complementação de *Xac*Δ0610 a partir do gene clonado em um plasmídeo replicativo, o que faz com que o gene *xac0610* esteja presente em um maior número de cópias que na cepa selvagem. Embora, estudos em *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* relatem que o vetor pUFR047 se mantém em baixo número de cópias na bactéria (De Feyter et al., 1993).

A linhagem complementada *Xac*Δ0610 + XAC0610 também foi utilizada para avaliar a restauração do fenótipo de maior suscetibilidade a peróxido de hidrogênio apresentado pela linhagem nocaute *Xac*Δ0610. Ensaios de sobrevivência a 1 mM de H₂O₂ durante 15 min mostraram que a linhagem complementada *Xac*Δ0610 + XAC0610 é quase duas vezes mais resistente ao tratamento com peróxido que a própria linhagem selvagem (Figura 64). Este resultado também pode ser consequência do maior número de cópias do gene *xac0610* na linhagem complementada *Xac*Δ0610 + XAC0610.

A linhagem *Xac*Δ0610 também foi complementada com versões mutantes do gene *xac0610* (Figura 65). Mutações sítio dirigidas foram realizadas no gene de XAC0610 para alterar o sítio ativo da enzima de AGDEF para AGAAF e desta forma eliminar sua atividade de diguanilato ciclase. O gene mutado foi utilizado para complementar a linhagem nocaute *Xac*Δ0610 a fim de investigar se os fenótipos

observados são provocados especificamente por XAC0610 ou se eles podem ser consequência da simples alteração dos níveis intracelulares de c-di-GMP.

A linhagem *Xac*Δ0610 + D797A/E798A, que codifica uma enzima cataliticamente inativa, apresentou um fenótipo de motilidade reduzida em meio SB semi-sólido (Figura 59 B), indicando que XAC0610 regula negativamente a motilidade de *Xac* de forma independente da sua atividade de DGC. O mesmo fenótipo de motilidade reduzida foi observado também com a linhagem *Xac*Δ0610 + GAF_PAS(A-D) (Figura 59 B), contendo um fragmento do gene *xac0610* que codifica apenas para os domínios GAF_PAS(A-D) do N-terminal da proteína (resíduos 1-701). Por outro lado, um fenótipo de aumento da motilidade (igual ao observado para a cepa nocaute) foi observado com a linhagem *Xac*Δ0610 + GGDEF (Figura 59 B), que codifica apenas para o domínio GGDEF C-terminal de XAC0610. Estes resultados indicam que os domínios GAF e PAS de XAC0610 de alguma maneira inibem a motilidade de *Xac* em meio SB semi-sólido.

Em ensaios de sobrevivência a 1 mM de H₂O₂ durante 15 min foi observado que a linhagem *Xac*Δ0610 + D797A/E798A apresenta a mesma suscetibilidade ao tratamento com peróxido que a linhagem nocaute *Xac*Δ0610 (Figura 64), indicando que o fenótipo de resistência de *Xac* a H₂O₂ é dependente da atividade de DGC de XAC0610. Para avaliar se o fenótipo observado de resistência de *Xac* a H₂O₂ está relacionado apenas com a atividade de DGC XAC0610, ensaios de sobrevivência celular a H₂O₂ também foram realizados com a linhagem nocaute *Xac*Δ*RpfG*, que não possui o gene da fosfodiesterase de c-di-GMP *RpfG* (contendo um domínio HD-GYP). Como mostrado na Figura 64, a linhagem *Xac*Δ*RpfG* apresentou um fenótipo de alta sobrevivência celular ao tratamento com H₂O₂, em comparação com a linhagem selvagem (Wt). Resultados semelhantes também foram obtidos com células

superexpressando a diguanilato ciclase XAC2810, contendo um domínio GGDEF conservado (Figura 64). Estes resultados indicam que o aumento da proteção de *Xac* contra H_2O_2 pode estar correlacionado com o aumento dos níveis intracelulares de c-di-GMP, em células com um domínio GGDEF funcional de XAC0610.

Nenhuma das construções utilizadas foi capaz de restaurar o fenótipo da linhagem selvagem de *Xac* em ensaios de atividade de proteases extracelulares (Figura 62 B), indicando que XAC0610 não afeta diretamente a produção de proteases extracelulares de *Xac*, e talvez a ausência do fragmento de DNA correspondente ao gene *xac0610* pode ter causado alterações na expressão gênica de genes adjacentes, como a protease XAC0609 (Figura 77 e Tabela 17).

Figura 64 – Avaliação da susceptibilidade bacteriana ao tratamento com H_2O_2 . Culturas de *Xac* foram crescidas em meio 2xTY a 30 °C e 200 rpm até DO_{600nm} de 0,5. Após o crescimento uma alíquota de cada cultura foi retirada, diluída e plaqueada (Controle não tratado). Um milimolar de H_2O_2 foi adicionado à cultura e esta foi incubada por mais 15 min a 30 °C e 200 rpm. Uma nova alíquota foi retirada, diluída e plaqueada. As placas foram incubadas a 30 °C por 48h e as colônias sobreviventes

foram contadas. A porcentagem de sobrevivência foi calculada dividindo o número de UFC obtido após o tratamento com peróxido de hidrogênio pelo número de UFC obtido no controle não tratado. Nos ensaios com a linhagem *Xac* Wt + XAC2810 (coluna verde) foi adicionado ao meio de cultura 0,3 % de L-arabinose para promover a superexpressão do gene *xac2810*.

Figura 65 – Linhagens de *Xac* utilizadas para verificar a complementação dos fenótipos apresentados pela linhagem nocaute *Xac*Δ0610. A linhagem *Xac*Δ0610 foi transformada com plasmídeos (indicados na figura) contendo o gene *xac0610* selvagem ou com mutações no sítio ativo (aGDEF para aGaaF). A linhagem *Xac*Δ0610 também foi complementada apenas com fragmentos do gene *xac0610*, que codificam para os domínios GAF_PAS(A-D) do N-terminal da proteína ou o domínio GGDEF C-terminal. Todas as construções foram feitas utilizando o promotor nativo do gene *xac0610*.

4.6.4. Ensaios de duplo-híbrido utilizando XAC0610 como isca

Regiões codificadoras do gene *xac0610* correspondentes aos resíduos de aminoácidos 2-880, 2-476, 452-722 ou 698-880 (Tabela 13) foram clonadas no vetor pOBD para serem utilizadas em ensaios de interação proteína-proteína por duplo-híbrido em leveduras. As células de leveduras transformadas com os vetores correspondentes foram inoculadas em meio de cultura sem histidina para verificar a possibilidade de auto-ativação do gene repórter *HIS3* pela própria proteína isca. A auto-ativação do gene repórter *HIS3* foi observada para as construções XAC0610(aa2-880)

e XAC0610(aa2-476) (Tabela 13), onde as leveduras transformadas apresentaram crescimento em meio Sc-WH ágar mesmo com a adição de 200 mM 3-AT (inibidor competitivo na biossíntese de histidina). Por outro lado, as construções XAC0610(aa452-722), contendo os domínios PAS_C e PAS_D, e XAC0610(aa698-880), contendo apenas o domínio GGDEF, não apresentaram auto-ativação (Tabela 13), e foram utilizadas nas triagens da biblioteca genômica de *Xac*.

Tabela 13 – Resultado dos ensaios de auto-ativação do gene repórter *HIS3* pelas construções contendo fragmentos do gene *xac0610* ligados em pOBD.

Construção		Auto-ativação
	0610 ₂₋₈₈₀	sim
	0610 ₂₋₄₇₆	sim
	0610 ₄₅₂₋₇₂₂	não
	0610 ₆₉₈₋₈₈₀	não

Nos ensaios de duplo-híbrido utilizando XAC0610(aa452-722) ou XAC0610(aa698-880) como iscas (Tabela 15 e Tabela 14, respectivamente) foram observados uma alta frequência de presas consideradas possivelmente falso-positivas em trabalhos anteriores utilizando esta mesma biblioteca genômica de *Xac* (Alegria et al., 2004, Docena, 2006). São consideradas presas falso-positivas aquelas que aparecem com frequência nos ensaios utilizando diferentes iscas e que na verdade correspondem a fragmentos clonados na biblioteca genômica de *Xac* capazes de auto-

ativar os genes repórteres (*HIS3* e *ADE2*) na levedura, independentemente de interações com a proteína de interesse (isca).

Foram identificadas 5 presas nos ensaios de duplo híbrido utilizando XAC0610(aa698-880) como isca, sendo 4 destas consideradas falso-positivas (Tabela 14). A outra presa identificada (XAC1770) possui uma sequência peptídeo sinal e está anotada como celulase no genoma de *Xac*, porém em análises no banco de dados do P-fam não foram observados domínios protéicos conservados na sequência de XAC1770 (Figura 70).

Já nos ensaios utilizando XAC0610(aa452-722) como isca (Tabela 15), foram identificadas 28 presas, sendo 19 consideradas falso-positivas, 4 proteínas integrais da membrana externa bacteriana (XAC4204, XAC1349, XAC1425 e XAC3548) e que, portanto, não devem constituir interações fisiologicamente relevantes com XAC0610, 3 proteínas possivelmente não citoplasmáticas (XAC0552, XAC1815 e XAC2831), que apresentam predição de sequência peptídeo sinal (Figura 70), e 2 proteínas possivelmente citoplasmáticas (XAC2506 e XAC2596). XAC0552 e XAC2831 são serino-proteases que apresentam um domínio catalítico (Peptidase_S8) e domínios regulatórios (Pro-kuma_activ ou P_proprotein) (Figura 70). XAC1815 é uma adesina envolvida na aderência bacteriana a superfícies, formação de biofilme, motilidade e virulência (Gottig et al., 2009). XAC2506 é uma proteína hipotética que não apresenta domínios proteicos conhecidos (Figura 70). XAC2596 está anotada como ciclomaltodextrina glucanotransferase no genoma de *Xac*, e possui um domínio Alpha-amylase, que catalisa a hidrólise de ligações $\alpha(1-4)$ D-glicosídicas (Figura 70).

Tabela 14 – Resultado dos ensaios de duplo-híbrido em leveduras utilizando XAC0610(aa698-880) como isca.

Presa	Tamanho (aa)	Anotação	Início (aa)	Nº de vezes isolado	Total
tolC (<i>xac3463</i>)*	460	outer membrane protein	166	2	5
			304	1	
			190	1	
			285	1	
			166	2	
wapA (<i>xac1866</i>)*	1532	wall associated protein	700	2	2
fecA (<i>xac1146</i>)*	995	TonB-dependent receptor	104	1	3
			133	1	
			240	1	
wapA (<i>xac1305</i>)*	1199	wall associated protein	255	2	3
			283	1	
celA (<i>xac1770</i>)	751	celulase	71	1	1

*Presas identificadas como falso-positivas em estudos anteriores.

Para confirmar as interações observadas entre XAC0610 e as presas XAC1770, XAC0552, XAC2506 e XAC2596, os vetores pOAD recuperados foram utilizados para transformar células de levedura PJ69-4a, previamente transformadas com o vetor pODB correspondente. A linhagem PJ69-4a e as leveduras transformadas foram estriadas em placas réplicas contendo meio Sc com diferentes restrições auxotróficas: Sc-W, Sc-L, Sc-WHA, Sc-LHA e Sc-WLHA (Figura 71). Estes ensaios confirmaram a especificidade das interações entre XAC0610 e as proteínas XAC1770, XAC0552, XAC2506 e XAC2596, pois somente as leveduras co-transformadas com os dois vetores, pOBD-isca e pOAD-presa, conseguiram crescer em meio de cultura sem histidina e adenina (Figura 71).

Tabela 15 – Resultado dos ensaios de duplo-híbrido em leveduras utilizando Xac0610(aa452-722) como isca.

Presa	Tamanho (aa)	Anotação	Início (aa)	Nº de vezes isolado	Total
<i>xac0552</i>	653	proteinase	49	1	2
			392	1	
<i>xac2506</i>	1307	hypothetical protein	8	2	2
CGTase (<i>xac2596</i>)	541	cyclomaltodextrin glucanotransferase	157	1	1
<i>xac4204</i>	593	hypothetical protein; K07278 outer membrane protein	134	1	1
<i>xac2831</i>	603	extracellular serine protease	25	1	1
<i>xac1349</i>	946	serine protease; Autotransporter	632	1	1
<i>xadA (xac3548)</i>	1107	outer membrane protein	366	1	4
			504	1	
			370	1	
			305	1	
<i>fasD (xac1425)</i>	783	outer membrane usher protein FasD	31	1	1
<i>fhaB (xac1815)</i>	4753	filamentous haemagglutinin	106	1	4
			2438	1	
			2553	1	
			2664	1	
wapA (<i>xac1305</i>)*	1199	wall-associated protein	355	1	4
			401	1	
			675	1	
			759	1	
wapA (<i>xac1866</i>)*	1532	wall associated protein	1052	1	2
			1073	1	
<i>xac4131</i> *	983	TonB-dependent receptor	94	1	2
			222	1	
btuB (<i>xac3613</i>)*	890	TonB-dependent receptor	65	1	2
			262	1	
fepA (<i>xac0653</i>)*	796	TonB-dependent receptor	311	2	2
fepA (<i>xac1023</i>)*	806	TonB-dependent receptor	152	1	1
<i>iroN (xac0706)</i> *	902	TonB-dependent receptor	382	1	1
<i>iroN (xac4048)</i> *	1004	TonB-dependent receptor	285	1	1
<i>iroN (xac3071)</i> *	887	TonB-dependent receptor	481	1	1
<i>cirA (xac3366)</i> *	904	TonB-dependent receptor	428	1	1
<i>tolC (xac3463)</i> *	460	outer membrane protein	190	1	1
pthA2 (<i>xac a0039</i>)*	1096	avirulence protein	726	1	1

*Presas identificadas como falso-positivas em estudos anteriores.

Tabela 15 – Continuação...

Presas	Tamanho (aa)	Anotação	Início (aa)	Nº de vezes isolado	Total
bfeA (<i>xac3207</i>)*	811	iron complex outermembrane receptor protein	49	1	4
			194	1	
			267	1	
			38	1	
phuR (<i>xac0823</i>)*	782	outer membrane hemin receptor	266	1	1
rhsD (<i>xac2529</i>)*	1152	RhsD protein	1152	1	1
<i>xac3756</i> *	714	ferrichrome-iron receptor 3	121	1	1
yapH (<i>xac2151</i>)*	3225	Autotransporter-associated beta strand repeat	236	1	1
pthA3 (<i>xac b0015</i>)*	1096	avirulence protein	773	1	1
fecA (<i>xac0690</i>)*	681	TonB-dependent receptor	223	1	1

*Presas identificadas como falso-positivas em estudos anteriores.

Figura 70 – Arquitetura de domínios das proteínas de Xac que possivelmente interagem com XAC0610. Os domínios conservados foram identificados de acordo com o banco de dados do Pfam (Punta et al., 2012): Pro-kuma_activ (cinza), Peptidase_S8 (verde), Haemagg_act (violeta), Fil_haemagg (amarelo), Fil_haemagg_2 (azul escuro), Alpha-amylase (azul claro) e P_proprotein (rosa). As predições de sequências peptídeo sinal (SignalP), representadas em vermelho, hélices transmembranas (TM), representadas em branco, e estruturas coiled-coils (laranja) foram identificadas com a ferramenta InterPro (Hunter et al., 2012).

Figura 71 – Ensaio de duplo-híbrido em leveduras para confirmar as interações observadas para XAC0610. Leveduras transformadas com os vetores pOBD e/ou pOAD adequados (identificados a direita da figura) foram inoculadas em meio de cultura Sc com diferentes restrições auxotróficas: triptofano (W), histidina (H), leucina (L) e adenina (A). Os vetores pOAD utilizados nos ensaios possuem os genes das presas clonados a partir dos resíduos de aminoácidos: 71 (XAC1770), 8 (XAC2506), 157 (XAC2596) e 392 (XAC0552). PJ = *S. cerevisiae* PJ69-4a.

4.7. Estudos funcionais e bioquímicos com XAC2446

4.7.1. Produção da linhagem nocaute *Xac*Δ2446

O nocaute do gene *xac2446* também foi obtido por recombinação homóloga. Foi utilizando o vetor pNPTSΔ2446 (Tabela 5) para a transformação de *Xac* e seleção da linhagem nocaute *Xac*Δ2446. Na linhagem *Xac*Δ2446 o gene *xac2446* foi substituído por uma cópia truncada em que a região que codifica para os resíduos de aminoácidos 20 a 338 da proteína selvagem foi deletada.

A confirmação da obtenção da linhagem nocaute *Xac*Δ2446 foi feita por PCR. Nas reações da PCR utilizando o par de oligonucleotídeos Δ2446_upFwd_HindIII e Δ2446_downRev_EcoRI, capaz de amplificar a ORF do gene *xac2446* (1041 pb) mais uma região “upstream” e “downstream” de aproximadamente 1 kb cada, foi verificada a presença dos fragmentos de DNA esperados de ~3 kb na linhagem selvagem (Wt) e ~2 Kb nas linhagens nocauteadas (Figura 66).

Figura 66 – Verificação do nocaute de *xac2446*. PCR utilizando o par de oligonucleotídeos Δ2446_upFwd_HindIII e Δ2446_downRev_EcoRI. A seta vermelha indica a posição da banda esperada de ~3,0 kb na linhagem selvagem (Wt). A seta preta indica a posição da banda esperada de ~2,05 kb nas linhagens mutantes

*Xac*Δ2446 (3, 6, 7, 8, 9 e 10). (M) = Marcador de peso molecular; (2), (3), (6), (7), (8), (9) e (10) = Identificação das colônias individuais de bactérias analisadas.

4.7.2. Ensaios fenotípicos com a linhagem nocaute *Xac*Δ2446

Em ensaios de motilidade em meio SB semi-sólido (0,5% ágar) foi verificado que o nocaute do gene *xac2446* provoca uma diminuição da motilidade de *Xac* na superfície do meio quando comparada a linhagem selvagem (Figura 67 A e B).

Figura 67 – Ensaios de motilidade em meio SB semi-sólido. Culturas de *Xac* foram crescidas em meio 2xTY até DO_{600nm} de 0,5 e 4 μ L da cultura foram inoculados em

um único ponto em placas de meio SB contendo 0,5 % bacto-ágar. As placas foram incubadas a 30 °C durante 48h. A e B) O nocaute do gene *xac2446* provoca uma diminuição na motilidade de *Xac*. Os ensaios foram realizados em meio SB semi-sólido suplementado com 100 µg/mL de ampicilina. C e D) Complementação da linhagem *Xac*Δ2446 com o gene *xac2446* ou *xac1185* fusionados ao promotor BAD no vetor pBRA. Os ensaios foram realizados em meio SB semi-sólido suplementado com 100 µg/mL de ampicilina, 100 µg/mL de spectinomicina e 0,3% L-arabinose.

Em ensaios em placas contendo carboximetilcelulose (CMC) ou leite desnatado como substratos, não foram verificadas alterações na atividade de endoglucanases ou proteases extracelulares, respectivamente, produzidas pela cultura de *Xac*Δ2446 comparada com a linhagem selvagem (Figura 68 A e B).

E em ensaios em placas de poliestireno de 96 poços, contendo meio de cultura líquido (2xTY ou SB), foi verificado que o nocaute do gene *xac2446* provoca um aumento na formação de biofilme por *Xac* em superfície abiótica (Figura 69 A e B).

Figura 68 – Ensaio da atividade de enzimas extracelulares da linhagem nocaute *Xac*Δ2446. Culturas de *Xac* foram crescidas em meio 2xTY até DO_{600nm} de 0,5 e 4 µL da cultura foram inoculados em um único ponto em placas com meio de cultura apropriado. A) Ensaio da atividade de endoglucanases extracelulares. Os ensaios foram realizados em TYE-ágar suplementado com 0,5 % de carboximetilcelulose (CMC) e 100 µg/mL de ampicilina. As placas foram incubadas a 30 °C durante 48h e depois coradas com vermelho congo 0,1 %. B) Ensaio da atividade de proteases extracelulares. Os ensaios foram realizados em meio TYE-ágar suplementado com 1 % de leite desnatado e 100 µg/mL de ampicilina. As placas foram incubadas a 30 °C durante 48h. O halo transparente ao redor das colônias de *Xac* indica a degradação da caseína presente no leite.

Figura 69 – Ensaio de formação de biofilme por *Xac* em superfície abiótica. Culturas de *Xac* foram diluídas em meio de cultura SB ou 2xTY até obter uma DO_{600nm}

de 0,1 e alíquotas de 150 µL de cada cultura foram transferidas para placas de poliestireno de 96 poços. As placas foram incubadas a 30 °C e após 24, 48 ou 72 horas as células aderidas foram coradas com cristal violeta e quantificadas no comprimento de onda de 570 nm. A) Ensaios de formação de biofilme em meio de cultura 2xTY suplementado com 100 µg/mL de ampicilina. B) Ensaios de formação de biofilme em meio de cultura SB suplementado com 100 µg/mL de ampicilina e 1% glicose. C) Ensaios de formação de biofilme em meio de cultura 2xTY suplementado com 100 µg/mL de ampicilina, 100 µg/mL de espectinomicina e 0,3% L-arabinose. Em todos os ensaios a condição controle corresponde ao meio de cultura não inoculado.

4.7.3. Complementação da linhagem nocaute *XacΔ2446*

Para a complementação da linhagem *XacΔ2446*, o gene *xac2446* foi ligado em fusão ao promotor induzível por L-arabinose (pBAD) no vetor pBRA. O vetor resultante, pBRA2446, foi utilizado para complementar a linhagem nocaute *XacΔ2446*.

Em ensaios de motilidade em meio SB semi-sólido foi verificado que a linhagem complementada *XacΔ2446* + XAC2446 apresentou um aumento de motilidade, porém a reversão de fenótipo não foi suficientemente alta para alcançar os níveis de motilidade apresentados pela linhagem selvagem transformada com o vetor pBRA vazio (Figura 67 C e D).

Em ensaios de formação de biofilme em superfície abiótica, apesar da linhagem complementada *XacΔ2446* + XAC2446 ter apresentado a mesma quantidade de biofilme que linhagem selvagem transformada com o vetor pBRA vazio, o fenótipo de maior formação de biofilme não foi mais observado para a linhagem nocaute de *XacΔ2446* transformada com o vetor pBRA vazio (Figura 69 C).

A perda ou complementação parcial dos fenótipos observados para o nocaute do gene *xac2446* podem ter sido causados pela interferência da adição de L-arabinose e/ou espectinomicina, nestes ensaios de complementação, necessária para a indução da expressão de XAC2446 a partir do vetor pBRA2446. Estudos em *P. aeruginosa*

indicam uma correlação entre a resistência a antibióticos e os níveis celulares de c-di-GMP e, conseqüentemente, com a formação de biofilme por esta bactéria (Nicastro et al., 2014).

4.7.4. Ensaios de duplo-híbrido utilizando XAC2446 como isca

XAC2446 possui um domínio GAF e um domínio GGDEF. O domínio GGDEF de XAC2446 não dever ser ativo, pois não apresenta vários resíduos de aminoácidos importantes para a atividade enzimática de DGC (Figura 17, Tabela 7).

O gene que codifica a proteína XAC2446(aa2-346) foi ligado no vetor pOBD e utilizado como isca para a realização de ensaios de duplo híbrido em levedura contra uma biblioteca genômica de *Xac*. Os resultados dos ensaios de duplo-híbrido (Tabela 16) mostraram que XAC2446 interagiu com si mesma e com outras proteínas contendo domínio GGDEF (XAC2897 e XAC1887). XAC2446 também interagiu com XAC1185, uma proteína homóloga ao domínio fosfohidrolase de spoT, envolvido na degradação do segundo mensageiro (p)ppGpp. As interações entre XAC2446 e as proteínas XAC1185 ou XAC2897 foram observadas com maior frequência, sendo isoladas 35 e 23 vezes, respectivamente (Tabela 16). Foi observada uma baixíssima frequência de presas falso-positivas nos ensaios de duplo-híbrido com XAC2446, em que apenas os genes YapH (*xac4113*) e TolC (*xac3463*) foram isolados uma única vez cada.

Análises detalhadas da sequência de DNA dos vetores pOAD recuperados, mostraram que os genes que codificam para as proteínas presas estavam clonados *in frame* com o gene do domínio AD. Foram observadas oito diferentes construções contendo a fusão entre o domínio AD e o gene *xac1185*. Nestas construções o início do gene *xac1185* variou do códon -32 ao +2 (Tabela 16) e não foram observados códons

de terminação da tradução na região *upstream* ao gene *xac1185*. A fusão entre o domínio AD e o gene *xac2897* foi recuperada contendo 10 configurações diferentes, onde o início do gene *xac2897* variou do códon +308 ao +339, indicando que a interação com XAC2446 ocorre especificamente via domínio GGDEF de XAC2897 (Tabela 16). Já os vetores recuperados da interação entre XAC2446 consigo mesma ou com XAC1887 apresentaram o gene da proteína presa iniciando pelo códon +2 ou +349, respectivamente (Tabela 16).

Para confirmar a veracidade das interações observadas nos ensaios de duplo-híbrido com a biblioteca genômica de *Xac*, os vetores pOAD recuperados, contendo os genes das proteínas presas, foram utilizados para transformar células de levedura PJ69-4a, previamente transformadas com o vetor pODB contendo o gene *xac2446* (isca). A linhagem PJ69-4a e as leveduras transformadas foram estriadas em placas réplicas contendo meio Sc com diferentes restrições auxotróficas: Sc-W, Sc-L, Sc-WHA, Sc-LHA e Sc-WLHA (Figura 72). Estes ensaios confirmaram a especificidade das interações entre XAC2446 consigo mesma e com as proteínas XAC1185 e XAC2897, pois somente as leveduras co-transformadas com os dois vetores, pOBD e pOAD, conseguiram crescer em meio de cultura sem histidina e adenina (Figura 72). A interação entre XAC2446 e XAC1887, entretanto, não foi confirmada nestes ensaios, pois a levedura co-transformada com os dois vetores não foi capaz de crescer em meio de cultura sem histidina e adenina (Figura 72).

Tabela 16 – Resultado dos ensaios de duplo-híbrido em leveduras utilizando XAC2446 (aa2-346) como isca.

Presa	Anotação	Arquitetura de domínios	Nº de vezes isolado	Nº de interações diferentes	Início da interação (aa)*
XAC2446	GAF domain/GGDEF domain protein		3	1	2
XAC1185	phosphohydrolase		35	8	(-32) à 2
XAC2897	diguanylate cyclase		23	10	308 à 339
XAC1887	c-di-GMP phosphodiesterase A		1	1	349

*aa = resíduo de aminoácido.

Figura 72 – Ensaios de duplo-híbrido em leveduras para confirmar as interações observadas para XAC2446. Leveduras transformadas com os vetores pOBD e/ou pOAD adequados (identificados a direita da figura) foram inoculadas em meio de cultura Sc com diferentes restrições auxotróficas: triptofano (W), histidina (H), leucina (L) e adenina (A). Os vetores pOAD utilizados nos ensaios possuem os genes das presas clonados a partir dos resíduos de aminoácidos: 2 (XAC2446), 314 (XAC2897), 2 (XAC1185) e 349 (XAC1887). PJ = *S. cerevisiae* PJ69-4a.

4.7.5. Estudos da interação *in vitro* entre XAC2446 e XAC1185

Para estudar a interação *in vitro* entre XAC2446 e XAC1185, as proteínas recombinantes foram expressas individualmente ou co-expressas em *E. coli* (Figura 73). Considerando que a proteína XAC2446_{HIS-1-346} possui uma cauda de histidina, ela pode ser imobilizada em uma coluna de afinidade de Ni²⁺ e utilizada para verificar a capacidade de retenção de XAC1185₁₋₂₁₂ na coluna por meio da interação entre as duas proteínas, uma vez que XAC1185₁₋₂₁₂ não possui cauda de histidina.

As construções XAC1185₁₋₂₁₂ (sem cauda de histidina) e XAC1185_{HIS-1-212} (com cauda de histidina) foram obtidas pela clonagem do gene *xac1185* nos vetores pET28a_{NcoI/XhoI} e pProExHTb_{NcoI/XhoI}, respectivamente (Tabela 5). As proteínas recombinantes XAC1185₁₋₂₁₂ e XAC1185_{HIS-1-212}, que possuem um peso molecular predito de 23,2 e 26,2 kDa, respectivamente, apresentaram uma migração em eletroforese SDS-PAGE 15% menor do que a esperada, em relação as bandas do marcador de peso molecular (Figura 73). Entretanto, a constatação da atividade de fosfohidrolase de (p)ppGpp observada em ensaios *in vivo* (Andrade, 2011) confirma a veracidade da construção XAC1185₁₋₂₁₂, apesar da migração eletroforética anômala.

Na primeira tentativa de obtenção do complexo XAC1185 e XAC2446, as proteínas recombinantes XAC1185₁₋₂₁₂ e XAC2446_{HIS-1-346} foram co-expressas em *E. coli* BL21(DE3) e a fração de proteínas solúveis foi analisada por cromatografia de afinidade e de exclusão molecular (Figura 74). XAC2446_{HIS-1-346} foi capaz de reter XAC1185₁₋₂₁₂ na coluna de afinidade de Ni²⁺ após a aplicação do extrato proteico na coluna e lavagem com 15 volumes de coluna de tampão A (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol e 10% glicerol). Durante a eluição da cromatografia de afinidade (Figura 74 A e C) foi verificado uma possível desestabilização do complexo

XAC1185/XAC2446 por imidazol, pois a eluição de XAC1185₁₋₂₁₂ foi observada logo no início do gradiente de imidazol, obtido pelo aumento gradual da concentração de tampão B (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 500 mM imidazol e 10% glicerol). As frações 8-11 da cromatografia de afinidade (Figura 74 A e C) foram unidas e analisadas por cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex75 (320 mL). Na eluição da cromatografia de exclusão molecular foi observado um único pico contendo ambas as proteínas XAC1185₁₋₂₁₂ e XAC2446_{HIS-1-346}, embora com XAC2446_{HIS-1-346} presente em quantidade bem maior (Figura 74 B, D e E).

Figura 73 – Expressão e co-expressão de XAC2446 e XAC1185 em *E. coli*. Células de *E. coli* BL21(DE3) foram transformadas ou co-transformadas com os vetores de expressão das proteínas indicadas. Após a expressão das proteínas (18°C por 16 h), alíquotas das culturas foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE, em gel de poliácridamida 15%. As proteínas recombinantes apresentam um peso molecular teórico de 26,2 kDa (XAC1185_{HIS-1-212}), 23,2 kDa (XAC1185₁₋₂₁₂) e 40,2 kDa (XAC2446_{HIS-1-346}). I = Indução da expressão de proteínas pela adição de 0,4 mM de IPTG. NI = Controle não induzido; M = Marcador de peso molecular.

Figura 74 – Tentativa de purificação do complexo XAC2446_{HIS-1-346} e XAC1185₁₋₂₁₂ após co-expressão das proteínas em *E. coli* BL21(DE3). A) Cromatografia de afinidade em coluna de níquel. Eluição em gradiente linear de 20 a 500 mM de Imidazol. B) As frações 8-11 da cromatografia de afinidade foram unidas e analisadas por cromatografia de exclusão molecular em coluna S75 (320 mL). C) SDS-PAGE 15% das frações da cromatografia de afinidade. D e E) SDS-PAGE 15% das frações da cromatografia de exclusão molecular. M = Marcador de peso molecular; I = Induzido; Fs = Fração solúvel aplicada na coluna de cromatografia de afinidade; Fa = Frações da cromatografia de afinidade; Fe = Frações da cromatografia de exclusão molecular. As bandas correspondentes a XAC2446_{HIS-1-346} e XAC1185₁₋₂₁₂ estão indicadas pelas setas preta e vermelha, respectivamente.

Figura 75 – Tentativa de purificação do complexo XAC2446_{HIS-1-346} e XAC1185₁₋₂₁₂ após expressão individual das proteínas em *E. coli* BL21(DE3). A) Cromatografia de afinidade (coluna de níquel) após mistura 2:1 das expressões individuais de XAC1185₁₋₂₁₂ e XAC2446_{HIS-1-346}, respectivamente. Eluição em gradiente linear de 20 a 500 mM de

Imidazol. B) As amostras XAC1185 (curva vermelha), A1 (curva azul) e A2 (curva preta) foram analisadas por cromatografia de exclusão molecular em coluna S200 (24mL). Na parte superior da figura está representado o volume de eluição das proteínas padrões utilizadas para calibrar a coluna. C) SDS-PAGE 15% das frações da cromatografia de afinidade. D) SDS-PAGE 15% das frações da cromatografia de exclusão molecular com a amostra A1. E) SDS-PAGE 15% das frações da cromatografia de exclusão molecular com a amostra A2. M = Marcador de peso molecular; I = Induzido; Fs = Fração solúvel aplicada na coluna de cromatografia de afinidade; Fa = Frações da cromatografia de afinidade; Fe = Frações da cromatografia de exclusão molecular; A1 = Amostra resultante da união das frações 7, 8 e 9 da cromatografia de afinidade; A2 = Amostra resultante da união das frações 1, 2 e 6 da cromatografia de afinidade; XAC1185 = Amostra obtida após expressão individual e purificação independente de XAC1185_{HIS-1-212} por cromatografia de afinidade (dados não mostrados). As bandas correspondentes a XAC2446_{HIS-1-346} e XAC1185₁₋₂₁₂ estão indicadas pelas setas preta e vermelha, respectivamente. A seta azul em (B) indica um pico de 160 kDa que possivelmente corresponde a um complexo 2:2 de XAC2446_{HIS-1-346} (40,2 kDa) e XAC1185₁₋₂₁₂ (23,2 kDa).

Para tentar enriquecer e assim poder visualizar melhor a estequiometria do complexo XAC1185/XAC2446, as proteínas recombinantes XAC1185₁₋₂₁₂ e XAC2446_{HIS-1-346} foram expressas separadamente em *E. coli* BL21(DE3) e, posteriormente, as culturas foram misturadas em uma proporção 2:1 (1 L de expressão de XAC1185₁₋₂₁₂ com 0,5 L de expressão de XAC2446_{HIS-1-346}) antes de as proteínas solúveis serem aplicadas na coluna de afinidade (Figura 75). A eluição da cromatografia de afinidade (Figura 75 A e C) apresentou o mesmo comportamento, de desestabilização do complexo pelo aumento da concentração de imidazol, como observado para a amostra proveniente da co-expressão das duas proteínas na mesma célula. Entretanto, desta vez foi possível recuperar uma maior quantidade da proteína recombinante sem cauda de histidina, XAC1185₁₋₂₁₂ (compare as Figuras 74 C e 75 C).

As frações correspondentes ao pico principal da cromatografia de afinidade (frações 7-9, Figura 75 A e C) foram de novo unidas (amostra A1) e analisadas por cromatografia de exclusão molecular em uma coluna Superdex200 analítica (24 mL).

Na eluição da cromatografia de exclusão molecular foi observado um pico principal de 79,4 kDa contendo ambas as proteínas XAC1185₁₋₂₁₂ e XAC2446_{HIS-1-346}, com XAC2446_{HIS-1-346} presente em maior quantidade de forma similar à observada para a amostra proveniente de co-expressão (Figura 75 B e D). Outra amostra (amostra A2), contendo as frações 1, 2 e 6 da cromatografia de afinidade (Figura 75 A e C) foi também analisada por cromatografia de exclusão molecular. A amostra A2, que em comparação com a amostra A1 possui uma maior concentração de XAC1185₁₋₂₁₂ (Figura 75 E), apresentou um pico principal de massa molecular aparente de 83,2 kDa com um ombro de 160 kDa (Figura 75 B). Este ombro de 160 kDa (seta azul, Figura 75 B) provavelmente corresponde a um complexo 2:2 de XAC2446_{HIS-1-346} (40,2 kDa) e XAC1185₁₋₂₁₂ (23,2 kDa), uma vez que contém quantidades similares das duas proteínas como visualizado nas análises por SDS-PAGE (Figura 75 E).

Para verificar o estado oligomérico de XAC1185 sem a interferência de XAC2446, a proteína recombinante XAC1185_{HIS-1-212} (26,2 kDa) também foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna de Ni²⁺ e posteriormente analisada por cromatografia de exclusão molecular. A Figura 75 B indica que XAC1185_{HIS-1-212} sozinha forma um dímero com um peso molecular estimado de 58,7 kDa. As análises por cromatografia de exclusão molecular com as amostras contendo XAC2446_{HIS-1-346} em maior quantidade (Figura 74 B e Figura 75 B) indicam que XAC2446_{HIS-1-346} (40,2 kDa) também forma um dímero com um peso molecular estimado de 79,4 kDa.

5. DISCUSSÃO

5.1. Estudos funcionais de XAC0610

5.1.1. Estrutura e organização do gene *xac0610*

XAC0610 é uma proteína relativamente grande, contendo 880 resíduos de aminoácidos, e composta por seis domínios: um domínio GAF, quatro domínios PAS (A-D) e um domínio GGDEF (Figura 76 A e B). O gene *xac0610* parece não estar organizado em operon, pois se encontra em orientação oposta aos genes adjacentes no genoma de *Xac* (Figura 77 A). Uma descrição dos genes localizados próximos a *xac0610* no genoma de *Xac* é encontrada na Tabela 17.

O gene *xac0610* foi anotado com o códon de iniciação alternativo TTG (leucina) (da Silva et al., 2002). Entretanto, nós observamos que códons ATG podem ser encontrados nas posições -48, -46 e +23 da mesma janela de leitura utilizada para o códon de iniciação anotado (TTG) (Figura 77 B), indicando que o códon de iniciação verdadeiro pode ser diferente do anotado. A cadeia polipeptídica deduzida contendo os resíduos de aminoácidos da região -48 a +23 não codifica nenhum domínio proteico conhecido e é rica em resíduos de prolina, glicina e de aminoácidos carregados positivamente (Figura 77 B). A remoção dessa região N-terminal potencialmente desestruturada pode ter favorecido a solubilidade e/ou estabilidade da proteína recombinante XAC0610_{HIS-35-880}.

Figura 76 – (A) Arquitetura de domínios de XAC0610. A delimitação entre os domínios foi identificada de acordo com o banco de dados do Pfam (Punta et al., 2012). (B) Modelo por homologia da estrutura de XAC0610 obtido com o programa Phyre (Kelley & Sternberg, 2009). A orientação espacial dos domínios na figura é aleatória, somente evitando sobreposição estérica. (C) Alinhamento de sequências entre os domínios GGDEF de XAC0610, PleD (2V0N) e WspR (3BRE). Elementos de estrutura secundária foram destacados em vermelho (α -hélice) e em azul (fita- β). Asteriscos indicam os resíduos de aminoácidos conservados que estão envolvidos na formação do sítio ativo. Triângulos indicam a posição dos resíduos de Arg e Asp que formam o sítio inibitório primário (I_p), os quais estão ausentes em XAC0610. Losangos indicam os resíduos do sítio inibitório secundário (I_s). As setas indicam os resíduos de aminoácidos de XAC0610 selecionados para estudos de mutação sítio-dirigida: Lys759 (seta preta) ou Asp797/Glu798 (setas brancas).

Figura 77 – (A) Orientação do gene *xac0610* no genoma de *Xac*. (B) Sequência de nucleotídeos do gene *xac0610* e sua correspondente sequência de aminoácidos traduzida na região vizinha ao códon de iniciação TTG anotado para a metionina +1 (quadrado cinza). Possíveis códons de iniciação ATG são encontrados nas posições -48, -46 e +23 (quadrados pretos) da mesma janela de leitura do códon de iniciação TTG anotado. A proteína recombinante XAC0610_{HIS-35-880} possui uma cauda de histidina fusionada a sequência de XAC0610 iniciando-se no resíduo +35 (quadrado transparente).

Tabela 17 – Descrição dos genes adjacentes a *xac0610* no genoma de *Xac*.

Gene	Notação	Arquitetura de domínios
<i>xac0608</i> (<i>phs</i>)	<i>histidine kinase-response regulator hybrid protein</i>	GAF; GAF_3; GAF_2
<i>xac0609</i>	<i>zinc protease</i>	Peptidase_M16_C; Peptidase_M16;
<i>xac0611</i> (<i>tsr</i>)	<i>chemotaxis protein</i>	MCPsignal; HAMP; Cache_2; LON; Atg14; DUF4239
<i>xac0612</i> (<i>engXCA</i>)	<i>cellulase</i>	Cellulase; CBM_2; DUF1180

(Fonte: KEGG - <http://www.genome.jp/kegg/>)

As proteínas contendo domínio GGDEF que apresentam atividade de DGC possuem resíduos de aminoácidos conservados envolvidos na ligação ao GTP,

coordenação de íons metálicos (Mg^{2+}) e catálise (Chan et al., 2004, Christen et al., 2006, Wassmann et al., 2007, Malone et al., 2007). Estes resíduos de aminoácidos são também conservados no domínio GGDEF de XAC0610, com exceção da substituição G para A do primeiro resíduo de glicina de seu motivo GGDEF (Figura 76C). O motivo AGDEF de XAC0610, entretanto, não compromete a atividade de DGC da proteína, como verificado nos ensaios de atividade enzimática *in vivo* e *in vitro* utilizando a proteína recombinante XAC0610_{HIS-35-880} (Figuras 28 e 31). A DGC ECA3270 de *Pectobacterium atrosepticum* também possui um motivo GGDEF não canônico e retém sua atividade de DGC mesmo quando seu motivo SGDEF é mutado para AGDEF (Perez-Mendoza et al., 2011).

5.1.2. XAC0610 exerce controle na motilidade de *Xac* independentemente de sua atividade de DGC

XAC0610 é uma proteína homóloga a XC_0637 de *X. campestris* pv *campestris* (Xcc) (Tabela 19). As proteínas XC_0637 e XAC0610 possuem 79% de identidade e 88% de similaridade. O nocaute de Xc_0637 em Xcc leva a um fenótipo de redução de virulência em rabanete (*Chinese Radish*), e também a uma redução nas atividades de endoglucanases e endomanases extracelulares produzidas pela cultura bacteriana (Ryan et al., 2007).

Para investigar a função biológica de XAC0610 nós decidimos construir uma linhagem nocaute: *Xac*Δ0610. Na linhagem *Xac*Δ0610 o gene *xac0610* foi substituído por uma cópia truncada em que a região que codifica para os resíduos de aminoácidos 15 a 868 da proteína selvagem foi removida. Diferentemente do que foi observado em Xcc, a inativação do gene *xac0610* não afetou a virulência de *Xac* (Figura 63) e nem

sua produção de enzimas extracelulares (Figuras 61 e 62). Por outro lado, a linhagem *Xac*Δ0610 apresentou um aumento na motilidade da colônia bacteriana em meio de cultura SB semi-sólido (Figura 59). A motilidade de *Xac* em meio SB semi-sólido, chamada de *sliding motility*, é dependente da produção de exopolissacarídeos (EPS) e independente do flagelo ou do pilus do tipo IV (Guzzo et al., 2009, Gottig et al., 2009, Malamud et al., 2011).

Vários estudos têm demonstrado um papel para o c-di-GMP na regulação de diferentes formas de motilidade bacteriana, onde, geralmente, altos níveis intracelulares de c-di-GMP inibem a motilidade (Romling et al., 2005, Romling & Amikam, 2006, Fouhy et al., 2006, Cotter & Stibitz, 2007). Para investigar se o controle que XAC0610 exerce na motilidade de *Xac* é dependente da atividade de DGC da proteína, nós complementamos a linhagem *Xac*Δ0610 com um gene *xac0610* mutado codificando uma enzima cataliticamente inativa (*Xac*Δ0610 + D797A/E798A). A linhagem *Xac*Δ0610 + D797A/E798A apresentou um fenótipo de motilidade reduzida em meio SB semi-sólido (Figura 59 B), indicando que XAC0610 regula negativamente a motilidade de *Xac* de forma independente da sua atividade de DGC. Consistente com este resultado, a complementação da linhagem *Xac*Δ0610 com apenas os domínios GAF_PAS(A-D) do N-terminal de XAC0610 (resíduos 1-701), resultou no mesmo fenótipo de motilidade reduzida obtido na complementação com a proteína selvagem inteira (Figura 59 B). Por outro lado, a linhagem *Xac*Δ0610 complementada apenas com o domínio GGDEF do C-terminal de XAC0610 (*Xac*Δ0610 + GGDEF), apresentou um fenótipo de aumento da motilidade, similar ao da linhagem nocaute (Figura 59 B). Estes resultados indicam que a presença dos domínios N-terminais GAF e PAS de XAC0610 são suficientes para inibir a motilidade de *Xac* em meio SB semi-sólido.

A regulação negativa da motilidade de *Xac* pelos domínios GAF e PAS de XAC0610 talvez ocorra via interações proteína-proteína entre estes domínios e uma proteína efetora ainda não identificada. Em ensaios de duplo-híbrido em leveduras utilizando fragmentos de XAC0610 como isca foi observada uma alta frequência de presas consideradas falso-positivas e algumas presas possivelmente positivas, envolvidas no metabolismo de carboidratos (XAC1770 e XAC2596) ou peptídeos (XAC0552 e XAC2831), porém isoladas uma única vez cada (Tabela 14 e 15, Figura 70). Resultados similares também foram observados por Docena (2006) que utilizou a proteína XAC0610 inteira como isca e identificou 8 presas diferentes, sendo 6 falso-positivas e duas possivelmente verdadeiras, também isoladas uma única vez, XAC3901 (um transportador de pequenas moléculas da “Major Facilitator Superfamily”, MFS-1,) e XAC0465 (metaloproteinase da família de termolisinas). O fragmento XAC0610(aa452-722), contendo os domínios PAS_C e PAS_D, interagiu também com uma proteína hipotética, XAC2506, que apresenta predição de localização citoplasmática, porém não apresenta domínios proteicos conhecidos (Tabela 15 e Figura 70). Estes resultados indicam que XAC0610 talvez possa exercer algum tipo de influência sobre o metabolismo de carboidratos e peptídeos, mas o mecanismo exato de controle, assim como a existência de possíveis efeitos sobre os fenótipos observados para a linhagem *Xac*Δ0610, ainda precisam ser mais profundamente estudados.

5.1.3. A atividade de DGC de XAC0610 confere proteção a *Xac* contra o estresse oxidativo provocado por H₂O₂

Alguns domínios GAF e PAS foram caracterizados como domínios sensores, com papel no controle da atividade enzimática em resposta a concentração de oxigênio

ou alterações do estado redox celular (Chang et al., 2001, Kurokawa et al., 2004, Sousa et al., 2007, Qi et al., 2009, Green et al., 2009, He et al., 2009). Embora não existam, até o momento, evidências de que os domínios GAF e PAS de XAC0610 possam atuar como domínios sensores, estudos de sobrevivência bacteriana na presença de H_2O_2 mostraram que a linhagem nocaute *Xac* Δ 0610 possui menor resistência ao estresse oxidativo causado por H_2O_2 que a linhagem selvagem de *Xac* (Figura 64). Estudos de complementação da linhagem *Xac* Δ 0610, com o gene selvagem ou com a mutação D797A/E798A, mostraram que a restauração do fenótipo para uma maior tolerância de *Xac* ao estresse oxidativo causado por H_2O_2 é dependente da atividade de DGC de XAC0610 (Figura 64).

Para avaliar se o fenótipo observado de resistência de *Xac* a H_2O_2 está relacionado apenas com a atividade de DGC XAC0610, ensaios de sobrevivência celular a H_2O_2 também foram realizados utilizando linhagens de *Xac* com concentrações intracelulares de c-di-GMP potencialmente elevadas, como a linhagem nocaute *Xac* Δ *RpfG*, que não possui o gene da fosfodiesterase de c-di-GMP *RpfG* (contendo um domínio HD-GYP) (Andrade et al., 2006, Ryan et al., 2006a, Ryan et al., 2010), ou a linhagem selvagem superexpressando a diguanilato ciclase XAC2810, contendo um domínio GGDEF conservado. Os resultados mostraram que o aumento da proteção de *Xac* contra H_2O_2 está correlacionado com o aumento dos níveis intracelulares de c-di-GMP, em células contendo um domínio GGDEF de XAC0610 funcional (Figura 64).

Embora o mecanismo exato não esteja determinado, correlações entre a via de sinalização por c-di-GMP e a resposta ao estresse oxidativo foram observadas também em estudos com outras bactérias, como *E. coli* (Tuckerman et al., 2009, Lacey et al.,

2010), *A. xylinum* (Chang et al., 2001, Qi et al., 2009) e *X. campestris* (He et al., 2009). *Xac* é uma bactéria fitopatogênica aeróbica e, portanto está susceptível a exposição a H_2O_2 gerado pela própria respiração aeróbica bacteriana, ou como um mecanismo de defesa da planta durante as interações planta-patógeno (Green & Paget, 2004, Jittawuttipoka et al., 2009, Tondo et al., 2010). Os resultados deste trabalho indicam que a via de sinalização por c-di-GMP é importante para promover a proteção das células de *Xac* contra o estresse oxidativo provocado por H_2O_2 , e que a atividade de DGC de XAC0610 fornece uma importante contribuição para elevar a concentração intracelular de c-di-GMP, necessária para adquirir o nível de proteção exibido pela linhagem selvagem.

5.2. A caracterização da atividade enzimática de XAC0610 origina uma nova visão para a análise cinética de DGCs

5.2.1. A atividade específica de DGC de XAC0610 depende da concentração de proteína e de seus domínios GAF e PAS (A-D)

As DGCs catalisam uma reação de condensação entre duas moléculas de substrato idênticas (GTP), as quais se ligam a dois domínios GGDEF também idênticos, resultando na formação de um produto simétrico (c-di-GMP). Para realizar esta tarefa, as DGCs ativas precisam assumir um estado conformacional dimérico competente para a realização da catálise (Chan et al., 2004, Wassmann et al., 2007). A ativação enzimática pela dimerização é, portanto, um dos mecanismos utilizados para o controle da atividade de DGC. Este mecanismo de controle pode ser mediado por um domínio adjacente que regula a dimerização de maneira dependente (Paul et al., 2007, Wassmann et al., 2007) ou independente (De et al., 2008) de um sinal. Por exemplo, os

domínios GAF e PAS de XAC0610 poderiam contribuir para a oligomerização apropriada da proteína, necessária para a produção de uma enzima cataliticamente competente. De fato, como mostrado na Figura 28, a remoção dos domínios GAF e PAS (A-D) leva a uma grande redução da coloração vermelha exibida pelas colônias de *E. coli* expressando XAC0610_{HIS-701-880} em comparação com as colônias expressando XAC0610_{HIS-35-880}. Além disso, em ensaios de atividade enzimática *in vitro*, a proteína recombinante XAC0610_{HIS-701-880} apresentou uma atividade de DGC extremamente baixa (Figura 36). Estes resultados indicam que os domínios GAF e PAS de XAC0610 são necessários para a obtenção de altos níveis de atividade de DGC, provavelmente por facilitarem a aproximação dos dois domínios GGDEF formando um homodímero competente para a síntese de c-di-GMP.

Em ensaios por gel filtração analítica, XAC0610_{HIS-35-880} e o mutante XAC0610-K759A_{HIS-35-880} eluíram com um peso molecular aparente de aproximadamente 360 kDa (Tabela 9), que corresponde a quatro vezes o peso molecular predito para um monômero de XAC0610_{HIS-35-880} (94,4 kDa). Uma estrutura quaternária tetramérica já foi observada para a DGC WspR de *P. aeruginosa*, onde este complexo existiria apenas como uma espécie oligomérica intermediária durante a conversão de um dímero compacto ativo em um dímero alongado inativo (De et al., 2008). Entretanto, como XAC0610 é uma proteína grande, composta por seis domínios, é possível que ela adote uma conformação estendida que influencie sua migração pela coluna de gel filtração, resultando numa superestimação de seu peso molecular por esta técnica. Por exemplo, a proteína FimX de *P. aeruginosa* forma um dímero alongado que comporta-se como se fosse um tetrâmero em análises por gel filtração (Navarro et al., 2009). Para determinar de forma não ambígua o estado oligomérico de XAC0610 em solução, a proteína

recombinante XAC0610_{HIS-35-880} foi analisada por outras técnicas de determinação de peso molecular. Os resultados dos ensaios de ligação cruzada com glutaraldeído (Figura 46), eletroforese em gel não-desnaturante (Figuras 48 e 49), espalhamento de luz dinâmico (Figura 50) e estático (Figura 51) e análises por SEC-MALS (Figura 52, Tabela 11) indicaram que XAC0610_{HIS-35-880}, em concentrações micromolares, se comporta predominantemente como uma espécie dimérica. Medidas de fluorescência intrínseca de resíduos de triptofano também foram realizadas para tentar detectar alterações no estado oligomérico de XAC0610_{HIS-35-880} em concentrações nanomolares de proteína (Figura 53). Entretanto estes experimentos não apontaram indícios de alteração no estado oligomérico de XAC0610_{HIS-35-880} na faixa de concentração testada (1 μ M a 58,5 nM).

Como a dimerização é necessária para que a atividade de DGC ocorra, as DGCs que são submetidas à regulação de atividade por meio do controle da dimerização devem apresentar constantes de dissociação proteína-proteína relativamente altas (i.e. baixa afinidade) na ausência de um sinal exógeno ou ligante estimulatório. Por exemplo, estudos com a DGC PleD de *C. crescentus* demonstraram uma alta dependência da atividade específica de DGC com a concentração enzimática, na faixa de concentração de 0,1 a 1 μ M, e que a fosforilação do seu domínio regulador de resposta provoca uma diminuição no K_D (constante de dissociação) de dimerização da proteína de 100 μ M para 10 μ M (Chan et al., 2004, Paul et al., 2007, Wassmann et al., 2007). Se a atividade de DGC é dependente da capacidade de dimerização da proteína, é esperado que a sua atividade específica fosse reduzida em concentrações submicromolares de proteína.

A Figura 41 (C) mostra que a atividade específica de XAC0610_{HIS-35-880} é relativamente constante em concentrações de enzima maior ou igual a 0,25 μ M. Entretanto, abaixo desta concentração, a atividade específica de XAC0610_{HIS-35-880} é reduzida. Estes dados podem ser racionalizados quando se assume que a atividade específica de XAC0610_{HIS-35-880} reflete diretamente a fração de cadeias polipeptídicas em um estado oligomérico ativo. Embora os dados na Figura 41 (C) não sejam suficientes para permitir o cálculo com precisão da constante de dissociação (K_D), eles indicam um limite superior para o K_D de XAC0610_{HIS-35-880} como sendo inferior a 1 μ M.

Como somente uma atividade residual de DGC foi observada para o domínio GGDEF isolado, os domínios GAF e PAS de XAC0610 são provavelmente requeridos para a oligomerização protéica. Além de facilitarem a oligomerização proteica (Zoraghi et al., 2004, Moglich et al., 2009), alguns domínios GAF e PAS podem atuar como domínios sensores para alterações em estímulos como luz, potencial redox, oxigênio, nucleotídeos ou outros pequenos ligantes (Ponting & Aravind, 1997, Taylor & Zhulin, 1999, Ho et al., 2000, Martinez et al., 2002a, Hurley, 2003, Moglich et al., 2009). Entretanto, o controle da atividade de DGC por meio de domínios sensores GAF ou PAS é ainda pouco compreendido. Foi demonstrado que o domínio PAS de AxDGC2 de *Acetobacter xylinum* se liga a um grupo FAD (flavina adenina dinucleotídeo) e que a atividade de DGC da proteína é modulada pelo estado redox deste cofator (Qi et al., 2009). Por outro lado, os autores deste estudo não investigaram se a regulação da atividade de AxDGC2 ocorre apenas via dinâmica conformacional da proteína induzida pelo estado redox do grupo FAD ou se ocorrem também alterações no estado oligomérico da proteína. Em outro estudo, com cinco proteínas contendo domínios GAF e GGDEF, foi verificado que apenas a presença do domínio GAF é suficiente para o

desenvolvimento da atividade de DGC *in vitro*, a qual não foi estimulada pela adição de possíveis ligantes para o domínio GAF (Ryjenkov et al., 2005). É possível que a atividade de DGC de XAC0610 possa ser modulada por meio da ligação de ligantes aos seus domínios GAF ou PAS. Entretanto, o espectro de absorção UV-visível da proteína recombinante XAC0610_{HIS-35-880} não forneceu evidências da presença de possíveis cofatores como grupos FAD ou Heme (dados não mostrados), ambos os quais são frequentemente encontrados associados a domínios GAF ou PAS (Gilles-Gonzalez & Gonzalez, 2005, Moglich et al., 2009). Assim, até o momento acreditamos que nenhum ligante exógeno é necessário para a ativação da atividade de DGC de XAC0610.

5.2.2. A cinética enzimática de XAC0610 sugere um mecanismo de ligação cooperativa dos substratos ao sítio ativo

Os resultados deste trabalho mostram que XAC0610 possui atividade de DGC tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Entretanto, várias observações sugerem que XAC0610 não está submetida à inibição alostérica pelo produto, um mecanismo regulatório comumente utilizado para o controle da atividade de DGC. XAC0610 não apresenta um sítio inibitório (sítio primário, I_p) conservado, caracterizado pelo motivo RxxD (em que x representa qualquer aminoácido). No alinhamento de sequências entre o domínio GGDEF de XAC0610 e os domínios GGDEF das DGCs bem caracterizadas PleD (de *C. crescentus*) e WspR (de *P. aeruginosa*) foi verificado que XAC0610 possui um motivo GxxY ao invés de RxxD no local usual para o sítio I_p, geralmente encontrado a cinco resíduos de aminoácidos antes do motivo GG(^D/_E)EF (Christen et al., 2006). Em segundo lugar, os ensaios de atividade *in vitro* de DGC mostraram que uma pequena quantidade de XAC0610_{HIS-35-880} (0,25 µM) é capaz de converter em produto (c-diGMP)

quase toda a quantidade inicial de substrato (1 mM de GTP), dentro de um período de 66 minutos ou menos (Figura 31). Se a inibição pelo produto existisse, seria esperado que uma fração de substrato persistisse, sem ser consumida, por um longo período de tempo. Além disso, em experimentos de desnaturação térmica monitorada por dicroísmo circular, não foram observadas diferenças na estabilidade de XAC0610_{HIS-35-880} (2 μ M) quando os experimentos foram realizados na presença ou ausência de 50 μ M c-diGMP (Figura 43). Por último, em ensaios de atividade enzimática *in vitro*, também não foram observadas diferenças na atividade de DGC de XAC0610_{HIS-35-880} quando os ensaios foram realizados na presença ou ausência de até 8 μ M c-diGMP (Figura 42).

Inibição não-competitiva pelo produto, que envolve a ligação de c-diGMP a um sítio-I, corresponde um mecanismo alostérico bem caracterizado, apresentado por um conjunto de proteínas contendo um domínio GGDEF, para o controle da atividade de DGC (Chan et al., 2004, Christen et al., 2006, Wassmann et al., 2007, Seshasayee et al., 2010). Este mecanismo é considerado como sendo muito importante para a correta manutenção das concentrações fisiológicas de c-di-GMP (Chan et al., 2004, Christen et al., 2006). De fato, alguns estudos demonstram um efeito tóxico para a célula quando proteínas DGCs contendo mutações no sítio-I são superexpressas *in vivo* (Christen et al., 2006, Ryjenkov et al., 2005). Foi sugerido que este efeito tóxico pode ser causado devido a um esgotamento da quantidade de GTP disponível para outros processos celulares ou mesmo pelos efeitos adversos da própria elevação não-fisiológica dos níveis intracelulares de c-di-GMP (Christen et al., 2006). Entretanto, estima-se que das proteínas que possuem um domínio GGDEF com sítio-A conservado, portanto possivelmente ativas, cerca de 30% apresentam um sítio-I degenerado (Christen et al.,

2006, Seshasayee et al., 2010). Por exemplo, das 24 proteínas GGDEFs de *Xac*, que apresentam um sítio-A potencialmente ativo, 8 não apresentam sítio-I conservado (XAC0258, XAC0593, XAC0610, XAC0644, XAC1938, XAC2382, XAC2810 e XAC3460). Portanto, provavelmente estas proteínas devem estar submetidas a mecanismos alternativos de controle da atividade de DGC (Yang et al., 2011). Como XAC0610 tem um sítio-I degenerado, possui uma atividade de DGC mensurável e não apresenta evidências de inibição pelo produto, esta proteína constitui-se em um bom modelo para estudos de cinética enzimática de DGCs com ausência de inibição alostérica.

Os dados de cinética enzimática de XAC0610_{HIS-35-880} sugerem um efeito de cooperatividade positiva para a ligação dos substratos, com uma constante de dissociação para a ligação da primeira molécula de GTP (K_1) cerca de 3-5 vezes maior que a constante de dissociação para a ligação da segunda molécula de GTP (K_2) (Tabela 12). É importante resaltar que todos os dados cinéticos de DGCs publicados até o momento foram tratados utilizando as premissas do modelo cinético de Michaelis-Menten (Christen et al., 2006, Wassmann et al., 2007, Boehm et al., 2009, De et al., 2009, Qi et al., 2009, Yang et al., 2011). Entretanto, a equação de Michaelis-Menten, que é válida apenas para enzimas que se ligam a um único substrato ou para enzimas bissubstratos em condições em que a concentração de um dos substratos é fixa (Purich, 2010), é claramente inadequada para a análise da cinética de DGCs. Isto porque, a reação de DGC envolve duas moléculas de substrato idênticas que se condensam para formar um produto simétrico (c-di-GMP). O modelo mais simples para representar este mecanismo, mostrado na Figura 54 (C), leva a obtenção de uma equação de velocidade (Eq. 5, ver Material e Métodos) que é de segunda ordem em

relação ao substrato (GTP) e, portanto, possui o termo $[S]^2$. Este termo $[S]^2$ leva a obtenção de um gráfico $V_0 \times [S]$ não-hiperbólico e de um gráfico $1/V_0 \times 1/[S]$ não-linear (Figura 54). Isto será verdade mesmo para o caso de uma enzima DGC não apresentar cooperatividade entre os dois sítios de ligação do substrato (i.e., quando $K_1 = K_2 = K$). Neste caso a Eq. (5) pode ser simplificada para:

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]^2}{K^2 + 2K[S] + [S]^2} \quad (7).$$

As Equações (5) e (7) mostram que o caráter sigmoidal do gráfico $V_0 \times [S]$ é derivado do fato de que em baixo $[S]$, a relação $V_0 \times [S]$ é parabólica ($V_0 \propto [S]^2$) ao invés de linear ($V_0 \propto [S]$) como observado para a cinética de Michaelis-Menten. A Equação (7) também mostra que, na ausência de cooperatividade, a região parabólica do gráfico sigmoidal $V_0 \times [S]$ ficará restrita ao intervalo de $[S]$, onde $[S] \ll K$. Se o valor da constante K for muito pequeno, então a natureza sigmoidal do gráfico $V_0 \times [S]$ pode não ser detectada em experimentos onde a menor concentração de substrato utilizada for igual ou maior do que K . Para a situação mais abrangente, descrita pela Equação (5), a região parabólica do gráfico sigmoidal $V_0 \times [S]$ ficará restrita ao intervalo de $[S]$, onde $2K_2[S] + [S]^2 \ll K_1K_2$, ou seja, onde $[S] \ll ((K_1/K_2 + 1)^{1/2} - 1)K_2$. Para XAC0610_{HIS-35-880} este fator tem um valor de aproximadamente 19 μM , utilizando os valores de K_1 e K_2 descritos na Tabela 12. Como a menor concentração de GTP utilizada nos experimentos cinéticos com XAC0610_{HIS-35-880} foi cerca de 9 μM , a natureza sigmoidal do gráfico $V_0 \times [S]$ na Figura 54 (A) apresenta-se pouco evidente, embora o desvio em relação a cinética de Michaelis-Menten seja claramente observado pelos gráficos de duplo recíproco mostrados nas Figuras 54 (B) e 56 (B e D). A Figura 78 apresenta mais

alguns exemplos de gráficos $V_0 \times [S]$ obtidos por simulações cinéticas utilizando casos hipotéticos em que K_1 e K_2 variam entre 50 e 500 μM . Nestas simulações, pode ser observado que, se uma maior quantidade de dados utilizando baixo $[S]$ puder ser obtida, a natureza sigmoidal do gráfico $V_0 \times [S]$ ficará evidente para todas as situações, isto é, não-cooperatividade (linhas verde e vermelha), cooperatividade positiva (linha roxa) ou mesmo cooperatividade negativa (linha laranja). Finalmente, para ilustrar melhor as consequências da utilização de um modelo cinético incorreto, nós utilizamos a Eq. (5) para calcular os dados cinéticos de uma enzima DGC hipotética que apresenta $K_1 = 500 \mu\text{M}$, $K_2 = 100 \mu\text{M}$ e $k_{\text{cat}} = 100$ unidade arbitrárias (linha e quadrados pretos nas Figuras 78 C e D). A Figura 78 (C) mostra que, se os dados forem ajustados à equação de Michaelis-Menten (linha azul), o valor de k_{cat} será superestimado em 19% e o K_M será calculado como sendo 546 μM , um valor também maior do que os verdadeiros valores de K_1 ou K_2 . Além disso, se um modelo não-cooperativo for assumido, utilizando a restrição $K_1 = K_2$ (linha vermelha), o valor de k_{cat} também será superestimado em 8% enquanto que a constante K ($= K_1 = K_2$) será estimada com um valor intermediário igual a 170 μM (Figura 78 C).

Figura 78 – Simulações cinéticas. A e B) Simulações de gráficos V_0 vs $[S]$ para enzimas que seguem a cinética de Michaelis-Menten (curva preta) ou o modelo cinético proposto para as DGCs (curvas vermelha, verde, violeta e laranja). Os valores de K_M , K_1 e K_2 utilizados para a obtenção das curvas de simulação estão indicados na figura. k_{cat} foi fixado em 100 unidades arbitrárias, ou seja, em todas as simulações o mesmo V_{max} é obtido em altas $[S]$. Figuras (A) e (B) representam as mesmas curvas, e se diferem apenas no intervalo de $[S]$ que está sendo exibido. Note que, enquanto o gráfico do modelo de Michaelis-Menten é linear em baixo $[S]$, o gráfico V_0 vs $[S]$ para o modelo cinético de DGC é parabólico em baixo $[S]$, independentemente do modo de ligação do substrato, se não-cooperativo (vermelho e verde), com cooperatividade positiva (violeta) ou negativa (laranja). C e D) Os dados cinéticos (quadrados pretos) de uma enzima DGC hipotética foram calculados pela Eq. (5) considerando $K_1 = 500 \mu M$,

$K_2 = 100 \mu\text{M}$ e $k_{\text{cat}} = 100$ unidades arbitrárias. Este conjunto de dados foi então ajustado à equação de Michaelis-Menten (curva azul) e ao modelo cinético proposto para as DGCs considerando o caso de não-cooperatividade (aplicando a restrição $K_1 = K_2$, Eq. 7, curva vermelha) ou de cooperatividade (Eq. 5, curva preta). Abaixo do gráfico são apresentados os parâmetros cinéticos calculados utilizando cada um dos 3 modelos. Figuras (C) e (D) representam o mesmo conjunto de dados, analisado em (C) de maneira a permitir variações no valor de k_{cat} ou mantendo-o fixo a 100 unidades arbitrárias (asteriscos) no caso das análises em (D).

Até onde sabemos a ligação cooperativa de GTP a DGCs diméricas não foi relatada em estudos prévios, e nem mesmo a possibilidade de sua existência foi mencionada até então. A Figura 54 (C) mostra que mesmo o modelo mais simples que se possa imaginar para o funcionamento de uma DGC sugere, imediatamente, a possibilidade da existência de cooperatividade em relação ao substrato (seja ela positiva ou negativa). Considerando a natureza simétrica dos dois sítios-A ligados a GTP e também do produto resultante, c-di-GMP, o modelo cinético proposto parece razoável. Não está claro, até o momento, porque este fenômeno não foi observado em estudos cinéticos prévios com DGCs (Christen et al., 2006, Wassmann et al., 2007, Boehm et al., 2009, De et al., 2009, Qi et al., 2009, Yang et al., 2011). Uma possível explicação seria a de que este fenômeno de cooperatividade de ligação ao substrato talvez seja uma característica exibida apenas por certo grupo de enzimas DGC. É possível também que os desvios em relação à cinética de Michaelis-Menten observados neste trabalho, tenham sido mascarados por efeitos complicados de inibição pelo produto nas enzimas DGCs estudadas por outros grupos. Assim como XAC0610, outras DGCs também são enzimas complexas contendo múltiplos domínios. A presença de sítios alostéricos que regulam a dimerização, a própria orientação dos domínios GGDEF (Chan et al., 2004, Christen et al., 2006, Wassmann et al., 2007, Yang et al., 2011) e o equilíbrio entre monômeros, dímeros e possivelmente oligômeros maiores

(De et al., 2008), podem introduzir níveis complexos de controle neste modelo cinético, os quais podem acentuar ou encobrir os efeitos da cooperatividade dependente de GTP. A compreensão destes mecanismos regulatórios se torna um grande desafio para ser alcançado a partir de um ponto de vista cinético. No entanto, é de se esperar que um profundo conhecimento da cinética de DGCs oligoméricas, contendo várias camadas de controle, seja necessário para que possamos modelar precisamente as vias de sinalização por c-di-GMP fisiologicamente relevantes.

Christen et al. (2005) mostraram que, na proteína CC3396 de *C. crescentus*, a ligação de GTP em seu domínio GGDEF degenerado ($K_D = 4 \mu\text{M}$) pode controlar alostericamente a atividade de fosfodiesterase do domínio EAL adjacente. Entretanto, neste caso, a proteína CC3396 é monomérica e nenhuma evidência de cooperatividade na ligação do GTP foi observada (Christen et al., 2005). Rao et al. (2009a) verificaram que o domínio GGDEF da proteína TM1788 de *Thermatoga maritima* apresenta baixos níveis de atividade de DGC devido à ligação de c-diGMP ao sítio alostérico (sítio-I), o que faz com que a enzima seja mantida em um estado inativo dimérico. Quando o sítio-I foi mutado para eliminar sua capacidade de ligação ao c-di-GMP a atividade de DGC foi aumentada, apesar da observação de que este mutante do domínio GGDEF de TM1788 comporta-se predominantemente como monômero em solução. Os autores do estudo especularam que, na ausência de inibição alostérica pelo produto, espécies diméricas da proteína se formam transientemente para produzir um complexo ativo. Interessantemente, a proteína TM1788 mutada apresentou indícios de uma relação atividade de DGC semi-quantitativa versus [GTP] fortemente sigmoidal, embora isso não tenha sido discutido pelos autores deste estudo (Rao et al., 2009a).

Ligação cooperativa do substrato pode desempenhar um importante papel na regulação *in vivo* da atividade de algumas DGCs, aumentando suas sensibilidades a pequenas variações nos níveis celulares de GTP. Interessantemente, vem sendo demonstrado que, em *B. subtilis*, o nucleotídeo (p)ppGpp atua como principal regulador da homeostase de GTP. Quando células de *B. subtilis* (p)ppGpp-negativas são tratadas com guanosina exógena, os níveis de GTP aumentam cerca de 20 vezes o seu estado normal. A consequência desta desregulação da homeostase de GTP é uma rápida morte celular (Kriel et al., 2012). Em *E. coli*, a concentração de GTP em células em fase de crescimento logarítmica foi estimada sendo igual a 1,6 mM. Entretanto quando as células entram em fase estacionária, a concentração de GTP diminui 4 vezes (Buckstein et al., 2008). As DGCs cooperativas poderiam ser mais eficientemente ativadas em resposta a um aumento nos níveis de GTP e também mais eficientemente desativadas quando os níveis de GTP fossem reduzidos. A evolução poderia ter gerado DGCs exibindo diferentes graus de afinidade por GTP, com diferentes constantes K_1 e/ou K_2 , em que cada uma destas proteínas torna-se ativa ou inativa em um determinado momento do ciclo celular, ou em certas condições de estresse. Desta forma, a ligação cooperativa ao substrato poderia ser considerada como um novo mecanismo relevante, pelo qual as flutuações da concentração *in vivo* de GTP poderiam ser utilizadas para modular a atividade enzimática de DGCs.

O fenômeno da cooperatividade permite aos sistemas químicos uma resposta tudo ou nada em uma faixa reduzida de concentrações de substrato. Por exemplo, na ausência de cooperatividade, a mudança conformacional dependente de ligante entre dois estados conformacionais requer uma alteração de 81 vezes na concentração do ligante para alternar 90% de uma conformação em 90% de outra. Dependendo do grau

de cooperatividade, esta mudança populacional pode ser alcançada em um intervalo de concentração muito mais estreito (Fersht, 1999, Edelstein et al., 2010). Será interessante determinar se, em alguns genomas bacterianos que codificam para um grande número de DGCs ativas, algumas dessas enzimas sejam ajustadas para responder de um modo cooperativo a flutuações muito pequenas nos níveis de substrato. Deste modo, as pequenas flutuações nos níveis celulares de GTP poderiam potencialmente ser utilizadas como sinais para finos ajustes em processos fisiologicamente importantes.

5.3. Estudos funcionais e bioquímicos com XAC2446 revelam evidências de comunicação entre as vias de sinalização por c-di-GMP e (p)ppGpp em *Xac*

5.3.1. Estrutura e organização do gene *xac2446*

Uma descrição dos genes localizados próximos a *xac2446* no genoma de *Xac* é encontrada na Tabela 18. O gene *xac2446* possui a mesma orientação no genoma de *Xac* que os genes *xac2442*, *xac2443*, *xac2444* e *xac2445* (Figura 79 A). Esta orientação possibilitaria a existência de uma organização destes genes em um único operon, apesar de ferramentas de predição de operons indicarem que apenas os genes *xac2443* e *xac2444* fazem parte de uma mesma unidade transcricional (Price et al., 2005, Taboada et al., 2012). Os genes que apresentam a mesma orientação genômica do gene *xac2446* codificam para proteínas hipotéticas, sendo que apenas XAC2443 e XAC2444 possuem domínios proteicos conhecidos. XAC2443 possui o domínio SIR2_2, envolvido na desacetilação de proteínas (Zhao et al., 2004, Schwer & Verdin, 2008), e XAC2444 apresenta um domínio de função desconhecida (DUF87) que possui

similaridade com outros domínios envolvidos na divisão celular (FtsK_SpoIIIE), ligação ao DNA (TrwB_AAD_bind) ou replicação do DNA (AAA_10 e AAA_22).

Tabela 18 – Descrição dos genes adjacentes a *xac2446* no genoma de *Xac*.

Gene	Notação	Arquitetura de domínios
<i>xac2441</i> (<i>repA</i>)	<i>replication protein</i>	RepA_C
<i>xac2442</i>	<i>hypothetical protein</i>	Nenhum domínio conhecido
<i>xac2443</i>	<i>hypothetical protein</i>	SIR2_2; AstE_AspA
<i>xac2444</i>	<i>hypothetical protein</i>	DUF87; AAA_10; TrwB_AAD_bind; FtsK_SpoIIIE; AAA_22
<i>xac2445</i>	<i>hypothetical protein</i>	Nenhum domínio conhecido
<i>xac2447</i> (<i>cheW</i>)	<i>chemotaxis protein</i>	CheW
<i>xac2448</i> (<i>mcp</i>)	<i>chemotaxis protein</i>	MCPsignal; 4HB_MCP_1; HAMP; Reo_sigmaC; Mur_ligase_C; DUF1043; SPC25; ANTH

(Fonte: KEGG - <http://www.genome.jp/kegg/>)

Figura 79 – (A) Orientação do gene *xac2446* no genoma de *Xac*. (B) Sequência de nucleotídeos do gene *xac2446* e sua correspondente sequência de aminoácidos traduzida na região vizinha ao códon de iniciação TTG anotado para a metionina +1 (quadrado cinza). Possíveis códon de iniciação ATG são encontrados nas posições -

15 e +52 (quadrados pretos) da mesma janela de leitura do códon de iniciação TTG anotado.

O gene *xac2446* também foi anotado com o códon de iniciação alternativo TTG (da Silva et al., 2002). Entretanto, códons de iniciação canônicos (ATG) também podem ser encontrados nas posições -15 ou +52 da mesma janela de leitura para o gene *xac2446* (Figura 79 B), indicando que o códon de iniciação verdadeiro pode ser diferente do anotado. O códon de iniciação do gene *xcv2623*, homólogo de *xac2446* em *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Tabela 19), foi anotado como sendo o correspondente códon -15 de *xac2446* (Figura 81) (Thieme et al., 2005).

Tabela 19 – Distribuição das proteínas estudadas nos genomas de diferentes linhagens de *Xanthomonas*.

Arquitetura de domínios	<i>Xac</i> 306	<i>Xcc</i> 8004	<i>Xcc</i> 33913	<i>Xcv</i> 85-10
XAC0610	XC_0637	XCC3523	XCV0667
XAC1185	XC_3162	XCC1087	XCV1211
XAC2446	XC_1803	XCC2313	XCV2623
XAC2897	XC_1383	XCC2731	XCV3048

A expressão do gene *Xc_1803*, homólogo a *xac2446* em *X. campestris* pv *campestris* (*Xcc*) (Tabela 19), é influenciada pelo regulador pós-transcricional RsmA/CsrA (Lu et al., 2012). RsmA (*Regulator of Secondary Metabolism*), ou seu ortólogo CsrA (*Carbon Storage Regulator*), é uma proteína regulatória que controla diversos processos bacterianos como metabolismo de carbono (Sabnis et al., 1995, Liu et al., 1995), formação de biofilme (Jackson et al., 2002, Wang et al., 2005, Lu et al.,

2012), motilidade (Wei et al., 2001, Ang et al., 2001), captação de peptídeos (Dubey et al., 2003), comunicação célula-célula (*Quorum sensing*) (Lenz et al., 2005) e virulência (Heurlier et al., 2004, Chao et al., 2008, Mulcahy et al., 2008). Estudos em *E. coli* e *Salmonella typhimurium* mostraram que CsrA também controla o metabolismo de c-di-GMP por meio da regulação direta da expressão de proteínas diguanilato ciclases (Jonas et al., 2008, Jonas et al., 2010). A regulação desses processos por RsmA/CsrA é exercida pela ligação específica da proteína ao motivo 5'-A(N)GGA-3' localizado próximo ou sobre o sítio de Shine-Delgarno (Valverde et al., 2004, Mercante et al., 2009, Lapouge et al., 2013, Kulkarni et al., 2014), afetando assim a tradução e/ou estabilidade dos mRNAs alvos (Wei et al., 2001, Dubey et al., 2003, Wang et al., 2005). A deleção de RsmA em *Xcc* resultou em um aumento dos níveis de transcrição de 7 genes que codificam para proteínas contendo um domínio GGDEF ou ambos os domínios GGDEF e EAL, sendo demonstrada uma interação direta entre RmsA e o transcrito de 5 destes genes (*Xc_1803*, *Xc_1824*, *Xc_2228*, *Xc_2715* e *Xc_2866*) (Lu et al., 2012). Fazendo um paralelo entre *Xcc* e *Xac*, é provável que RsmA de *Xac* (codificado pelo gene *xac1743*) afete também a estabilidade e/ou tradução do transcrito do gene *xac2446*, entretanto experimentos futuros precisam ser realizados para testar esta hipótese.

XAC2446 é uma proteína de 346 resíduos de aminoácidos, composta por dois domínios: um domínio GAF e um domínio GGDEF (Figura 80 A e B). O domínio GGDEF de XAC2446 não deve apresentar atividade de DGC, pois possui um motivo GGDEF degenerado (ACDQF), além da ausência de outros resíduos de aminoácidos importantes para a catálise (Figura 17 e Tabela 7). XAC2446 também não possui um sítio inibitório conservado (Figura 17 e Tabela 7). Intrigantemente, Lu et al. (2012)

conseguiram observar uma pequena atividade de DGC utilizando o domínio GGDEF purificado de XC_1803, a proteína homóloga a XAC2446 em *Xcc* (Tabela 19). Como pode ser visto na Figura 81, XC_1803 também possui um motivo GGDEF degenerado (GAAHF) e, portanto, era de se esperar que fosse uma enzima inativa, embora esta observação não tenha sido discutida pelos autores desse estudo.

Figura 80 – (A) Arquitetura de domínios de XAC2446. A delimitação entre os domínios foi identificada de acordo com o banco de dados do Pfam (Punta et al., 2012). (B) Modelo por homologia da estrutura dos domínios GAF e GGDEF de XAC2446 obtido com o programa Phyre (Kelley & Sternberg, 2009) baseado nas estruturas de fRMs_r (PDB: 3MMH), de *Neisseria meningitidis* (Gruez et al., 2010), e NP_951600.1 (PDB: 3EZU), de *Geobacter sulfurreducens*, respectivamente.

5.3.2. XAC2446 exerce controle positivo sobre a motilidade bacteriana e controle negativo sobre a formação de biofilme

As proteínas XAC2446 e XC_1803, de *Xcc* 8004, possuem 61% de identidade e 73% de similaridade. O nocaute de *Xc_1803* em *Xcc* não levou a alterações nos

fenótipos avaliados, como virulência, atividades de endoglucanases e endomanases extracelulares, motilidade ou formação de biofilme (Ryan et al., 2007). Diferente do observado em *Xcc*, estudos fenotípicos com a linhagem nocaute *Xac*Δ2446 mostraram que XAC2446 regula negativamente a formação de biofilme bacteriano em superfície abiótica (Figura 69) e, em contra partida, regula positivamente a motilidade de *Xac* em meio SB semi-sólido (Figura 67).

XAC2446/1-346	1	-----MLPGGVNATIGARLPANEDERVEALHAYRLLDTSPEPSYDAFTSIAAAVCRMPMALI	57
XC_1803/1-334	1	-----MGAPPPANEDDLAALHSYNILDTAPEPLYDDITAAAAQLCRTPMALI	48
XCV2623/1-361	1	MQIPDAPALNLIQATLLPGGVNATPGARLPANEDERVEALHAYRLLDTAPEPSYDAFTSIAAALCGMPMALI	72
Consensus		-----LPGGVNATMGA++PANED++ALH++Y++LDTAPEP+YD++T++AA+LCR+PMALI	
XAC2446/1-346	58	SLVDTHRQWFKSRIGMQQNETPRELSFCAHAILEPDQVMEVGDTHLDERFVGNALVTGEPQIRFYAGAPLLT	129
XC_1803/1-334	49	SLIDQDRQWFKSRVGMQPAETPRDLAFCAHAILQPDQMEVGDTFVDPRFARNALVTGGPQIRFYAGAPLLT	120
XCV2623/1-361	73	SLVDTHRQWFKSRLGMQQS ETPRELSFCAHAILEPDQVMEVGDTHLDKRFARNALVTGEPQIRFYAGAPLLT	144
Consensus		SLD++RQWFKSRVGMQ+AETPR+L+FCAHAILE+PDQ+MEVGDT++DPRFARNALVTG+PQIRFYAGAPLLT	
XAC2446/1-346	130	PDGIALGTLCVLDRVPRRLSVAERDALQALARQVVSTIELQQAARLVELDALRDALTGRWNRAGLEHALHAL	201
XC_1803/1-334	121	SDGVALGTLCVLDRAPRTLSDAERTALQALARQVVTTIELRQAARLLEGDALRDPLTDLWNRGLEH--ML	189
XCV2623/1-361	145	PDGIALGTLCVLDRVPRRLSATERDALQALARQVVSTIELQQAARLVELDALRDALTGRWNRAGLEHALHTL	216
Consensus		+DG+ALGTLCVLDR+PR+LSDAER+ALQALARQVV+TIEL+QAARL+E+DALRD+LT++WNR+GLEHALHML	
XAC2446/1-346	202	ADAPSSAADAPLGFMLLELDGFKRQKLQAGAAPADATLLQVATLLEAQLPPAAIIVARLACDQFCVALPATAA	273
XC_1803/1-334	190	EDAAPVAKLHGLAFVLEIDGFKRKLQFGS DAADATLVQAARCIETEPQEPGGVARIGAAHFCMVLPGADS	261
XCV2623/1-361	217	ADAPSSAADAPLGFMLLELDGFKRQKLQAGAAAADATLLQVAALLEAQLPADALVARLACDQFCVALPETAA	288
Consensus		+DAAAA++L+F+L+E+DGFKR+KLQ+G+DAADATL+Q+AR++E++++EP+GVAR+++++FC++LPG+++	
XAC2446/1-346	274	SAALAAAE DLKAVEDAHWPTGPTLSAGLV DVATPTSLDSATLLARARHALQRARDDGRNRVHCFD GWQLR	345
XC_1803/1-334	262	AQALASVQLQTIIAAACWPADTISITAGLV CVAPGEPLDSHVL MARARHALLGAARAGRNCVQRFDGWQTD	333
XCV2623/1-361	289	SAALATAEDLRLKAVEDAHWPTGPTLSAGVVDVATPTALDSNTLLARARHALQQARGDGRNRVHGF DGWQLR	360
Consensus		++ALAS+++L+++++A+WP+++++AGLV+VA+++PLDSH+L+ARARHAL+GA+R+GRN+V+RFDGWQ++	

Figura 81 – Alinhamento de sequências entre XAC2446 e seus homólogos: XC_1803, de *X. campestris* pv. *campestris* (*Xcc*), e XCV2623, de *X. campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*). O quadrado transparente indica a localização do motivo GGDEF não canônico de XAC2446 e seus homólogos.

O processo de formação de biofilme por *Xac* é ainda pouco compreendido. Até o momento sabe-se que para a formação de um biofilme maduro por *Xac* são necessários EPS (Dunger et al., 2007, Rigano et al., 2007, Guo et al., 2010), LPS (Li & Wang, 2011b), motilidade celular dependente e independente de flagelo (Malamud et al., 2011,

Malamud et al., 2013), adesinas (Gottig et al., 2009) e DNA extracelular (Li & Wang, 2011a). Além disso, os estudos indicam que diferentes vias regulatórias e de sinalização estão envolvidas na formação de biofilme por *Xac*, e que estas vias podem ser ativadas por vários sinais extracelulares ou intracelulares específicos (Andrade et al., 2006, Yan & Wang, 2011, Li & Wang, 2011a).

Em *Xcc*, a formação de biofilme requer goma xantana e um exopolissacarídeo ainda não caracterizado cuja síntese é direcionada pelos produtos do cluster de genes *xag* (Tao et al., 2010b). Em contra partida, a enzima extracelular β -(1,4)-endomanase, codificada pelo gene *manA*, tem sido associada a dispersão do biofilme (Dow et al., 2003, Crossman & Dow, 2004, Tao et al., 2010b). O sistema Rpf/DSF, envolvido na comunicação célula-célula em *Xanthomonas* (Slater et al., 2000, Dow et al., 2003), influencia positivamente a expressão do gene *manA* e negativamente a expressão do cluster de genes *xag* (Tao et al., 2010b). O sistema Rpf/DSF está ligado a alterações nos níveis intracelulares de c-di-GMP por meio da ação de RpfG, uma fosfodiesterase de c-di-GMP, contendo um domínio HD-GYP (Ryan et al., 2006a, Dow et al., 2006, Andrade et al., 2006). Isto é consistente com vários estudos em diferentes bactérias em que a formação de biofilme tem sido associada com níveis elevados de c-di-GMP (Hengge, 2009, Romling, 2012, Sondermann et al., 2012, Ryan, 2013, Romling et al., 2013). Acredita-se que os efeitos regulatórios do sistema Rpf/DSF sobre a expressão dos genes *xag* e *manA* sejam mediados pelo regulador transcricional Clp (Hsiao et al., 2010). Níveis elevados de c-di-GMP influenciam negativamente a habilidade de ligação ao DNA de Clp (Leduc & Roberts, 2009, Gomelsky, 2009). O nocaute de *clp* em *Xcc* leva a uma diminuição da expressão do gene *manA* e um aumento da expressão dos

genes *xag*, indicando que Clp pode atuar tanto como um ativador quanto um repressor da transcrição de genes específicos (Lu et al., 2012). Além do sistema Rpf/DSF de comunicação célula-célula, o regulador traducional RsmA/CsrA, que influencia a expressão de alguns genes de proteínas contendo domínio GGDEF (Lu et al., 2012), o sistema RavS/RavR de resposta a baixa tensão de oxigênio (He et al., 2009) e o sistema de dois componentes RbfS/RbfR (Li & Wang, 2011a), também podem levar a alterações nos níveis celulares de c-di-GMP e, conseqüentemente, a efeitos divergentes na expressão dos genes *xag* e *manA* mediada pelo regulador transcricional Clp. Vale ressaltar que a mutação de *clp* não levou ao fenótipo de agregação celular em *Xcc*, sugerindo que a regulação por Clp é necessária, porém não suficiente para a formação de biofilme e que, provavelmente, outros processos influenciados por c-di-GMP estão também envolvidos (He et al., 2007, Lu et al., 2012).

Como XAC2446 não deve ser uma DGC ativa, o controle de XAC2446 sobre a motilidade e formação de biofilme de *Xac* deve ser exercido por meio de interações proteína-proteína. Em ensaios de duplo-híbrido em leveduras, utilizando como isca genes que codificam para fatores sigma da RNA polimerase de *Xac*, Francischini (2010) observou uma interação entre XAC2446 e XAC1319, um fator σ^{ECF} . Os σ^{ECFs} são fatores sigma sensíveis a sinais extracitoplasmáticos (Hermann, 2002, Brooks & Buchanan, 2008, Mascher, 2013). O fator $\sigma^{ECF}_{XAC1319}$ é ortólogo aos fatores σ^E de *E.coli* e *P. aeruginosa* (chamado de AlgU) (Francischini, 2010). Os fatores σ^E são caracterizados por desempenhar diversas funções em bactérias, como controle da produção de exopolissacarídeos, respostas ao estresse oxidativo, choque térmico, virulência, densidade celular e carência de nutrientes (Miticka et al., 2003, Alba & Gross, 2004). Entretanto, nos ensaios de duplo-híbrido em leveduras utilizando

XAC2446 como isca (Tabela 16) a interação entre XAC2446 e $\sigma^{\text{ECF}}_{\text{XAC1319}}$ não foi observada novamente, indicando que esta interação talvez não seja verdadeira. Por outro lado, foram observadas e confirmadas (Tabela 16 e Figura 72) interações de XAC2446 com si própria, com outra DGC, XAC2897, e com XAC1185, uma proteína homóloga ao domínio fosfohidrolase de SpoT.

A interação de XAC2446 com si mesma indica que esta proteína apresenta uma estrutura quaternária oligomérica, assim como observado para a maioria das DGCs (Chan et al., 2004, Paul et al., 2007, Wassmann et al., 2007, Schirmer & Jenal, 2009). Análises por cromatografia de exclusão molecular com a proteína recombinante XAC2446_{HIS-1-346} (40,2 kDa) indicam a formação de um dímero com um peso molecular estimado de 79,4 kDa (Figura 75 B).

XAC2897 é uma proteína transmembrana que apresenta um domínio Cache periplasmático e um domínio GGDEF citoplasmático (Tabela 16). Os domínios Cache (Ca²⁺ channels, chemotaxis receptors) são amplamente encontrados em bactérias e provavelmente possuem um papel no reconhecimento de pequenas moléculas, periplasmáticas e/ou extracitoplasmáticas, em diferentes classes de proteínas sensoras (Anantharaman & Aravind, 2000). Ao contrário de XAC2446, XAC2897 é uma DGC potencialmente ativa cujo domínio GGDEF apresenta resíduos de aminoácidos conservados envolvidos na catálise e ligação ao substrato (Figura 82). XAC2897 é homóloga a XCC2731 de *X. campestris* pv *campestris* linhagem ATCC 33913 (Tabela 19). O nocaute de XCC2731 provoca aumento da aderência de *Xcc* em superfícies abióticas, indicando que XCC2731 inibe a interação da célula bacteriana com o meio sólido (Hsiao et al., 2011). Por outro lado, a superexpressão de XCC2731 em *Xcc* resulta na formação de agregados celulares, redução de motilidade e redução da

produção de fatores de virulência (Hsiao et al., 2011). Estudos de atividade do promotor do gene *xcc2731*, utilizando o gene repórter da β -galactosidase, indicam que a expressão de *xcc2731* está submetida à repressão catabólica e é reduzida também em condições de alta osmolaridade ou concentrações limitantes de oxigênio (Hsiao et al., 2011). Assim como observado para o gene *xcc2731*, o promotor do gene *xac2897* também possui um sítio de ligação para o fator transcricional Clp (Tabela 20), caracterizado pela sequência consenso 5'-TGTGA(N6)TCACA-3' (Dong & Ebright, 1992). Em *Xcc*, a expressão do gene *xcc2731* é reduzida na linhagem mutante *clp* indicando que a ligação de Clp a sua região promotora ativa a transcrição do gene *xcc2731* (Hsiao et al., 2011). Em *Xac*, provavelmente, a ligação de Clp ao promotor do gene *xac2897* também deve atuar como um ativador transcricional, entretanto a possibilidade de Clp, ao contrário, atuar como um regulador negativo de *xac2897* não pode ser descartada sem a obtenção de dados experimentais em *Xac*.

Assim como XAC2897, a proteína YeaJ, em *E. coli* e *S. Typhimurium*, também possui um domínio Cache periplasmático e um domínio GGDEF conservado (Pesavento et al., 2008, Amarasinghe et al., 2013). Amarasinghe et al. (2013) propuseram que alterações no periplasma ou na membrana interna de *S. Typhimurium* ativam YeaJ, que por sua vez estimula os níveis intracelulares de c-di-GMP, conduzindo assim a uma perda de motilidade, redução da produção de fatores de virulência, e aumento na produção de EPS. O papel de XAC2446 na motilidade e formação de biofilme em *Xac* pode estar correlacionado com a interação e, conseqüente, alteração nos níveis de atividade de DGC de XAC2897, onde o domínio GGDEF não conservado de XAC2446 atuaria provavelmente como um inibidor da atividade de DGC do domínio

GGDEF de XAC2897 (Figura 83). Em *E. coli* os domínios GGDEF isolados das proteínas YdaM e YciR podem formar um heterodímero inativo, em que YciR inibe a atividade de DGC de YdaM (Lindenberg et al., 2013). Esta interação é específica uma vez que ela não ocorre quando o domínio GGDEF de outra DGC (YeaP) é utilizado (Lindenberg et al., 2013). Entretanto, na presença de todos os domínios de YciR a formação do heterodímero com o domínio GGDEF de YdaM deixa de ser observada, indicando que esta interação deve ser transiente ou condicional (Lindenberg et al., 2013). *In vivo*, a formação do heterodímero entre os domínios GGDEF de XAC2446 e XAC2897 pode também estar condicionada à presença de sinais ou ligantes, captados pelos domínios sensores Cache de XAC2897 e/ou GAF de XAC2446 (Figura 83).

Tabela 20 – Provável sítio de ligação à Clp na região promotora do gene *xac2897* e seus homólogos em outras espécies de *Xanthomonas*.

Gene	Provável sítio de ligação à Clp		
	Sequência (5' → 3') ^a	Localização ^b	Identidade ^a
XAC2897	<u>TGAG</u> Gcatcaa <u>TCACA</u>	-116/-101	8/10
XC_1383	<u>TGAG</u> Cggtcag <u>TCACA</u>	-117/-102	8/10
XCC2731	<u>TGAG</u> Cggtcag <u>TCACA</u>	-117/-102	8/10
XCV3048	<u>TGAG</u> Gcagcaa <u>TCACA</u>	-116/-101	8/10

^aBases idênticas à sequência consenso do sítio de ligação à Clp (TGTGA-N6-TCACA) estão em negrito e sublinhadas.

^bLocalização da sequência consenso relativa ao sítio de iniciação da tradução de cada gene.

XAC2897/1-494	1	MTSTTKRRRQRAQR IALHFVLTASWMLLLGSEYWS IHEERATALRS AQAQSLNLANS LAQHASDTLS IADAVLSGLVSRVEHD	83
XC_1383/1-494	1	MVSTSKQWRQRAQR IALHFVLTASWILLGSEYWS IHEERDSALRAAQTS LNLADSLAQHASDTMT IADAVLSGLVARLQQD	83
XCC2731/1-494	1	MVSTSKQWRQRAQR IALHFVLTASWILLGSEYWS IHEERDSALRAAQTS LNLADSLAQHASDTMT IADAVLSGLVARLQQD	83
XCV3048/1-494	1	MTSTSKRRRQRAQR IALHFVLTASWMLLLGSEYWS IHEERATALRS AQAQSLNLANS LAQHASDTLS IADAVLSGLVSRVEHD	83
Consensus		M+STSK++RQRAQR IALHFVLTASW+LLLGSEYWS IHEER++ALR+AQ+QSLNLA+S LAQHASDT++IADAVLSGLV+R+++D	
XAC2897/1-494	84	QGSRAARS AMHEFLVHEARRS DRLHGI F IYAADGSWVSSSLGSTPRTHNNADRAYFKYHRDHRDALSLVGPPVQSRSDGSWVL	166
XC_1383/1-494	84	RGS ANEHAAMHAFVLS EARRS ERLHGI F IYAADGHWVNSSLGSLPRTHNNADRAYFKYHRDHRDALVFGPPVQSRSDGHVVI	166
XCC2731/1-494	84	RGS ANEHAAMHAFVLS EARRS ERLHGI F IYAADGHWVNSSLGSLPRTHNNADRAYFKYHRDHRDALVFGPPVQSRSDGHVVI	166
XCV3048/1-494	84	QGS SAARS AMHEFLVREARRS DRLHGI F IYAADGSWVSSSLDSTPRTHNNADRAYFKYHRDHRDALSLVGPPVQSRSDGSWVL	166
Consensus		+GSA++++AMH+FLVSEARRS +RLHGI F IYAADG+WV+SSLG+PRTHNNADRAYFKYHRDHRDAL++VGPPVQSRSDG+WV+	
XAC2897/1-494	167	TLRRLDAPSGEFAGVVLVTLQLKYFQNYYSTFEVGPHGTIGMTNDDGIVMVRRPDKQGVIGTSIAGTSIYVTMRARKHGTAT	249
XC_1383/1-494	167	TLRRLTTPSGEFDGVALVTLRLKYFQDYYSRFQVGDHGTIGLFNDDGVVIVRRPERDDQTASSIAGTSLYVTMRNERRGTLT	249
XCC2731/1-494	167	TLRRLTTPSGEFDGVALVTLRLKYFQDYYSRFQVGDHGTIGLFNDDGVVIVRRPERDDQTASSIAGTSLYVTMRNERRGTLT	249
XCV3048/1-494	167	TLRRLNAPGGEFAGVVLVTLQLKYFHSYYSTFEVGPHGTIGMTNDDGIVMVRRPDKQGVIGTSIAGTSIYVTMRARKHGTAT	249
Consensus		TLRRLT+PSGEF+GV+LVTL+LKYFQDYYS+F+VG+HGTIG++NDDG+V+VRRP++++++S IAGTS+YVTMR++++GT+T	
XAC2897/1-494	250	YRSPIDRVERISSFAPARPYPLTVLTGFSVDDALANWRETARQRI VVAALGCTLLLGVGIWLDLQLRRMHRNEAKLSTEAVVD	332
XC_1383/1-494	250	YRLPLDGVQRIS SFVPARPYPLTVLTGVAVDDALANWRASARQRI I IAVLGFVLLLA VG IWLDLQLRRMHRNEARLSS EVWVD	332
XCC2731/1-494	250	YRLPLDGVQRIS SFVPARPYPLTVLTGVAVDDALANWRASARQRI I IAVLGFVLLLA VG IWLDLQLRRMHRNEARLSS EVWVD	332
XCV3048/1-494	250	YRSPIDGVERISSFAPARPYPLTVLTGVS VDDALANWREARQRI VVAALGCTLLLGVGIWLDLQLRRMHRNEAKLSTEAVVD	332
Consensus		YR+P+DGV+RISSF+PARPYPLTVLTGV+VDDALANWR+SARQRI++A+LG++LLL+VG IWLDLQLRRMHRNEA+LS+E+WVD	
XAC2897/1-494	333	ALTGIANRRAFDHRLSRALQDAVRL EAPLS VLMIDVDHF ^{D} FKLYNDTYGHVNGDACLRL IAGAIAGCSRRS ^{RxxD} EDLAARYGGEEFGM	415
XC_1383/1-494	333	ALTGIANRRAFDHRLSEALQDAVHTQAPLS VLMIDVDHF ^{F} FKLYNDTYGHVNGDACLRL IAGAIAGCARRSDDIAARYGGEEFGM	415
XCC2731/1-494	333	ALTGIANRRAFDHRLSEALQDAVHTQAPLS VLMIDVDHF ^{N} FKLYNDTYGHVNGDACLRL IAGAIAGCARRSDDIAARYGGEEFGM	415
XCV3048/1-494	333	ALTGIANRRAFDHRLSRALQDAVRL EAPLS VLMIDVDHF ^{D} FKLYNDTYGHVNGDACLRL IAGAIAGCSRRS ^{GGDEF} EDLAARYGGEEFGM	415
Consensus		ALTGIANRRAFDHRLS+ALQDAV+++APLSVLMIDVDHF ^{D} FKLYNDTYGHVNGDACLRL IAGAIAGC+RRS+D+AARYGGEEFGM	
XAC2897/1-494	416	ILPHTDAAGALRLADAVRNAVAELGLMHLSSPTSAHVTVSI GAATFEPGEAPLSPNAIVHDAD ^{K} ALYRAK ^{R} QKGRNRTSA	494
XC_1383/1-494	416	ILPHTDVAGALRLADAIRTA ^{V} VAELGLMHLSSPTSAHVTVSVGAATFEPGETPLTPDAIVRDADGALYRAKQGG ^{R} DRRTSA	494
XCC2731/1-494	416	ILPHTDVAGALRLADAIRTA ^{V} VAELGLMHLSSPTSAHVTVSVGAATFEPGETPLTPDAIVRDADGALYRAKQGG ^{R} DRRTSA	494
XCV3048/1-494	416	ILPHTDAAGALRLADAVRNAVAELGLMHLSSPTSAHVTVSI GAATFEPGEAPLSPNAIVHDAD ^{K} ALYRAKQKGRNRTSA	494
Consensus		ILPHTD+AGALRLADA+R+AVAELGLMHL+SPPTSAHVTVS+GAATFEPGE+PL+P+AIV+DAD+ALYRAKO+GR+RTSA	

Figura 82 – Alinhamento de sequências entre XAC2897 e seus homólogos em diferentes linhagens de *Xanthomonas*. Acima do alinhamento de sequências, resíduos de aminoácidos do domínio GGDEF, importantes para a inibição pelo produto ou para a ligação do substrato e catálise, estão destacados em negrito e sublinhados.

Figura 83 – Modelo proposto para a inibição da atividade de DGC de XAC2897 pela interação com XAC2446. Os domínios sensores Cache (periplasmático) de XAC2897 e/ou GAF (citoplasmático) de XAC2446 modulam a formação de um heterocomplexo entre as duas proteínas em resposta a possíveis ligantes ou estímulos ambientais. Na ausência da interação com XAC2446, o homodímero de XAC2897 é capaz de formar um sítio ativo funcional e contribuir para o aumento dos níveis celulares de c-di-GMP durante o processo de formação de biofilme. Por outro lado, a interação do domínio GGDEF não conservado de XAC2446 com o domínio GGDEF conservado de XAC2897 impede a correta formação de um sítio catalítico simétrico e funcional, inibindo a atividade de DGC e evitando o acúmulo de c-di-GMP durante a dispersão do biofilme.

Nos ensaios de interação proteína-proteína por duplo híbrido em leveduras, XAC2446 também interagiu com XAC1185 (Tabela 16 e Figura 72). XAC1185 é uma proteína homóloga ao domínio fosfohidrolase de SpoT, e apresenta atividade de degradação do segundo mensageiro (p)ppGpp *in vivo*, sob condições específicas (ausência do gene *rpoZ*, que codifica para a subunidade ômega da RNA polimerase)

(Andrade, 2011). Análises cromatográficas com proteínas recombinantes indicaram que, individualmente, XAC2446 e XAC1185 comportam-se preferencialmente como homodímeros em solução, mas na presença uma da outra uma fração das proteínas podem formar um heterocomplexo, menos estável, provavelmente resultante da interação entre dois homodímeros (Figura 74 e Figura 75). É possível que *in vivo* a formação do complexo entre XAC2446 e XAC1185 seja estabilizada por algum ligante (c-di-GMP ou (p)ppGpp, por exemplo) ou mesmo pela ativação do domínio GAF sensor de XAC2446. Neste caso a interação entre XAC2446 e XAC1185 também pode ser importante para a regulação dos fenótipos observados para a linhagem *Xac* Δ 2446. Embora nenhuma alteração fenotípica tenha sido observada entre a linhagem nocaute *Xac* Δ 1185 e a linhagem selvagem (Figura 67 e Figura 69) (Andrade, 2011).

O alormônio (p)ppGpp (guanosina penta- ou tetrafosfato) é conhecido por levar a alterações no metabolismo celular em bactérias em resposta a vários estímulos ambientais, como choque térmico (English et al., 2011), transição entre as fases de crescimento exponencial e estacionária (Lazzarini et al., 1971, Nystrom, 2004), carências de carbono (Flardh et al., 1994), ferro (Vinella et al., 2005), ácidos graxos (Battesti & Bouveret, 2006), fosfato (Spira et al., 1995) e aminoácidos (Haseltine & Block, 1973). O metabolismo de (p)ppGpp é controlado por enzimas da família RSH (RelA/SpoT Homolog), que possui como membros mais bem estudados as proteínas RelA e SpoT de *E. coli* (Haseltine & Block, 1973, Heinemeyer & Richter, 1977, Sy, 1977, An et al., 1979, Hernandez & Bremer, 1991). As proteínas da família RSH compreendem enzimas monofuncionais, que podem apresentar apenas o domínio de síntese ou de degradação de (p)ppGpp, enzimas contendo ambos os domínios, porém

com somente um deles ativo, como a sintetase RelA, e enzimas bifuncionais como SpoT, a qual atua principalmente como hidrolase mas pode atuar também como sintetase de (p)ppGpp em condições específicas (Murray & Bremer, 1996, Mechold et al., 2002, Hogg et al., 2004, Atkinson et al., 2011). Estas enzimas geralmente atuam em um estado monomérico, entretanto evidências da formação de espécies oligoméricas inativas têm sido relatadas como um possível mecanismo de regulação da atividade de RelA/SpoT (Gropp et al., 2001, Avarbock et al., 2005).

A molécula de (p)ppGpp proporciona resistência celular ao estresse e/ou carência nutricional (resposta estrigente) afetando diversos processos celulares por meio de dois mecanismos efetores principais: modificação da transcrição gênica (Magnusson et al., 2005, Potrykus & Cashel, 2008) e interação direta com proteínas alvo (Kanjee et al., 2012). Altas concentrações intracelulares de (p)ppGpp geralmente levam a diminuição da tradução de proteínas (Legault et al., 1972, Rojas et al., 1984), inibição da síntese de rRNA e tRNA (Barker et al., 2001a, Barker et al., 2001b, Paul et al., 2004a), inibição da replicação do DNA (Levine et al., 1991), diminuição das taxas de crescimento e divisão celular (Schreiber et al., 1995), inibição do transporte ativo de metabólitos (Hochstadt-Ozer & Cashel, 1972, Svitil et al., 1993), inibição de enzimas envolvidas no metabolismo de nucleotídeos e lipídios (Traxler et al., 2008), indução da síntese de enzimas envolvidas na biosíntese de aminoácidos (Barker et al., 2001a, Barker et al., 2001b, Paul et al., 2005), indução do gene *ropS*, que codifica o fator sigma da fase estacionária (Gentry et al., 1993), entre outros efeitos. Interessantemente, alguns estudos vêm demonstrando que (p)ppGpp também pode influenciar a formação de biofilme em bactérias (Balzer & McLean, 2002, Lemos et al., 2004, McLennan et al., 2008, Boehm et al., 2009, He et al., 2012). Em *E. coli*, por exemplo, a formação de um

tipo de biofilme, independente de fímbrias e celulose, requer a indução da expressão do exopolissacarídeo poli- β -1,6-N-acetilglicosamina (Poly-GlcNac), cuja síntese depende dos genes do operon *pgaABCD* (Wang et al., 2004, Itoh et al., 2008). A expressão do operon *pgaABCD*, por sua vez, é controlada negativamente pela proteína ligadora de RNA, CsrA (Wang et al., 2005). Além disso, Boehm et al. (2009) demonstraram que ppGpp e c-di-GMP atuam sinergicamente para também controlar a expressão de Poly-GlcNac, e consequentemente, a formação de biofilme em resposta ao estresse traducional. Tratamentos da linhagem mutante *csrA* de *E. coli* com doses subletais de inibidores da tradução de proteínas levam a uma diminuição dos níveis celulares de ppGpp, por ação do domínio HD fosfohidrolase de SpoT, resultando em uma desrepressão de PgaA. Por outro lado, uma alta expressão de PgaD requer o acúmulo de c-di-GMP pela diguanilato ciclase YdeH. Como PgaA e PgaD são codificados pelo mesmo operon mas seus níveis de expressão são influenciados diferencialmente por ppGpp e c-di-GMP, é provável que estes segundos mensageiros afetam a expressão das proteínas PgaA e PgaD à nível pós-transcricional, entretanto o mecanismos molecular exato ainda precisa ser determinado (Boehm et al., 2009). Boehm et al. (2009) propuseram que a sinalização por ppGpp em *E. coli* está envolvida na tomada de decisão entre duas respostas adaptativas mutuamente exclusivas; a carência nutricional leva a um aumento dos níveis celulares de ppGpp e evoca a resposta estrigente, enquanto que o estresse ribossomal, provocado por compostos inibidores da tradução, leva a uma rápida diminuição dos níveis celulares de ppGpp e induz a formação de biofilme dependente de poly-GlcNAc.

Figura 84 – Modelo para uma possível via de regulação da formação e dispersão de biofilme por *Xac* intermediada pelos efeitos de XAC2446 na modulação dos níveis celulares de ambos os segundos mensageiros: (p)ppGpp e c-di-GMP. Durante a formação de biofilme as atividades de DGC de XAC2897 e de fosfohidrolase de XAC1185 contribuem para o aumento e a diminuição dos níveis celulares de c-di-GMP e (p)ppGpp, respectivamente. A interação com XAC2446 inibe a atividade enzimática de ambas as proteínas, XAC2897 e XAC1185, evitando tanto acúmulo de c-di-GMP quanto a degradação de (p)ppGpp. O aumento dos níveis celulares de (p)ppGpp e a diminuição dos níveis de c-di-GMP ativam a motilidade e dispersão do biofilme de *Xac*.

A interação entre as proteínas XAC2446, contendo um domínio GGDEF, e XAC1185, contendo um domínio HD fosfohidrolase de (p)ppGpp, pode indicar que, assim como em *E. coli*, talvez uma correlação entre os níveis de c-di-GMP e (p)ppGpp também seja necessária para o controle preciso de processos celulares em *Xac*. Colaborando com esta hipótese estão as observações de que, em *Xac*, mutações que levam a alterações nas concentrações celulares de (p)ppGpp afetam também os níveis de c-di-GMP, de maneira que o aumento dos níveis de c-di-GMP é acompanhado pelo diminuição dos níveis de (p)ppGpp, e vice versa (Andrade, 2011). A relevância fisiológica das interações entre XAC2446 e XAC1185 ou XAC2897 ainda precisa ser mais profundamente investigada. Os fenótipos de menor motilidade e maior formação

de biofilme pela linhagem *Xac*Δ2446 podem ter sido causados por uma desregulação tanto nos níveis de c-di-GMP quanto de (p)ppGpp. Nesse cenário, XAC2446 quando presente atuaria provavelmente como um inibidor da atividade enzimática de ambas as proteínas XAC2897 e XAC1185, evitando assim o acúmulo de c-di-GMP pela DGC XAC2897 e a redução dos níveis celulares de (p)ppGpp pela fosfohidrolase XAC1185, efeitos os quais contribuiriam para um resultado final de inibição da formação de biofilme e aumento da motilidade de *Xac* (Figura 84).

Caso o mecanismo de regulação da atividade de XAC0610, por meio da resposta cooperativa a concentração do substrato, se provar atuante também em outras DGCs é possível que outra porta de comunicação entre as vias de sinalização por c-di-GMP e (p)ppGpp em *Xac* seja mediada pelos níveis celulares de GTP. Como já discutido anteriormente, estudos em bactérias gram-positivas vêm apontando que (p)ppGpp atua também como principal regulador da homeostase de GTP (Krasny & Gourse, 2004, Kriel et al., 2012). (p)ppGpp inibe diretamente a atividade de enzimas envolvidas na biosíntese de GTP, protegendo a célula contra os efeitos deletérios decorrentes de altos níveis celulares de GTP (Krasny & Gourse, 2004, Breton et al., 2008, Kriel et al., 2012). Apesar de ainda não estar claro como os altos níveis de GTP podem levar à morte celular, a regulação dos níveis de GTP por (p)ppGpp parece ser crucial para a sobrevivência sob várias condições adaptativas e pode ser conservada também em outras espécies bacterianas. Estudos em *E. coli* e *Vibrio cholerae*, por exemplo, mostraram que a interação com proteínas GTPases associadas ao ribossomo afeta a atividade enzimática de SpoT (Raskin et al., 2007, Jiang et al., 2007). O tratamento de *E. coli* com antibióticos que inibem a tradução de proteínas, provavelmente, ocasiona alterações na taxa de hidrólise de GTP pelas GTPases associadas ao ribossomo, que

por sua vez resulta em alterações no equilíbrio entre a síntese e hidrólise de (p)ppGpp mediada por SpoT (Boehm et al., 2009).

Vale ressaltar que a ação antagônica de c-di-GMP e (p)ppGpp parece não afetar somente a formação de biofilme, mas também a patogenicidade bacteriana: enquanto c-di-GMP atua na regulação negativa de fatores de virulência (Cotter & Stibitz, 2007), níveis basais de (p)ppGpp são necessários para uma manifestação completa da virulência por diferentes espécies bacterianas (Braeken et al., 2006). Além disso, como os dois segundos mensageiros c-di-GMP e (p)ppGpp são estruturalmente relacionados, é possível que eles possam competir pela ligação a algum alvo celular. Se isto for verdade, a conexão entre as vias de sinalização por c-di-GMP e (p)ppGpp se revelaria ainda mais complexa (Boehm et al., 2009).

6. CONCLUSÕES

Este trabalho permitiu a obtenção de avanços significativos no entendimento da cinética e atuação fisiológica de enzimas diguanilato ciclases (DGCs) utilizando como modelo as proteínas XAC0610 e XAC2446 do fitopatógeno *Xanthomonas citri*.

XAC0610 possui um domínio GGDEF, um domínio GAF e quatro domínios PAS. Os domínios GAF e PAS aparentemente não atuam como domínios sensores para a regulação da atividade de DGC de XAC0610, entretanto são fundamentais para a dimerização da proteína, permitindo uma correta aproximação entre os dois domínios GGDEF para a formação do sítio ativo. DGCs catalisam a formação de c-di-GMP a partir de duas moléculas de GTP. Embora seja bem conhecido que DGCs ativas são obrigatoriamente diméricas, em que cada monômero contém um domínio GGDEF que se liga a uma única molécula de GTP, neste trabalho nós mostramos pela primeira vez que uma enzima DGC pode exibir cooperatividade positiva com relação à concentração do substrato GTP (Figura 85). Embora até então negligenciada, a ligação cooperativa ao GTP pode constituir uma característica comum apresentada por um grupo de enzimas DGCs, que em determinadas condições, poderia oferecer um mecanismo fisiologicamente relevante para a regulação da atividade de DGC *in vivo*.

É evidente que um aspecto fundamental e distintivo do mecanismo de ação das DGCs – ou seja, o fato do sítio ativo ser formado a partir de dois domínios GGDEF equivalentes que se ligam a duas moléculas de substrato também equivalentes (GTP) para produzir uma molécula cíclica simétrica (c-di-GMP) – tem consequências importantes para a maneira pela qual os dados de cinética enzimática são tratados. Entretanto, até onde sabemos todos os dados de cinética enzimática de DGCs

disponíveis na literatura, até o momento, foram tratados erroneamente usando o mecanismo cinético padrão de Michaelis-Menten. No presente estudo nós apresentamos um mecanismo cinético geral mais adequado para a análise dos dados cinéticos de DGCs.

Figura 85 – Modelo estrutural e cinético da síntese de c-di-GMP catalisada por XAC0610. A região N-terminal de XAC0610, contendo um domínio GAF e quatro domínios PAS, possibilita a formação de um homodímero alongado de XAC0610. A dimerização de XAC0610 permite a correta aproximação dos dois domínios GGDEFs necessária para a formação do sítio catalítico. Assumindo que os dois domínios GGDEFs do homodímero de XAC0610 são cineticamente equivalentes, eles podem se ligar a primeira molécula de GTP com a mesma afinidade K_1 . A ligação da primeira molécula de GTP aumenta a afinidade do homodímero de XAC0610 pela segunda molécula de GTP que se liga ao segundo domínio GGDEF com uma constante de dissociação menor (K_2). O sítio catalítico contendo duas moléculas de GTP em orientação antiparalela catalisa a formação de c-di-GMP com liberação de duas moléculas de PP_i . Como XAC0610 não apresenta inibição alostérica pelo produto, a resposta cooperativa ao substrato permite que a regulação de sua atividade de DGC seja realizada pelas alterações fisiológicas dos níveis celulares de GTP.

Surpreendentemente, estudos fenotípicos com a linhagem nocaute *Xac* Δ 0610 mostraram que, não o domínio GGDEF, mas sim os domínios GAF e PAS de XAC0610 são importantes para a regulação da motilidade de *Xac* em meio SB semi-sólido (*sliding*

motility). Por outro lado, a atividade de DGC manifestada por meio do domínio GGDEF de XAC0610 se mostrou necessária para aumentar a sobrevivência de *Xac* ao estresse oxidativo provocado pelo tratamento com H_2O_2 (Figura 86). Estudos moleculares e fisiológicos mais aprofundados com XAC0610 poderão futuramente contribuir para um melhor entendimento da relação entre a via de sinalização por c-di-GMP e a resposta ao estresse oxidativo, a qual também já foi observada em outras bactérias.

Figura 86 – Atuação modular de XAC0610 na regulação de fenótipos bacterianos. Enquanto o N-terminal de XAC0610, contendo os domínios GAF e PAS(A-D), regula negativamente a motilidade de *Xac* em meio SB semi-sólido, a atividade de DGC do domínio GGDEF no C-terminal de XAC0610 contribui para o aumento dos níveis celulares de c-di-GMP e promove proteção ao estresse oxidativo. Os domínios GAF e PAS(A-D) no N-terminal de XAC0610 atuam na regulação da motilidade de *Xac* provavelmente por meio de interações com proteínas do metabolismo de carboidratos, pois a motilidade de *Xac* em meio SB semi-sólido (*sliding motility*) é dependente da produção de exopolissacarídeos (EPS).

Proteínas contendo domínios GGDEF se caracterizam por serem abundantes nos genomas bacterianos. Entretanto nem todos os domínios GGDEF encontrados em proteínas de uma mesma bactéria possuem atividade de diguanilato ciclase. Muitos genomas bacterianos mantêm proteínas com domínios GGDEF degenerados que não possuem alguns resíduos de aminoácidos importantes para a catálise enzimática. Apesar da perda de função enzimática, acredita-se que os domínios GGDEF

degenerados sejam ainda necessários para a sinalização por c-di-GMP atuando, por exemplo, como domínios sensores, que mantêm sua capacidade de ligação à GTP ou a c-di-GMP, e com isso regulam a atividade de um domínio vizinho ou de outras proteínas.

Assim, outro objetivo deste trabalho foi estudar o papel fisiológico da proteína XAC2446, que possui um domínio GAF no N-terminal e um domínio GGDEF degenerado no C-terminal da proteína. Estudos fenotípicos com a linhagem nocaute *Xac*Δ2446 indicam que XAC2446 pode estar envolvida no processo de formação e dispersão do biofilme de *Xac*. XAC2446 regula negativamente a formação de biofilme e positivamente a motilidade de *Xac* (*sliding motility*). A regulação dos fenótipos de *Xac* por XAC2446 deve ocorrer por meio de sua interação com o domínio GGDEF conservado de XAC2897 e/ou com XAC1185, que contem um domínio HD fosfohidrolase de (p)ppGpp. Estudos em diferentes bactérias indicam que altos níveis celulares de c-di-GMP e baixos níveis de (p)ppGpp são necessários durante a formação de biofilme. XAC2446 talvez possa atuar como um inibidor da atividade enzimática de XAC2897 e XAC1185 e influenciar, indiretamente e antagonicamente, tanto os níveis celulares de c-di-GMP quanto de (p)ppGpp.

A detecção de interações entre domínios GGDEF de diferentes proteínas, como a relatada neste trabalho entre as proteínas XAC2446 e XAC2897, abre um novo horizonte para os estudos que buscam compreender melhor a complexa regulação da sinalização por c-di-GMP em bactérias. Estas interações provavelmente são utilizadas para a modulação da atividade de DGC, porém funções mais complexas também podem ser imaginadas, como por exemplo, a formação de novos sítios catalíticos para auxiliar na síntese e/ou degradação de outras moléculas sinalizadoras (por exemplo

pppGpp). Ainda mais intrigante será entender sob o ponto de vista molecular a comunicação entre as vias de sinalização por c-di-GMP e (p)ppGpp, onde a interação entre XAC2446 e XAC1185 pode representar apenas a ponta do iceberg.

7. REFERÊNCIAS

- ABEL, S., CHIEN, P., WASSMANN, P., SCHIRMER, T., KAEVER, V., LAUB, M. T., BAKER, T. A. & JENAL, U. 2011. Regulatory cohesion of cell cycle and cell differentiation through interlinked phosphorylation and second messenger networks. *Mol Cell*, 43, 550-60.
- AGAR, J. N., YUVANIYAMA, P., JACK, R. F., CASH, V. L., SMITH, A. D., DEAN, D. R. & JOHNSON, M. K. 2000. Modular organization and identification of a mononuclear iron-binding site within the NifU protein. *J Biol Inorg Chem*, 5, 167-77.
- ALBA, B. M. & GROSS, C. A. 2004. Regulation of the Escherichia coli sigma-dependent envelope stress response. *Mol Microbiol*, 52, 613-9.
- ALEGRIA, M. C., DOCENA, C., KHATER, L., RAMOS, C. H., DA SILVA, A. C. & FARAH, C. S. 2004. 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*, 186, 6186-97.
- ALM, R. A., BODERO, A. J., FREE, P. D. & MATTICK, J. S. 1996. Identification of a novel gene, pilZ, essential for type 4 fimbrial biogenesis in Pseudomonas aeruginosa. *J Bacteriol*, 178, 46-53.
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W. & LIPMAN, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215, 403-10.
- AMARASINGHE, J. J., D'HONDT, R. E., WATERS, C. M. & MANTIS, N. J. 2013. Exposure of Salmonella enterica Serovar typhimurium to a protective monoclonal IgA triggers exopolysaccharide production via a diguanylate cyclase-dependent pathway. *Infect Immun*, 81, 653-64.
- AMIKAM, D. & GALPERIN, M. Y. 2006. PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics*, 22, 3-6.
- AN, G., JUSTESEN, J., WATSON, R. J. & FRIESEN, J. D. 1979. Cloning the spoT gene of Escherichia coli: identification of the spoT gene product. *J Bacteriol*, 137, 1100-10.
- AN, S. Q., ALLAN, J. H., MCCARTHY, Y., FEBRER, M., DOW, J. M. & RYAN, R. P. 2014. The PAS domain-containing histidine kinase RpfS is a second sensor for the diffusible signal factor of Xanthomonas campestris. *Mol Microbiol*, 92, 586-97.
- AN, S. Q., CHIN, K. H., FEBRER, M., MCCARTHY, Y., YANG, J. G., LIU, C. L., SWARBRECK, D., ROGERS, J., MAXWELL DOW, J., CHOU, S. H. & RYAN, R. P. 2013. A cyclic GMP-dependent signalling pathway regulates bacterial phytopathogenesis. *EMBO J*, 32, 2430-8.
- ANANTHARAMAN, V. & ARAVIND, L. 2000. Cache - a signaling domain common to animal Ca(2+)-channel subunits and a class of prokaryotic chemotaxis receptors. *Trends Biochem Sci*, 25, 535-7.
- ANANTHARAMAN, V., KOONIN, E. V. & ARAVIND, L. 2001. Regulatory potential, phyletic distribution and evolution of ancient, intracellular small-molecule-binding domains. *J Mol Biol*, 307, 1271-92.
- ANDERSON, S., CROSSON, S. & MOFFAT, K. 2004. Short hydrogen bonds in photoactive yellow protein. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 60, 1008-16.

- ANDRADE, M. O. 2011. *Estudo da sinalização celular envolvendo a via do quorum-sensing e os segundos mensageiros c-diGMP e (p)ppGpp no fitopatógeno Xanthomonas axonopodis pv citri*. Doutorado em Ciências (Bioquímica) Ph.D, Universidade de São Paulo.
- ANDRADE, M. O., ALEGRIA, M. C., GUZZO, C. R., DOCENA, C., ROSA, M. C., RAMOS, C. H. & FARAH, C. S. 2006. The HD-GYP domain of RpfG mediates a direct linkage between the Rpf quorum-sensing pathway and a subset of diguanylate cyclase proteins in the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*. *Mol Microbiol*, 62, 537-51.
- ANG, S., HORNG, Y. T., SHU, J. C., SOO, P. C., LIU, J. H., YI, W. C., LAI, H. C., LUH, K. T., HO, S. W. & SWIFT, S. 2001. The role of RsmA in the regulation of swarming motility in *Serratia marcescens*. *J Biomed Sci*, 8, 160-9.
- ARAKAWA, T. & WEN, J. 2001. Size-exclusion chromatography with on-line light scattering. *Curr Protoc Protein Sci*, Chapter 20, Unit 20 6.
- ARAVIND, L. & PONTING, C. P. 1997. The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. *Trends Biochem Sci*, 22, 458-9.
- ATKINSON, G. C., TENSON, T. & HAURYLIUK, V. 2011. The RelA/SpoT homolog (RSH) superfamily: distribution and functional evolution of ppGpp synthetases and hydrolases across the tree of life. *PLoS One*, 6, e23479.
- AVARBOCK, A., AVARBOCK, D., TEH, J. S., BUCKSTEIN, M., WANG, Z. M. & RUBIN, H. 2005. Functional regulation of the opposing (p)ppGpp synthetase/hydrolase activities of RelMtb from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry*, 44, 9913-23.
- AYERS, R. A. & MOFFAT, K. 2008. Changes in quaternary structure in the signaling mechanisms of PAS domains. *Biochemistry*, 47, 12078-86.
- BACA, M., BORGSTAHL, G. E., BOISSINOT, M., BURKE, P. M., WILLIAMS, D. R., SLATER, K. A. & GETZOFF, E. D. 1994. Complete chemical structure of photoactive yellow protein: novel thioester-linked 4-hydroxycinnamyl chromophore and photocycle chemistry. *Biochemistry*, 33, 14369-77.
- BALZER, G. J. & MCLEAN, R. J. 2002. The stringent response genes *relA* and *spoT* are important for *Escherichia coli* biofilms under slow-growth conditions. *Can J Microbiol*, 48, 675-80.
- BAPTISTA, J. C., MACHADO, M. A., HOMEM, R. A., TORRES, P. S., VOJNOV, A. A. & DO AMARAL, A. M. 2010. Mutation in the *xpsD* gene of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* affects cellulose degradation and virulence. *Genet Mol Biol*, 33, 146-53.
- BARAQUET, C. & HARWOOD, C. S. 2013. Cyclic diguanosine monophosphate represses bacterial flagella synthesis by interacting with the Walker A motif of the enhancer-binding protein FleQ. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 18478-83.
- BARAQUET, C., MURAKAMI, K., PARSEK, M. R. & HARWOOD, C. S. 2012. The FleQ protein from *Pseudomonas aeruginosa* functions as both a repressor and an activator to control gene expression from the *pel* operon promoter in response to c-di-GMP. *Nucleic Acids Res*, 40, 7207-18.
- BARENDT, T. R., HARTMANN, E., GRIESE, J. J., BEITLICH, T., KIRIENKO, N. V., RYJENKOV, D. A., REINSTEIN, J., SHOEMAN, R. L., GOMELSKY, M. & SCHLICHTING, I. 2009. Structure and mechanism of a bacterial light-regulated cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Nature*, 459, 1015-8.
- BARKER, M. M., GAAL, T. & GOURSE, R. L. 2001a. Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. II. Models for positive control based on properties of RNAP mutants and competition for RNAP. *J Mol Biol*, 305, 689-702.

- BARKER, M. M., GAAL, T., JOSAITIS, C. A. & GOURSE, R. L. 2001b. Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. I. Effects of ppGpp on transcription initiation in vivo and in vitro. *J Mol Biol*, 305, 673-88.
- BARTEL, P. L., ROECKLEIN, J. A., SENGUPTA, D. & FIELDS, S. 1996. A protein linkage map of Escherichia coli bacteriophage T7. *Nat Genet*, 12, 72-7.
- BATTESTI, A. & BOUVERET, E. 2006. Acyl carrier protein/SpoT interaction, the switch linking SpoT-dependent stress response to fatty acid metabolism. *Mol Microbiol*, 62, 1048-63.
- BAYKOV, A. A., EVTUSHENKO, O. A. & AVAEVA, S. M. 1988. A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. *Anal Biochem*, 171, 266-70.
- BEAVO, J. A., HARDMAN, J. G. & SUTHERLAND, E. W. 1971. Stimulation of adenosine 3',5'-monophosphate hydrolysis by guanosine 3',5'-monophosphate. *J Biol Chem*, 246, 3841-6.
- BEKKER, M., ALEXEEVA, S., LAAN, W., SAWERS, G., TEIXEIRA DE MATTOS, J. & HELLINGWERF, K. 2010. The ArcBA two-component system of Escherichia coli is regulated by the redox state of both the ubiquinone and the menaquinone pool. *J Bacteriol*, 192, 746-54.
- BENACH, J., SWAMINATHAN, S. S., TAMAYO, R., HANDELMAN, S. K., FOLTA-STOGNIEW, E., RAMOS, J. E., FOROUHAR, F., NEELY, H., SEETHARAMAN, J., CAMILLI, A. & HUNT, J. F. 2007. The structural basis of cyclic diguanylate signal transduction by PilZ domains. *EMBO J*, 26, 5153-66.
- BENDER, A. T. & BEAVO, J. A. 2006. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev*, 58, 488-520.
- BENSON, D. A., CAVANAUGH, M., CLARK, K., KARSCH-MIZRACHI, I., LIPMAN, D. J., OSTELL, J. & SAYERS, E. W. 2013. GenBank. *Nucleic Acids Res*, 41, D36-42.
- BERMAN, H. M., WESTBROOK, J., FENG, Z., GILLILAND, G., BHAT, T. N., WEISSIG, H., SHINDYALOV, I. N. & BOURNE, P. E. 2000. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*, 28, 235-42.
- BERNE, B. J. & PECORA, R. 1976. *Dynamic light scattering : with applications to chemistry, biology, and physics*, New York, Wiley.
- BEYHAN, S., ODELL, L. S. & YILDIZ, F. H. 2008. Identification and characterization of cyclic diguanylate signaling systems controlling rugosity in Vibrio cholerae. *J Bacteriol*, 190, 7392-405.
- BIBIKOV, S. I., BARNES, L. A., GITIN, Y. & PARKINSON, J. S. 2000. Domain organization and flavin adenine dinucleotide-binding determinants in the aerotaxis signal transducer Aer of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 5830-5.
- BIBIKOV, S. I., BIRAN, R., RUDD, K. E. & PARKINSON, J. S. 1997. A signal transducer for aerotaxis in Escherichia coli. *J Bacteriol*, 179, 4075-9.
- BOBROV, A. G., KIRILLINA, O. & PERRY, R. D. 2005. The phosphodiesterase activity of the HmsP EAL domain is required for negative regulation of biofilm formation in Yersinia pestis. *FEMS Microbiol Lett*, 247, 123-30.
- BOCH, J. & BONAS, U. 2010. Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annu Rev Phytopathol*, 48, 419-36.
- BOEHM, A., KAISER, M., LI, H., SPANGLER, C., KASPER, C. A., ACKERMANN, M., KAEVER, V., SOURJIK, V., ROTH, V. & JENAL, U. 2010. Second messenger-mediated adjustment of bacterial swimming velocity. *Cell*, 141, 107-16.

- BOEHM, A., STEINER, S., ZAEHRINGER, F., CASANOVA, A., HAMBURGER, F., RITZ, D., KECK, W., ACKERMANN, M., SCHIRMER, T. & JENAL, U. 2009. Second messenger signalling governs *Escherichia coli* biofilm induction upon ribosomal stress. *Mol Microbiol*, 72, 1500-16.
- BORGSTAHL, G. E., WILLIAMS, D. R. & GETZOFF, E. D. 1995. 1.4 A structure of photoactive yellow protein, a cytosolic photoreceptor: unusual fold, active site, and chromophore. *Biochemistry*, 34, 6278-87.
- BOYD, C. D. & O'TOOLE, G. A. 2012. Second messenger regulation of biofilm formation: breakthroughs in understanding c-di-GMP effector systems. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 28, 439-62.
- BRAEKEN, K., MORIS, M., DANIELS, R., VANDERLEYDEN, J. & MICHIELS, J. 2006. New horizons for (p)ppGpp in bacterial and plant physiology. *Trends Microbiol*, 14, 45-54.
- BRETON, A., PINSON, B., COULPIER, F., GIRAUD, M. F., DAUTANT, A. & DAIGNAN-FORNIER, B. 2008. Lethal accumulation of guanylic nucleotides in *Saccharomyces cerevisiae* HPT1-deregulated mutants. *Genetics*, 178, 815-24.
- BROOKS, B. E. & BUCHANAN, S. K. 2008. Signaling mechanisms for activation of extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Biochim Biophys Acta*, 1778, 1930-45.
- BROWN, W. 1993. *Dynamic light scattering : the method and some applications*, Oxford [England] New York, Clarendon Press ; Oxford University Press.
- BRUDER, S., LINDER, J. U., MARTINEZ, S. E., ZHENG, N., BEAVO, J. A. & SCHULTZ, J. E. 2005. The cyanobacterial tandem GAF domains from the *cyaB2* adenylyl cyclase signal via both cAMP-binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 3088-92.
- BRUGGEMANN, H., HAGMAN, A., JULES, M., SISMEIRO, O., DILLIES, M. A., GOUYETTE, C., KUNST, F., STEINERT, M., HEUNER, K., COPPEE, J. Y. & BUCHRIESER, C. 2006. Virulence strategies for infecting phagocytes deduced from the in vivo transcriptional program of *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol*, 8, 1228-40.
- BRUNINGS, A. M. & GABRIEL, D. W. 2003. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Mol Plant Pathol*, 4, 141-57.
- BUCKSTEIN, M. H., HE, J. & RUBIN, H. 2008. Characterization of nucleotide pools as a function of physiological state in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 190, 718-26.
- BUTTNER, D. & BONAS, U. 2002. Getting across--bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *EMBO J*, 21, 5313-22.
- BUTTNER, D. & BONAS, U. 2010. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiol Rev*, 34, 107-33.
- CANN, M. 2007a. A subset of GAF domains are evolutionarily conserved sodium sensors. *Mol Microbiol*, 64, 461-72.
- CANN, M. J. 2007b. Sodium regulation of GAF domain function. *Biochem Soc Trans*, 35, 1032-4.
- CHAN, C., PAUL, R., SAMORAY, D., AMIOT, N. C., GIESE, B., JENAL, U. & SCHIRMER, T. 2004. Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 17084-9.
- CHANG, A. L., TUCKERMAN, J. R., GONZALEZ, G., MAYER, R., WEINHOUSE, H., VOLMAN, G., AMIKAM, D., BENZIMAN, M. & GILLES-GONZALEZ, M. A. 2001.

- Phosphodiesterase A1, a regulator of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*, is a heme-based sensor. *Biochemistry*, 40, 3420-6.
- CHANG, C., TESAR, C., GU, M., BABNIGG, G., JOACHIMIAK, A., POKKULURI, P. R., SZURMANT, H. & SCHIFFER, M. 2010. Extracytoplasmic PAS-like domains are common in signal transduction proteins. *J Bacteriol*, 192, 1156-9.
- CHAO, N. X., WEI, K., CHEN, Q., MENG, Q. L., TANG, D. J., HE, Y. Q., LU, G. T., JIANG, B. L., LIANG, X. X., FENG, J. X., CHEN, B. & TANG, J. L. 2008. The rsmA-like gene rsmA(Xcc) of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* is involved in the control of various cellular processes, including pathogenesis. *Mol Plant Microbe Interact*, 21, 411-23.
- CHEN, Z. H. & SCHAAP, P. 2012. The prokaryote messenger c-di-GMP triggers stalk cell differentiation in *Dictyostelium*. *Nature*, 488, 680-3.
- CHEUNG, J., BINGMAN, C. A., REYNGOLD, M., HENDRICKSON, W. A. & WALDBURGER, C. D. 2008. Crystal structure of a functional dimer of the PhoQ sensor domain. *J Biol Chem*, 283, 13762-70.
- CHEUNG, J. & HENDRICKSON, W. A. 2010. Sensor domains of two-component regulatory systems. *Curr Opin Microbiol*, 13, 116-23.
- CHIN, K. H., LEE, Y. C., TU, Z. L., CHEN, C. H., TSENG, Y. H., YANG, J. M., RYAN, R. P., MCCARTHY, Y., DOW, J. M., WANG, A. H. & CHOU, S. H. 2010. The cAMP receptor-like protein CLP is a novel c-di-GMP receptor linking cell-cell signaling to virulence gene expression in *Xanthomonas campestris*. *J Mol Biol*, 396, 646-62.
- CHO, H. Y., CHO, H. J., KIM, Y. M., OH, J. I. & KANG, B. S. 2009. Structural insight into the heme-based redox sensing by DosS from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem*, 284, 13057-67.
- CHO, U. S., BADER, M. W., AMAYA, M. F., DALEY, M. E., KLEVIT, R. E., MILLER, S. I. & XU, W. 2006. Metal bridges between the PhoQ sensor domain and the membrane regulate transmembrane signaling. *J Mol Biol*, 356, 1193-206.
- CHOU, F. L., CHOU, H. C., LIN, Y. S., YANG, B. Y., LIN, N. T., WENG, S. F. & TSENG, Y. H. 1997. The *Xanthomonas campestris* gumD gene required for synthesis of xanthan gum is involved in normal pigmentation and virulence in causing black rot. *Biochem Biophys Res Commun*, 233, 265-9.
- CHRISTEN, B., CHRISTEN, M., PAUL, R., SCHMID, F., FOLCHER, M., JENOE, P., MEUWLY, M. & JENAL, U. 2006. Allosteric control of cyclic di-GMP signaling. *J Biol Chem*, 281, 32015-24.
- CHRISTEN, M., CHRISTEN, B., ALLAN, M. G., FOLCHER, M., JENO, P., GRZESIEK, S. & JENAL, U. 2007. DgrA is a member of a new family of cyclic diguanosine monophosphate receptors and controls flagellar motor function in *Caulobacter crescentus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 4112-7.
- CHRISTEN, M., CHRISTEN, B., FOLCHER, M., SCHAUERTE, A. & JENAL, U. 2005. Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. *J Biol Chem*, 280, 30829-37.
- CHRISTIE, J. M., REYMOND, P., POWELL, G. K., BERNASCONI, P., RAIBEKAS, A. A., LISCUM, E. & BRIGGS, W. R. 1998. Arabidopsis NPH1: a flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism. *Science*, 282, 1698-701.
- CIVEROLO, E. L. 1984. Bacterial canker disease of citrus. *Journal of the Rio Grande Valley Horticultural Society*, 37, 127-146.

- CLELAND, W. W. 1963. The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. I. Nomenclature and rate equations. *Biochim Biophys Acta*, 67, 104-37.
- COBURN, B., SEKIROV, I. & FINLAY, B. B. 2007. Type III secretion systems and disease. *Clin Microbiol Rev*, 20, 535-49.
- COLE, C., BARBER, J. D. & BARTON, G. J. 2008. The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res*, 36, W197-201.
- COTTER, P. A. & STIBITZ, S. 2007. c-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation. *Curr Opin Microbiol*, 10, 17-23.
- CROSSMAN, L. & DOW, J. M. 2004. Biofilm formation and dispersal in *Xanthomonas campestris*. *Microbes Infect*, 6, 623-9.
- CROSSON, S. & MOFFAT, K. 2001. Structure of a flavin-binding plant photoreceptor domain: insights into light-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 2995-3000.
- D'ARGENIO, D. A., CALFEE, M. W., RAINEY, P. B. & PESCI, E. C. 2002. Autolysis and autoaggregation in *Pseudomonas aeruginosa* colony morphology mutants. *J Bacteriol*, 184, 6481-9.
- D'AUTREAU, B., TUCKER, N. P., DIXON, R. & SPIRO, S. 2005. A non-haem iron centre in the transcription factor NorR senses nitric oxide. *Nature*, 437, 769-72.
- DA SILVA, A. C., FERRO, J. A., REINACH, F. C., FARAH, C. S., FURLAN, L. R., QUAGGIO, R. B., MONTEIRO-VITORELLO, C. B., VAN SLUYS, M. A., ALMEIDA, N. F., ALVES, L. M., DO AMARAL, A. M., BERTOLINI, M. C., CAMARGO, L. E., CAMAROTTE, G., CANNAVAN, F., CARDOZO, J., CHAMBERGO, F., CIAPINA, L. P., CICARELLI, R. M., COUTINHO, L. L., CURSINO-SANTOS, J. R., EL-DORRY, H., FARIA, J. B., FERREIRA, A. J., FERREIRA, R. C., FERRO, M. I., FORMIGHIERI, E. F., FRANCO, M. C., GREGGIO, C. C., GRUBER, A., KATSUYAMA, A. M., KISHI, L. T., LEITE, R. P., LEMOS, E. G., LEMOS, M. V., LOCALI, E. C., MACHADO, M. A., MADEIRA, A. M., MARTINEZ-ROSSI, N. M., MARTINS, E. C., MEIDANIS, J., MENCK, C. F., MIYAKI, C. Y., MOON, D. H., MOREIRA, L. M., NOVO, M. T., OKURA, V. K., OLIVEIRA, M. C., OLIVEIRA, V. R., PEREIRA, H. A., ROSSI, A., SENA, J. A., SILVA, C., DE SOUZA, R. F., SPINOLA, L. A., TAKITA, M. A., TAMURA, R. E., TEIXEIRA, E. C., TEZZA, R. I., TRINDADE DOS SANTOS, M., TRUFFI, D., TSAI, S. M., WHITE, F. F., SETUBAL, J. C. & KITAJIMA, J. P. 2002. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature*, 417, 459-63.
- DAS, A., RANGARAJ, N. & SONTI, R. V. 2009. Multiple adhesin-like functions of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* are involved in promoting leaf attachment, entry, and virulence on rice. *Mol Plant Microbe Interact*, 22, 73-85.
- DAS, A. K. 2003. Citrus canker - a review. *Journal of Applied Horticulture*, 5, 52-60.
- DE FEYTER, R., YANG, Y. & GABRIEL, D. W. 1993. Gene-for-genes interactions between cotton R genes and *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* avr genes. *Mol Plant Microbe Interact*, 6, 225-37.
- DE FRANCESCHI, N., WILD, K., SCHLACHT, A., DACKS, J. B., SINNING, I. & FILIPPINI, F. 2014. Longin and GAF domains: structural evolution and adaptation to the subcellular trafficking machinery. *Traffic*, 15, 104-21.

- DE, N., NAVARRO, M. V., RAGHAVAN, R. V. & SONDERMANN, H. 2009. Determinants for the activation and autoinhibition of the diguanylate cyclase response regulator WspR. *J Mol Biol*, 393, 619-33.
- DE, N., PIRRUCCELLO, M., KRASTEVA, P. V., BAE, N., RAGHAVAN, R. V. & SONDERMANN, H. 2008. Phosphorylation-independent regulation of the diguanylate cyclase WspR. *PLoS Biol*, 6, e67.
- DEEPTHI, A., LIEW, C. W., LIANG, Z. X., SWAMINATHAN, K. & LESCAR, J. 2014. Structure of a diguanylate cyclase from *Thermotoga maritima*: insights into activation, feedback inhibition and thermostability. *PLoS One*, 9, e110912.
- DELGADO-NIXON, V. M., GONZALEZ, G. & GILLES-GONZALEZ, M. A. 2000. Dos, a heme-binding PAS protein from *Escherichia coli*, is a direct oxygen sensor. *Biochemistry*, 39, 2685-91.
- DOCENA, C. 2006. *Identificação das interações envolvendo proteínas relacionadas aos Sistemas de Dois-componentes e aos Sistemas Secretórios do Tipo III e IV do fitopatógeno Xanthomonas axonopodis pv. citri*. . Doutorado em Ciências (Bioquímica) Ph.D, Universidade de São Paulo.
- DONG, Q. & EBRIGHT, R. H. 1992. DNA binding specificity and sequence of *Xanthomonas campestris* catabolite gene activator protein-like protein. *J Bacteriol*, 174, 5457-61.
- DOW, J. M., CROSSMAN, L., FINDLAY, K., HE, Y. Q., FENG, J. X. & TANG, J. L. 2003. Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signaling and is required for full virulence to plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 10995-1000.
- DOW, J. M., FOUHY, Y., LUCEY, J. F. & RYAN, R. P. 2006. The HD-GYP domain, cyclic di-GMP signaling, and bacterial virulence to plants. *Mol Plant Microbe Interact*, 19, 1378-84.
- DOW, J. M., OSBOURN, A. E., WILSON, T. J. & DANIELS, M. J. 1995. A locus determining pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is involved in lipopolysaccharide biosynthesis. *Mol Plant Microbe Interact*, 8, 768-77.
- DOW, J. M., SCOFIELD, G., TRAFFORD, K., TURNER, P. C. & DANIELS, M. J. 1987. A gene cluster in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* required for pathogenicity controls the excretion of polygalacturonate lyase and other enzymes. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 31, 261-271.
- DUAN, Y. P., CASTAÑEDA, A., ZHAO, G., ERDOS, G. & GABRIEL, D. W. 1999. Expression of a Single, Host-Specific, Bacterial Pathogenicity Gene in Plant Cells Elicits Division, Enlargement, and Cell Death. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12, 556-560.
- DUBEY, A. K., BAKER, C. S., SUZUKI, K., JONES, A. D., PANDIT, P., ROMEO, T. & BABITZKE, P. 2003. CsrA regulates translation of the *Escherichia coli* carbon starvation gene, *cstA*, by blocking ribosome access to the *cstA* transcript. *J Bacteriol*, 185, 4450-60.
- DUERIG, A., ABEL, S., FOLCHER, M., NICOLLIER, M., SCHWEDE, T., AMIOT, N., GIESE, B. & JENAL, U. 2009. Second messenger-mediated spatiotemporal control of protein degradation regulates bacterial cell cycle progression. *Genes Dev*, 23, 93-104.
- DUNGER, G., RELLING, V. M., TONDO, M. L., BARRERAS, M., IELPI, L., ORELLANO, E. G. & OTTADO, J. 2007. Xanthan is not essential for pathogenicity in citrus canker but contributes to *Xanthomonas* epiphytic survival. *Arch Microbiol*, 188, 127-35.
- DUTTA, S. & BIGGS, R. H. 1991. Regulation of ethylene biosynthesis in citrus leaves infected with *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. *Physiologia Plantarum*, 82, 225-230.
- DYE, D. W., BRADBURY, J. F., GOTO, M., HAYWARD, A. C., LELLIOTT, R. A. & SCHROTH, M. N. 1980. International standards for naming pathovars of

- phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. *Review of Plant Pathology*, 59, 153-168.
- EDELSTEIN, S. J., STEFAN, M. I. & LE NOVERE, N. 2010. Ligand depletion in vivo modulates the dynamic range and cooperativity of signal transduction. *PLoS One*, 5, e8449.
- ENGLISH, B. P., HAURYLIUK, V., SANAMRAD, A., TANKOV, S., DEKKER, N. H. & ELF, J. 2011. Single-molecule investigations of the stringent response machinery in living bacterial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, E365-73.
- FANG, X. & GOMELSKY, M. 2010. A post-translational, c-di-GMP-dependent mechanism regulating flagellar motility. *Mol Microbiol*, 76, 1295-305.
- FAZLI, M., MCCARTHY, Y., GIVSKOV, M., RYAN, R. P. & TOLKER-NIELSEN, T. 2013. The exopolysaccharide gene cluster Bcam1330-Bcam1341 is involved in Burkholderia cenocepacia biofilm formation, and its expression is regulated by c-di-GMP and Bcam1349. *Microbiologyopen*, 2, 105-22.
- FAZLI, M., O'CONNELL, A., NILSSON, M., NIEHAUS, K., DOW, J. M., GIVSKOV, M., RYAN, R. P. & TOLKER-NIELSEN, T. 2011. The CRP/FNR family protein Bcam1349 is a c-di-GMP effector that regulates biofilm formation in the respiratory pathogen Burkholderia cenocepacia. *Mol Microbiol*, 82, 327-41.
- FERREIRA, R. B., ANTUNES, L. C., GREENBERG, E. P. & MCCARTER, L. L. 2008. Vibrio parahaemolyticus ScrC modulates cyclic dimeric GMP regulation of gene expression relevant to growth on surfaces. *J Bacteriol*, 190, 851-60.
- FERREIRA, R. B., CHODUR, D. M., ANTUNES, L. C., TRIMBLE, M. J. & MCCARTER, L. L. 2012. Output targets and transcriptional regulation by a cyclic dimeric GMP-responsive circuit in the Vibrio parahaemolyticus Scr network. *J Bacteriol*, 194, 914-24.
- FERSHT, A. 1999. *Structure and mechanism in protein science : a guide to enzyme catalysis and protein folding*, New York, W.H. Freeman.
- FLARDH, K., AXBERG, T., ALBERTSON, N. H. & KJELLEBERG, S. 1994. Stringent control during carbon starvation of marine Vibrio sp. strain S14: molecular cloning, nucleotide sequence, and deletion of the relA gene. *J Bacteriol*, 176, 5949-57.
- FOUHY, Y., LUCEY, J. F., RYAN, R. P. & DOW, J. M. 2006. Cell-cell signaling, cyclic di-GMP turnover and regulation of virulence in Xanthomonas campestris. *Res Microbiol*, 157, 899-904.
- FRANCISCHINI, M. C. P. 2010. *Caracterização dos fatores sigma da RNA polimerase do fitopatôgeno Xanthomonas axonopodis pv. citri*. Tese (Doutorado em Bioquímica), Universidade de São Paulo.
- FREEDMAN, J. C., ROGERS, E. A., KOSTICK, J. L., ZHANG, H., IYER, R., SCHWARTZ, I. & MARCONI, R. T. 2010. Identification and molecular characterization of a cyclic-di-GMP effector protein, PlzA (BB0733): additional evidence for the existence of a functional cyclic-di-GMP regulatory network in the Lyme disease spirochete, Borrelia burgdorferi. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 58, 285-94.
- FU, W., JACK, R. F., MORGAN, T. V., DEAN, D. R. & JOHNSON, M. K. 1994. nifU gene product from Azotobacter vinelandii is a homodimer that contains two identical [2Fe-2S] clusters. *Biochemistry*, 33, 13455-63.
- GABRIEL, D. W., KINGSLEY, M. T., HUNTER, J. E. & GOTTWALD, T. 1989. Reinstatement of Xanthomonas citri (ex Hasse) and X. phaseoli (ex Smith) to Species and Reclassification of All X. campestris pv. citri Strains†. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39, 14-22.

- GALPERIN, M. Y. 2001. Conserved 'hypothetical' proteins: new hints and new puzzles. *Comp Funct Genomics*, 2, 14-8.
- GALPERIN, M. Y. 2004. Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environ Microbiol*, 6, 552-67.
- GALPERIN, M. Y., NATALE, D. A., ARAVIND, L. & KOONIN, E. V. 1999. A specialized version of the HD hydrolase domain implicated in signal transduction. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 1, 303-5.
- GALPERIN, M. Y., NIKOLSKAYA, A. N. & KOONIN, E. V. 2001. Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiol Lett*, 203, 11-21.
- GAO, X., MUKHERJEE, S., MATTHEWS, P. M., HAMMAD, L. A., KEARNS, D. B. & DANN, C. E., 3RD 2013. Functional characterization of core components of the *Bacillus subtilis* cyclic-di-GMP signaling pathway. *J Bacteriol*, 195, 4782-92.
- GARCIA VESCOVI, E., SONCINI, F. C. & GROISMAN, E. A. 1996. Mg²⁺ as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence. *Cell*, 84, 165-74.
- GARDNER, A. M., GESSNER, C. R. & GARDNER, P. R. 2003. Regulation of the nitric oxide reduction operon (norRVW) in *Escherichia coli*. Role of NorR and sigma⁵⁴ in the nitric oxide stress response. *J Biol Chem*, 278, 10081-6.
- GELADOPOULOS, T. P., SOTIROUDIS, T. G. & EVANGELOPOULOS, A. E. 1991. A malachite green colorimetric assay for protein phosphatase activity. *Anal Biochem*, 192, 112-6.
- GENTNER, M., ALLAN, M. G., ZAEHRINGER, F., SCHIRMER, T. & GRZESIEK, S. 2012. Oligomer formation of the bacterial second messenger c-di-GMP: reaction rates and equilibrium constants indicate a monomeric state at physiological concentrations. *J Am Chem Soc*, 134, 1019-29.
- GENTRY, D. R., HERNANDEZ, V. J., NGUYEN, L. H., JENSEN, D. B. & CASHEL, M. 1993. Synthesis of the stationary-phase sigma factor sigma^s is positively regulated by ppGpp. *J Bacteriol*, 175, 7982-9.
- GERLACH, R. G. & HENSEL, M. 2007. Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. *Int J Med Microbiol*, 297, 401-15.
- GHOSH, P. 2004. Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol Mol Biol Rev*, 68, 771-95.
- GIARDINA, G., PAIARDINI, A., FERNICOLA, S., FRANCESCHINI, S., RINALDO, S., STELITANO, V. & CUTRUZZOLA, F. 2013. Investigating the allosteric regulation of YfiN from *Pseudomonas aeruginosa*: clues from the structure of the catalytic domain. *PLoS One*, 8, e81324.
- GIETZ, R. D. 2006. Yeast two-hybrid system screening. *Methods Mol Biol*, 313, 345-71.
- GIETZ, R. D. & WOODS, R. A. 2006. Yeast transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG method. *Methods Mol Biol*, 313, 107-20.
- GILLES-GONZALEZ, M. A. & GONZALEZ, G. 2004. Signal transduction by heme-containing PAS-domain proteins. *J Appl Physiol (1985)*, 96, 774-83.
- GILLES-GONZALEZ, M. A. & GONZALEZ, G. 2005. Heme-based sensors: defining characteristics, recent developments, and regulatory hypotheses. *J Inorg Biochem*, 99, 1-22.
- GOMELSKY, M. 2009. Cyclic-di-GMP-binding CRP-like protein: a spectacular new role for a veteran signal transduction actor. *J Bacteriol*, 191, 6785-7.

- GONG, W., HAO, B., MANSY, S. S., GONZALEZ, G., GILLES-GONZALEZ, M. A. & CHAN, M. K. 1998. Structure of a biological oxygen sensor: a new mechanism for heme-driven signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 15177-82.
- GOTTIG, N., GARAVAGLIA, B. S., GAROFALO, C. G., ORELLANO, E. G. & OTTADO, J. 2009. A filamentous hemagglutinin-like protein of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri, the phytopathogen responsible for citrus canker, is involved in bacterial virulence. *PLoS One*, 4, e4358.
- GOTTIG, N., GARAVAGLIA, B. S., GAROFALO, C. G., ZIMARO, T., SGRO, G., FICARRA, F. A., DUNGER, G., DAURELIO, L. D., THOMAS, L., GEHRING, C., ORELLANO, E. G. & OTTADO, J. 2010. Mechanisms of infection used by *Xanthomonas axonopodis* pv. citri in citrus canker disease. In: Méndez-Vilas, A. (Org.). *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 1, 196-204.
- GOTTWALD, T. R., GRAHAM, J. H. & SCHUBERT, T. S. 2002. Citrus canker: The pathogen and its impact. *Plant Health Progress* [Online].
- GRAHAM, J. H., GOTTWALD, T. R., CUBERO, J. & ACHOR, D. S. 2004. *Xanthomonas axonopodis* pv. citri: factors affecting successful eradication of citrus canker. *Mol Plant Pathol*, 5, 1-15.
- GRAHAM, J. H., GOTTWALD, T. R., RILEY, T. D. & ACHOR, D. 1992. Penetration through leaf stomata and strains of *Xanthomonas campestris* in citrus cultivars varying in susceptibility to bacterial diseases. *Phytopathology* 82, 1319-1325.
- GREEN, J., CRACK, J. C., THOMSON, A. J. & LEBRUN, N. E. 2009. Bacterial sensors of oxygen. *Curr Opin Microbiol*, 12, 145-51.
- GREEN, J. & PAGET, M. S. 2004. Bacterial redox sensors. *Nat Rev Microbiol*, 2, 954-66.
- GROPP, M., STRAUSS, Y., GROSS, M. & GLASER, G. 2001. Regulation of *Escherichia coli* RelA requires oligomerization of the C-terminal domain. *J Bacteriol*, 183, 570-9.
- GRUEZ, A., LIBIAD, M., BOSCHI-MULLER, S. & BRANLANT, G. 2010. Structural and biochemical characterization of free methionine-R-sulfoxide reductase from *Neisseria meningitidis*. *J Biol Chem*, 285, 25033-43.
- GUO, Y., SAGARAM, U. S., KIM, J. S. & WANG, N. 2010. Requirement of the galU gene for polysaccharide production by and pathogenicity and growth In Planta of *Xanthomonas citri* subsp. citri. *Appl Environ Microbiol*, 76, 2234-42.
- GURLEBECK, D., THIEME, F. & BONAS, U. 2006. Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. *J Plant Physiol*, 163, 233-55.
- GUZMAN, L. M., BELIN, D., CARSON, M. J. & BECKWITH, J. 1995. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol*, 177, 4121-30.
- GUZZO, C. R., SALINAS, R. K., ANDRADE, M. O. & FARAH, C. S. 2009. PilZ protein structure and interactions with PILB and the FIMX EAL domain: implications for control of type IV pilus biogenesis. *J Mol Biol*, 393, 848-66.
- HABAZETTL, J., ALLAN, M. G., JENAL, U. & GRZESIEK, S. 2011. Solution structure of the PilZ domain protein PA4608 complex with cyclic di-GMP identifies charge clustering as molecular readout. *J Biol Chem*, 286, 14304-14.
- HANAHAN, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 166, 557-80.

- HARDING, S. E. 1994. Classical light scattering for the determination of absolute molecular weights and gross conformation of biological macromolecules. *Methods Mol Biol*, 22, 85-95.
- HASELTINE, W. A. & BLOCK, R. 1973. Synthesis of guanosine tetra- and pentaphosphate requires the presence of a codon-specific, uncharged transfer ribonucleic acid in the acceptor site of ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 70, 1564-8.
- HASSE, C. H. 1915. *Pseudomonas citri, the cause of citrus canker, a preliminary report*, Wash.
- HE, H., COOPER, J. N., MISHRA, A. & RASKIN, D. M. 2012. Stringent response regulation of biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol*, 194, 2962-72.
- HE, Y. W., BOON, C., ZHOU, L. & ZHANG, L. H. 2009. Co-regulation of *Xanthomonas campestris* virulence by quorum sensing and a novel two-component regulatory system RavS/RavR. *Mol Microbiol*, 71, 1464-76.
- HE, Y. W., NG, A. Y., XU, M., LIN, K., WANG, L. H., DONG, Y. H. & ZHANG, L. H. 2007. *Xanthomonas campestris* cell-cell communication involves a putative nucleotide receptor protein Clp and a hierarchical signalling network. *Mol Microbiol*, 64, 281-92.
- HE, Y. W. & ZHANG, L. H. 2008. Quorum sensing and virulence regulation in *Xanthomonas campestris*. *FEMS Microbiol Rev*, 32, 842-57.
- HECHT, G. B. & NEWTON, A. 1995. Identification of a novel response regulator required for the swarmer-to-stalked-cell transition in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol*, 177, 6223-9.
- HEFTI, M. H., FRANCOIS, K. J., DE VRIES, S. C., DIXON, R. & VERVOORT, J. 2004. The PAS fold. A redefinition of the PAS domain based upon structural prediction. *Eur J Biochem*, 271, 1198-208.
- HEIKAUS, C. C., PANDIT, J. & KLEVIT, R. E. 2009. Cyclic nucleotide binding GAF domains from phosphodiesterases: structural and mechanistic insights. *Structure*, 17, 1551-7.
- HEINEMEYER, E. A. & RICHTER, D. 1977. In vitro degradation of guanosine tetraphosphate (ppGpp) by an enzyme associated with the ribosomal fraction from *Escherichia coli*. *FEBS Lett*, 84, 357-61.
- HEINTZ, U., MEINHART, A. & WINKLER, A. 2014. Multi-PAS domain-mediated protein oligomerization of PpsR from *Rhodobacter sphaeroides*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 70, 863-76.
- HELMANN, J. D. 2002. The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Adv Microb Physiol*, 46, 47-110.
- HENGGE, R. 2009. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 7, 263-73.
- HENGGE, R. 2013. Novel tricks played by the second messenger c-di-GMP in bacterial biofilm formation. *EMBO J*, 32, 322-3.
- HENRY, J. T. & CROSSON, S. 2011. Ligand-binding PAS domains in a genomic, cellular, and structural context. *Annu Rev Microbiol*, 65, 261-86.
- HERNANDEZ, V. J. & BREMER, H. 1991. *Escherichia coli* ppGpp synthetase II activity requires spoT. *J Biol Chem*, 266, 5991-9.
- HEURLIER, K., WILLIAMS, F., HEEB, S., DORMOND, C., PESSI, G., SINGER, D., CAMARA, M., WILLIAMS, P. & HAAS, D. 2004. Positive control of swarming, rhamnolipid synthesis, and lipase production by the posttranscriptional RsmA/RsmZ system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol*, 186, 2936-45.
- HICKMAN, J. W. & HARWOOD, C. S. 2008. Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Mol Microbiol*, 69, 376-89.

- HICKMAN, J. W., TIFREA, D. F. & HARWOOD, C. S. 2005. A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 14422-7.
- HILL, S., AUSTIN, S., EYDMANN, T., JONES, T. & DIXON, R. 1996. Azotobacter vinelandii NIFL is a flavoprotein that modulates transcriptional activation of nitrogen-fixation genes via a redox-sensitive switch. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 2143-8.
- HO, Y. S., BURDEN, L. M. & HURLEY, J. H. 2000. Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor. *EMBO J*, 19, 5288-99.
- HOCHSTADT-OZER, J. & CASHEL, M. 1972. The regulation of purine utilization in bacteria. V. Inhibition of purine phosphoribosyltransferase activities and purine uptake in isolated membrane vesicles by guanosine tetraphosphate. *J Biol Chem*, 247, 7067-72.
- HOGG, T., MECHOLD, U., MALKE, H., CASHEL, M. & HILGENFELD, R. 2004. Conformational antagonism between opposing active sites in a bifunctional RelA/SpoT homolog modulates (p)ppGpp metabolism during the stringent response [corrected]. *Cell*, 117, 57-68.
- HSIAO, Y. M., LIU, Y. F., FANG, M. C. & SONG, W. L. 2011. XCC2731, a GGDEF domain protein in Xanthomonas campestris, is involved in bacterial attachment and is positively regulated by Clp. *Microbiol Res*, 166, 548-65.
- HSIAO, Y. M., LIU, Y. F., FANG, M. C. & TSENG, Y. H. 2010. Transcriptional regulation and molecular characterization of the manA gene encoding the biofilm dispersing enzyme mannan endo-1,4-beta-mannosidase in Xanthomonas campestris. *J Agric Food Chem*, 58, 1653-63.
- HUANG, B., WHITCHURCH, C. B. & MATTICK, J. S. 2003. FimX, a multidomain protein connecting environmental signals to twitching motility in Pseudomonas aeruginosa. *J Bacteriol*, 185, 7068-76.
- HUANG, Z. J., EDERY, I. & ROSBASH, M. 1993. PAS is a dimerization domain common to Drosophila period and several transcription factors. *Nature*, 364, 259-62.
- HUDSON, J. R., JR., DAWSON, E. P., RUSHING, K. L., JACKSON, C. H., LOCKSHON, D., CONOVER, D., LANCIAULT, C., HARRIS, J. R., SIMMONS, S. J., ROTHSTEIN, R. & FIELDS, S. 1997. The complete set of predicted genes from Saccharomyces cerevisiae in a readily usable form. *Genome Res*, 7, 1169-73.
- HUNTER, S., JONES, P., MITCHELL, A., APWEILER, R., ATTWOOD, T. K., BATEMAN, A., BERNARD, T., BINNS, D., BORK, P., BURGE, S., DE CASTRO, E., COGGILL, P., CORBETT, M., DAS, U., DAUGHERTY, L., DUQUENNE, L., FINN, R. D., FRASER, M., GOUGH, J., HAFT, D., HULO, N., KAHN, D., KELLY, E., LETUNIC, I., LONSDALE, D., LOPEZ, R., MADERA, M., MASLEN, J., MCANULLA, C., MCDOWALL, J., MCMENAMIN, C., MI, H., MUTOWO-MUELLENET, P., MULDER, N., NATALE, D., ORENGO, C., PESSEAT, S., PUNTA, M., QUINN, A. F., RIVOIRE, C., SANGRADOR-VEGAS, A., SELENGUT, J. D., SIGRIST, C. J., SCHEREMETJEW, M., TATE, J., THIMMAJANARTHANAN, M., THOMAS, P. D., WU, C. H., YEATS, C. & YONG, S. Y. 2012. InterPro in 2011: new developments in the family and domain prediction database. *Nucleic Acids Res*, 40, D306-12.
- HURLEY, J. H. 2003. GAF domains: cyclic nucleotides come full circle. *Sci STKE*, 2003, PE1.
- ITOH, Y., RICE, J. D., GOLLER, C., PANNURI, A., TAYLOR, J., MEISNER, J., BEVERIDGE, T. J., PRESTON, J. F., 3RD & ROMEO, T. 2008. Roles of pgaABCD genes in synthesis, modification, and export of the Escherichia coli biofilm adhesin poly-beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine. *J Bacteriol*, 190, 3670-80.

- JACKSON, D. W., SUZUKI, K., OAKFORD, L., SIMECKA, J. W., HART, M. E. & ROMEO, T. 2002. Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 184, 290-301.
- JAGER, R., SCHWEDE, F., GENIESER, H. G., KOESLING, D. & RUSSWURM, M. 2010. Activation of PDE2 and PDE5 by specific GAF ligands: delayed activation of PDE5. *Br J Pharmacol*, 161, 1645-60.
- JAMES, P., HALLADAY, J. & CRAIG, E. A. 1996. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, 144, 1425-36.
- JENAL, U. 2004. Cyclic di-guanosine-monophosphate comes of age: a novel secondary messenger involved in modulating cell surface structures in bacteria? *Curr Opin Microbiol*, 7, 185-91.
- JENAL, U. & FUCHS, T. 1998. An essential protease involved in bacterial cell-cycle control. *EMBO J*, 17, 5658-69.
- JENAL, U. & MALONE, J. 2006. Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annu Rev Genet*, 40, 385-407.
- JHA, G., RAJESHWARI, R. & SONTI, R. V. 2005. Bacterial type two secretion system secreted proteins: double-edged swords for plant pathogens. *Mol Plant Microbe Interact*, 18, 891-8.
- JHA, G., RAJESHWARI, R. & SONTI, R. V. 2007. Functional interplay between two *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* secretion systems in modulating virulence on rice. *Mol Plant Microbe Interact*, 20, 31-40.
- JIANG, M., SULLIVAN, S. M., WOUT, P. K. & MADDOCK, J. R. 2007. G-protein control of the ribosome-associated stress response protein SpoT. *J Bacteriol*, 189, 6140-7.
- JITTAWUTTIPOKA, T., BURANAJITPAKORN, S., VATTANAVIBOON, P. & MONGKOLSUK, S. 2009. The catalase-peroxidase KatG is required for virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in a host plant by providing protection against low levels of H₂O₂. *J Bacteriol*, 191, 7372-7.
- JONAS, K., EDWARDS, A. N., AHMAD, I., ROMEO, T., ROMLING, U. & MELEFORS, O. 2010. Complex regulatory network encompassing the Csr, c-di-GMP and motility systems of *Salmonella Typhimurium*. *Environ Microbiol*, 12, 524-40.
- JONAS, K., EDWARDS, A. N., SIMM, R., ROMEO, T., ROMLING, U. & MELEFORS, O. 2008. The RNA binding protein CsrA controls cyclic di-GMP metabolism by directly regulating the expression of GGDEF proteins. *Mol Microbiol*, 70, 236-57.
- KADER, A., SIMM, R., GERSTEL, U., MORR, M. & ROMLING, U. 2006. Hierarchical involvement of various GGDEF domain proteins in rdar morphotype development of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Mol Microbiol*, 60, 602-16.
- KALIA, D., MEREY, G., NAKAYAMA, S., ZHENG, Y., ZHOU, J., LUO, Y., GUO, M., ROEMBKE, B. T. & SINTIM, H. O. 2013. Nucleotide, c-di-GMP, c-di-AMP, cGMP, cAMP, (p)ppGpp signaling in bacteria and implications in pathogenesis. *Chem Soc Rev*, 42, 305-41.
- KANEHISA, M. & GOTO, S. 2000. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*, 28, 27-30.
- KANJEE, U., OGATA, K. & HOURY, W. A. 2012. Direct binding targets of the stringent response alarmone (p)ppGpp. *Mol Microbiol*, 85, 1029-43.
- KAY, S. & BONAS, U. 2009. How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. *Curr Opin Microbiol*, 12, 37-43.

- KELLEY, L. A. & STERNBERG, M. J. 2009. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc*, 4, 363-71.
- KEY, J., HEFTI, M., PURCELL, E. B. & MOFFAT, K. 2007. Structure of the redox sensor domain of *Azotobacter vinelandii* NifL at atomic resolution: signaling, dimerization, and mechanism. *Biochemistry*, 46, 3614-23.
- KING-SCOTT, J., KONAREV, P. V., PANJIKAR, S., JORDANOVA, R., SVERGUN, D. I. & TUCKER, P. A. 2011. Structural characterization of the multidomain regulatory protein Rv1364c from *Mycobacterium tuberculosis*. *Structure*, 19, 56-69.
- KINGSLEY, M. T., GABRIEL, D. W., MARLOW, G. C. & ROBERTS, P. D. 1993. The opsX locus of *Xanthomonas campestris* affects host range and biosynthesis of lipopolysaccharide and extracellular polysaccharide. *J Bacteriol*, 175, 5839-50.
- KO, J., RYU, K. S., KIM, H., SHIN, J. S., LEE, J. O., CHEONG, C. & CHOI, B. S. 2010. Structure of PP4397 reveals the molecular basis for different c-di-GMP binding modes by Pilz domain proteins. *J Mol Biol*, 398, 97-110.
- KRASNY, L. & GOURSE, R. L. 2004. An alternative strategy for bacterial ribosome synthesis: *Bacillus subtilis* rRNA transcription regulation. *EMBO J*, 23, 4473-83.
- KRASTEVA, P. V., FONG, J. C., SHIKUMA, N. J., BEYHAN, S., NAVARRO, M. V., YILDIZ, F. H. & SONDERMANN, H. 2010. *Vibrio cholerae* VpsT regulates matrix production and motility by directly sensing cyclic di-GMP. *Science*, 327, 866-8.
- KRASTEVA, P. V., GIGLIO, K. M. & SONDERMANN, H. 2012. Sensing the messenger: the diverse ways that bacteria signal through c-di-GMP. *Protein Sci*, 21, 929-48.
- KRIEL, A., BITTNER, A. N., KIM, S. H., LIU, K., TEHRANCHI, A. K., ZOU, W. Y., RENDON, S., CHEN, R., TU, B. P. & WANG, J. D. 2012. Direct regulation of GTP homeostasis by (p)ppGpp: a critical component of viability and stress resistance. *Mol Cell*, 48, 231-41.
- KROGH, A., LARSSON, B., VON HEIJNE, G. & SONNHAMMER, E. L. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol*, 305, 567-80.
- KUCHMA, S. L., BROTHERS, K. M., MERRITT, J. H., LIBERATI, N. T., AUSUBEL, F. M. & O'TOOLE, G. A. 2007. BifA, a cyclic-Di-GMP phosphodiesterase, inversely regulates biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J Bacteriol*, 189, 8165-78.
- KULKARNI, P. R., JIA, T., KUEHNE, S. A., KERKERING, T. M., MORRIS, E. R., SEARLE, M. S., HEEB, S., RAO, J. & KULKARNI, R. V. 2014. A sequence-based approach for prediction of CsrA/RsmA targets in bacteria with experimental validation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Res*, 42, 6811-25.
- KULSHINA, N., BAIRD, N. J. & FERRE-D'AMARE, A. R. 2009. Recognition of the bacterial second messenger cyclic diguanylate by its cognate riboswitch. *Nat Struct Mol Biol*, 16, 1212-7.
- KUROKAWA, H., LEE, D. S., WATANABE, M., SAGAMI, I., MIKAMI, B., RAMAN, C. S. & SHIMIZU, T. 2004. A redox-controlled molecular switch revealed by the crystal structure of a bacterial heme PAS sensor. *J Biol Chem*, 279, 20186-93.
- KYRPIDES, N. C., OUZOUNIS, C. A., ILIOPOULOS, I., VONSTEIN, V. & OVERBEEK, R. 2000. Analysis of the *Thermotoga maritima* genome combining a variety of sequence similarity and genome context tools. *Nucleic Acids Res*, 28, 4573-6.

- LACEY, M. M., PARTRIDGE, J. D. & GREEN, J. 2010. Escherichia coli K-12 YfgF is an anaerobic cyclic di-GMP phosphodiesterase with roles in cell surface remodelling and the oxidative stress response. *Microbiology*, 156, 2873-86.
- LAHIRI, T., LUAN, B., RALEIGH, D. P. & BOON, E. M. 2014. A structural basis for the regulation of an H-NOX-associated cyclic-di-GMP synthase/phosphodiesterase enzyme by nitric oxide-bound H-NOX. *Biochemistry*, 53, 2126-35.
- LAMPARTER, T. 2004. Evolution of cyanobacterial and plant phytochromes. *FEBS Lett*, 573, 1-5.
- LAPOUGE, K., PEROZZO, R., IWASZKIEWICZ, J., BERTELLI, C., ZOETE, V., MICHIELIN, O., SCAPOZZA, L. & HAAS, D. 2013. RNA pentaloop structures as effective targets of regulators belonging to the RsmA/CsrA protein family. *RNA Biol*, 10, 1031-41.
- LARKIN, M. A., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N. P., CHENNA, R., MCGETTIGAN, P. A., MCWILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, I. M., WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J. & HIGGINS, D. G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23, 2947-8.
- LAZZARINI, R. A., CASHEL, M. & GALLANT, J. 1971. On the regulation of guanosine tetraphosphate levels in stringent and relaxed strains of Escherichia coli. *J Biol Chem*, 246, 4381-5.
- LEDUC, J. L. & ROBERTS, G. P. 2009. Cyclic di-GMP allosterically inhibits the CRP-like protein (Clp) of Xanthomonas axonopodis pv. citri. *J Bacteriol*, 191, 7121-2.
- LEE, B. M., PARK, Y. J., PARK, D. S., KANG, H. W., KIM, J. G., SONG, E. S., PARK, I. C., YOON, U. H., HAHN, J. H., KOO, B. S., LEE, G. B., KIM, H., PARK, H. S., YOON, K. O., KIM, J. H., JUNG, C. H., KOH, N. H., SEO, J. S. & GO, S. J. 2005. The genome sequence of Xanthomonas oryzae pathovar oryzae KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. *Nucleic Acids Res*, 33, 577-86.
- LEE, E. R., BAKER, J. L., WEINBERG, Z., SUDARSAN, N. & BREAKER, R. R. 2010. An allosteric self-splicing ribozyme triggered by a bacterial second messenger. *Science*, 329, 845-8.
- LEE, J., TOMCHICK, D. R., BRAUTIGAM, C. A., MACHIUS, M., KORT, R., HELLINGWERF, K. J. & GARDNER, K. H. 2008a. Changes at the KinA PAS-A dimerization interface influence histidine kinase function. *Biochemistry*, 47, 4051-64.
- LEE, S. W., JEONG, K. S., HAN, S. W., LEE, S. E., PHEE, B. K., HAHN, T. R. & RONALD, P. 2008b. The Xanthomonas oryzae pv. oryzae PhoPQ two-component system is required for AvrXA21 activity, hrpG expression, and virulence. *J Bacteriol*, 190, 2183-97.
- LEE, V. T., MATEWISH, J. M., KESSLER, J. L., HYODO, M., HAYAKAWA, Y. & LORY, S. 2007. A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Mol Microbiol*, 65, 1474-84.
- LEGAULT, L., JEANTET, C. & GROS, F. 1972. Inhibition of in vitro protein synthesis by ppGpp. *FEBS Lett*, 27, 71-75.
- LEMOIS, J. A., BROWN, T. A., JR. & BURNE, R. A. 2004. Effects of RelA on key virulence properties of planktonic and biofilm populations of Streptococcus mutans. *Infect Immun*, 72, 1431-40.
- LENZ, D. H., MILLER, M. B., ZHU, J., KULKARNI, R. V. & BASSLER, B. L. 2005. CsrA and three redundant small RNAs regulate quorum sensing in Vibrio cholerae. *Mol Microbiol*, 58, 1186-202.

- LEVET-PAULO, M., LAZZARONI, J. C., GILBERT, C., ATLAN, D., DOUBLET, P. & VIANNEY, A. 2011. The atypical two-component sensor kinase Lpl0330 from *Legionella pneumophila* controls the bifunctional diguanylate cyclase-phosphodiesterase Lpl0329 to modulate bis-(3'-5')-cyclic dimeric GMP synthesis. *J Biol Chem*, 286, 31136-44.
- LEVINE, A., VANNIER, F., DEHBI, M., HENCKES, G. & SEROR, S. J. 1991. The stringent response blocks DNA replication outside the ori region in *Bacillus subtilis* and at the origin in *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, 219, 605-13.
- LEYNS, F., DE CLEENE, M., SWINGS, J.-G. & DE LEY, J. 1984. The host range of the genus *Xanthomonas*. *The Botanical Review*, 50, 308-356.
- LI, J. & WANG, N. 2011a. Genome-wide mutagenesis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* reveals novel genetic determinants and regulation mechanisms of biofilm formation. *PLoS One*, 6, e21804.
- LI, J. & WANG, N. 2011b. The wxacO gene of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* encodes a protein with a role in lipopolysaccharide biosynthesis, biofilm formation, stress tolerance and virulence. *Mol Plant Pathol*, 12, 381-96.
- LI, Z., ZOU, L., YE, G., XIONG, L., JI, Z., ZAKRIA, M., HONG, N., WANG, G. & CHEN, G. 2014. A potential disease susceptibility gene CsLOB of citrus is targeted by a major virulence effector PthA of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Mol Plant*, 7, 912-5.
- LIN, Z., JOHNSON, L. C., WEISSBACH, H., BROTH, N., LIVELY, M. O. & LOWTHER, W. T. 2007. Free methionine-(R)-sulfoxide reductase from *Escherichia coli* reveals a new GAF domain function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 9597-602.
- LINDEBERG, M., CUNNAC, S. & COLLMER, A. 2009. The evolution of *Pseudomonas syringae* host specificity and type III effector repertoires. *Mol Plant Pathol*, 10, 767-75.
- LINDENBERG, S., KLAUCK, G., PESAVENTO, C., KLAUCK, E. & HENGGE, R. 2013. The EAL domain protein YciR acts as a trigger enzyme in a c-di-GMP signalling cascade in *E. coli* biofilm control. *EMBO J*, 32, 2001-14.
- LINDGREN, P. B., PEET, R. C. & PANOPOULOS, N. J. 1986. Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. "phaseolicola" controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity of nonhost plants. *J Bacteriol*, 168, 512-22.
- LITTLE, R. & DIXON, R. 2003. The amino-terminal GAF domain of *Azotobacter vinelandii* NifA binds 2-oxoglutarate to resist inhibition by NifL under nitrogen-limiting conditions. *J Biol Chem*, 278, 28711-8.
- LIU, M. Y., YANG, H. & ROMEO, T. 1995. The product of the pleiotropic *Escherichia coli* gene *csrA* modulates glycogen biosynthesis via effects on mRNA stability. *J Bacteriol*, 177, 2663-72.
- LIU, N., XU, Y., HOSSAIN, S., HUANG, N., COURSOLE, D., GRALNICK, J. A. & BOON, E. M. 2012. Nitric oxide regulation of cyclic di-GMP synthesis and hydrolysis in *Shewanella woodyi*. *Biochemistry*, 51, 2087-99.
- LOVERING, A. L., CAPENESS, M. J., LAMBERT, C., HOBLEY, L. & SOCKETT, R. E. 2011. The structure of an unconventional HD-GYP protein from *Bdellovibrio* reveals the roles of conserved residues in this class of cyclic-di-GMP phosphodiesterases. *MBio*, 2.
- LU, X. H., AN, S. Q., TANG, D. J., MCCARTHY, Y., TANG, J. L., DOW, J. M. & RYAN, R. P. 2012. RsmA regulates biofilm formation in *Xanthomonas campestris* through a regulatory network involving cyclic di-GMP and the Clp transcription factor. *PLoS One*, 7, e52646.

- MA, X., SAYED, N., BASKARAN, P., BEUVE, A. & VAN DEN AKKER, F. 2008. PAS-mediated dimerization of soluble guanylyl cyclase revealed by signal transduction histidine kinase domain crystal structure. *J Biol Chem*, 283, 1167-78.
- MAGNUSSON, L. U., FAREWELL, A. & NYSTROM, T. 2005. ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol*, 13, 236-42.
- MALAMUD, F., HOMEM, R. A., CONFORTE, V. P., YARYURA, P. M., CASTAGNARO, A. P., MARANO, M. R., DO AMARAL, A. M. & VOJNOV, A. A. 2013. Identification and characterization of biofilm formation-defective mutants of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Microbiology*, 159, 1911-9.
- MALAMUD, F., TORRES, P. S., ROESCHLIN, R., RIGANO, L. A., ENRIQUE, R., BONOMI, H. R., CASTAGNARO, A. P., MARANO, M. R. & VOJNOV, A. A. 2011. The *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* flagellum is required for mature biofilm and canker development. *Microbiology*, 157, 819-29.
- MALONE, J. G., JAEGER, T., MANFREDI, P., DOTSCHE, A., BLANKA, A., BOS, R., CORNELIS, G. R., HAUSSLER, S. & JENAL, U. 2012. The YfiBNR signal transduction mechanism reveals novel targets for the evolution of persistent *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis airways. *PLoS Pathog*, 8, e1002760.
- MALONE, J. G., WILLIAMS, R., CHRISTEN, M., JENAL, U., SPIERS, A. J. & RAINEY, P. B. 2007. The structure-function relationship of WspR, a *Pseudomonas fluorescens* response regulator with a GGDEF output domain. *Microbiology*, 153, 980-94.
- MALPICA, R., FRANCO, B., RODRIGUEZ, C., KWON, O. & GEORGELLIS, D. 2004. Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 13318-23.
- MARTINEZ-ARGUDO, I., LITTLE, R. & DIXON, R. 2004. Role of the amino-terminal GAF domain of the NifA activator in controlling the response to the antiactivator protein NifL. *Mol Microbiol*, 52, 1731-44.
- MARTINEZ, S. E., BEAVO, J. A. & HOL, W. G. 2002a. GAF domains: two-billion-year-old molecular switches that bind cyclic nucleotides. *Mol Interv*, 2, 317-23.
- MARTINEZ, S. E., BRUDER, S., SCHULTZ, A., ZHENG, N., SCHULTZ, J. E., BEAVO, J. A. & LINDER, J. U. 2005. Crystal structure of the tandem GAF domains from a cyanobacterial adenylyl cyclase: modes of ligand binding and dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 3082-7.
- MARTINEZ, S. E., WU, A. Y., GLAVAS, N. A., TANG, X. B., TURLEY, S., HOL, W. G. & BEAVO, J. A. 2002b. The two GAF domains in phosphodiesterase 2A have distinct roles in dimerization and in cGMP binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 13260-5.
- MARTINKOVA, M., KITANISHI, K. & SHIMIZU, T. 2013. Heme-based globin-coupled oxygen sensors: linking oxygen binding to functional regulation of diguanylate cyclase, histidine kinase, and methyl-accepting chemotaxis. *J Biol Chem*, 288, 27702-11.
- MASCHER, T. 2013. Signaling diversity and evolution of extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Curr Opin Microbiol*, 16, 148-55.
- MASSIE, J. P., REYNOLDS, E. L., KOESTLER, B. J., CONG, J. P., AGOSTONI, M. & WATERS, C. M. 2012. Quantification of high-specificity cyclic diguanylate signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 12746-51.
- MAUPIN, J. A. & SHANMUGAM, K. T. 1990. Genetic regulation of formate hydrogenlyase of *Escherichia coli*: role of the *fhlA* gene product as a transcriptional activator for a new regulatory gene, *fhlB*. *J Bacteriol*, 172, 4798-806.

- MCLENNAN, M. K., RINGOIR, D. D., FRIRDICH, E., SVENSSON, S. L., WELLS, D. H., JARRELL, H., SZYMANSKI, C. M. & GAYNOR, E. C. 2008. Campylobacter jejuni biofilms up-regulated in the absence of the stringent response utilize a calcofluor white-reactive polysaccharide. *J Bacteriol*, 190, 1097-107.
- MECHOLD, U., MURPHY, H., BROWN, L. & CASHEL, M. 2002. Intramolecular regulation of the opposing (p)ppGpp catalytic activities of Rel(Seq), the Rel/Spo enzyme from Streptococcus equisimilis. *J Bacteriol*, 184, 2878-88.
- MERCANTE, J., EDWARDS, A. N., DUBEY, A. K., BABITZKE, P. & ROMEO, T. 2009. Molecular geometry of CsrA (RsmA) binding to RNA and its implications for regulated expression. *J Mol Biol*, 392, 511-28.
- MERIGHI, M., LEE, V. T., HYODO, M., HAYAKAWA, Y. & LORY, S. 2007. The second messenger bis-(3'-5')-cyclic-GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in Pseudomonas aeruginosa. *Mol Microbiol*, 65, 876-95.
- MILLS, E., PULTZ, I. S., KULASEKARA, H. D. & MILLER, S. I. 2011. The bacterial second messenger c-di-GMP: mechanisms of signalling. *Cell Microbiol*, 13, 1122-9.
- MINASOV, G., PADAVATTAN, S., SHUVALOVA, L., BRUNZELLE, J. S., MILLER, D. J., BASLE, A., MASSA, C., COLLART, F. R., SCHIRMER, T. & ANDERSON, W. F. 2009. Crystal structures of YkuI and its complex with second messenger cyclic Di-GMP suggest catalytic mechanism of phosphodiester bond cleavage by EAL domains. *J Biol Chem*, 284, 13174-84.
- MITICKA, H., ROWLEY, G., REZUCHOVA, B., HOMEROVA, D., HUMPHREYS, S., FARN, J., ROBERTS, M. & KORMANEC, J. 2003. Transcriptional analysis of the rpoE gene encoding extracytoplasmic stress response sigma factor sigmaE in Salmonella enterica serovar Typhimurium. *FEMS Microbiol Lett*, 226, 307-14.
- MOGLICH, A., AYERS, R. A. & MOFFAT, K. 2009. Structure and signaling mechanism of Per-ARNT-Sim domains. *Structure*, 17, 1282-94.
- MOGLICH, A., AYERS, R. A. & MOFFAT, K. 2010. Addition at the molecular level: signal integration in designed Per-ARNT-Sim receptor proteins. *J Mol Biol*, 400, 477-86.
- MOGLICH, A. & MOFFAT, K. 2007. Structural basis for light-dependent signaling in the dimeric LOV domain of the photosensor YtvA. *J Mol Biol*, 373, 112-26.
- MOGRIDGE, J. 2004. Using light scattering to determine the stoichiometry of protein complexes. *Methods Mol Biol*, 261, 113-8.
- MONTGOMERY, B. L. & LAGARIAS, J. C. 2002. Phytochrome ancestry: sensors of bilins and light. *Trends Plant Sci*, 7, 357-66.
- MOREIRA, L. M., ALMEIDA, N. F., JR., POTNIS, N., DIGIAMPIETRI, L. A., ADI, S. S., BORTOLOSSI, J. C., DA SILVA, A. C., DA SILVA, A. M., DE MORAES, F. E., DE OLIVEIRA, J. C., DE SOUZA, R. F., FACINCANI, A. P., FERRAZ, A. L., FERRO, M. I., FURLAN, L. R., GIMENEZ, D. F., JONES, J. B., KITAJIMA, E. W., LAIA, M. L., LEITE, R. P., JR., NISHIYAMA, M. Y., RODRIGUES NETO, J., NOCITI, L. A., NORMAN, D. J., OSTROSKI, E. H., PEREIRA, H. A., JR., STASKAWICZ, B. J., TEZZA, R. I., FERRO, J. A., VINATZER, B. A. & SETUBAL, J. C. 2010. Novel insights into the genomic basis of citrus canker based on the genome sequences of two strains of Xanthomonas fuscans subsp. aurantifolii. *BMC Genomics*, 11, 238.
- MOSS, J., MANGANIELLO, V. C. & VAUGHAN, M. 1977. Substrate and effector specificity of a guanosine 3':5'-monophosphate phosphodiesterase from rat liver. *J Biol Chem*, 252, 5211-5.

- MULCAHY, H., O'CALLAGHAN, J., O'GRADY, E. P., MACIA, M. D., BORRELL, N., GOMEZ, C., CASEY, P. G., HILL, C., ADAMS, C., GAHAN, C. G., OLIVER, A. & O'GARA, F. 2008. *Pseudomonas aeruginosa* RsmA plays an important role during murine infection by influencing colonization, virulence, persistence, and pulmonary inflammation. *Infect Immun*, 76, 632-8.
- MURADOV, K. G., BOYD, K. K., MARTINEZ, S. E., BEAVO, J. A. & ARTEMYEV, N. O. 2003. The GAFa domains of rod cGMP-phosphodiesterase 6 determine the selectivity of the enzyme dimerization. *J Biol Chem*, 278, 10594-601.
- MURRAY, K. D. & BREMER, H. 1996. Control of spoT-dependent ppGpp synthesis and degradation in *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, 259, 41-57.
- NAKASAKO, M., ZIKIHARA, K., MATSUOKA, D., KATSURA, H. & TOKUTOMI, S. 2008. Structural basis of the LOV1 dimerization of *Arabidopsis* phototropins 1 and 2. *J Mol Biol*, 381, 718-33.
- NARAYANAN, J. & LIU, X. Y. 2003. Protein interactions in undersaturated and supersaturated solutions: a study using light and x-ray scattering. *Biophys J*, 84, 523-32.
- NAVARRO, M. V., DE, N., BAE, N., WANG, Q. & SONDERMANN, H. 2009. Structural analysis of the GGDEF-EAL domain-containing c-di-GMP receptor FimX. *Structure*, 17, 1104-16.
- NAVARRO, M. V., NEWELL, P. D., KRASSTOVA, P. V., CHATTERJEE, D., MADDEN, D. R., O'TOOLE, G. A. & SONDERMANN, H. 2011. Structural basis for c-di-GMP-mediated inside-out signaling controlling periplasmic proteolysis. *PLoS Biol*, 9, e1000588.
- NEIDITCH, M. B., FEDERLE, M. J., POMPEANI, A. J., KELLY, R. C., SWEM, D. L., JEFFREY, P. D., BASSLER, B. L. & HUGHSON, F. M. 2006. Ligand-induced asymmetry in histidine sensor kinase complex regulates quorum sensing. *Cell*, 126, 1095-108.
- NEWELL, P. D., MONDS, R. D. & O'TOOLE, G. A. 2009. LapD is a bis-(3',5')-cyclic dimeric GMP-binding protein that regulates surface attachment by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 3461-6.
- NEWELL, P. D., YOSHIOKA, S., HVORECNY, K. L., MONDS, R. D. & O'TOOLE, G. A. 2011. Systematic analysis of diguanylate cyclases that promote biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *J Bacteriol*, 193, 4685-98.
- NICASTRO, G. G., KAIHAMI, G. H., PEREIRA, T. O., MEIRELES, D. A., GROLEAU, M. C., DEZIEL, E. & BALDINI, R. L. 2014. Cyclic-di-GMP levels affect *Pseudomonas aeruginosa* fitness in the presence of imipenem. *Environ Microbiol*, 16, 1321-33.
- NIKOLSKAYA, A. N., MULKIDJANIAN, A. Y., BEECH, I. B. & GALPERIN, M. Y. 2003. MASE1 and MASE2: two novel integral membrane sensory domains. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 5, 11-6.
- NYSTROM, T. 2004. Growth versus maintenance: a trade-off dictated by RNA polymerase availability and sigma factor competition? *Mol Microbiol*, 54, 855-62.
- O'TOOLE, G. A. & KOLTER, R. 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol*, 28, 449-61.
- OGLESBY, L. L., JAIN, S. & OHMAN, D. E. 2008. Membrane topology and roles of *Pseudomonas aeruginosa* Alg8 and Alg44 in alginate polymerization. *Microbiology*, 154, 1605-15.

- OUTTEN, F. W. & THEIL, E. C. 2009. Iron-based redox switches in biology. *Antioxid Redox Signal*, 11, 1029-46.
- PANDIT, J., FORMAN, M. D., FENNELL, K. F., DILLMAN, K. S. & MENNITI, F. S. 2009. Mechanism for the allosteric regulation of phosphodiesterase 2A deduced from the X-ray structure of a near full-length construct. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 18225-30.
- PAPPALARDO, L., JANAUSCH, I. G., VIJAYAN, V., ZIENTZ, E., JUNKER, J., PETI, W., ZWECKSTETTER, M., UNDEN, G. & GRIESINGER, C. 2003. The NMR structure of the sensory domain of the membranous two-component fumarate sensor (histidine protein kinase) DcuS of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 278, 39185-8.
- PAUL, B. J., BARKER, M. M., ROSS, W., SCHNEIDER, D. A., WEBB, C., FOSTER, J. W. & GOURSE, R. L. 2004a. DksA: a critical component of the transcription initiation machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP. *Cell*, 118, 311-22.
- PAUL, B. J., BERKMEN, M. B. & GOURSE, R. L. 2005. DksA potentiates direct activation of amino acid promoters by ppGpp. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 7823-8.
- PAUL, K., NIETO, V., CARLQUIST, W. C., BLAIR, D. F. & HARSHEY, R. M. 2010. The c-di-GMP binding protein YcgR controls flagellar motor direction and speed to affect chemotaxis by a "backstop brake" mechanism. *Mol Cell*, 38, 128-39.
- PAUL, R., ABEL, S., WASSMANN, P., BECK, A., HEERKLOTZ, H. & JENAL, U. 2007. Activation of the diguanylate cyclase PleD by phosphorylation-mediated dimerization. *J Biol Chem*, 282, 29170-7.
- PAUL, R., WEISER, S., AMIOT, N. C., CHAN, C., SCHIRMER, T., GIESE, B. & JENAL, U. 2004b. Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. *Genes Dev*, 18, 715-27.
- PECORA, R. 1985. *Dynamic light scattering : applications of photon correlation spectroscopy*, New York, Plenum.
- PEREZ-MENDOZA, D., COULTHURST, S. J., HUMPHRIS, S., CAMPBELL, E., WELCH, M., TOTH, I. K. & SALMOND, G. P. 2011. A multi-repeat adhesin of the phytopathogen, *Pectobacterium atrosepticum*, is secreted by a Type I pathway and is subject to complex regulation involving a non-canonical diguanylate cyclase. *Mol Microbiol*, 82, 719-33.
- PESAVENTO, C., BECKER, G., SOMMERFELDT, N., POSSLING, A., TSCHOWRI, N., MEHLIS, A. & HENGGE, R. 2008. Inverse regulatory coordination of motility and curli-mediated adhesion in *Escherichia coli*. *Genes Dev*, 22, 2434-46.
- PETROCELLI, S., TONDO, M. L., DAURELIO, L. D. & ORELLANO, E. G. 2012. Modifications of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* lipopolysaccharide affect the basal response and the virulence process during citrus canker. *PLoS One*, 7, e40051.
- PETROVA, O. E., CHERNY, K. E. & SAUER, K. 2015. The diguanylate cyclase GcbA facilitates *Pseudomonas aeruginosa* biofilm dispersion by activating BdlA. *J Bacteriol*, 197, 174-87.
- PETTERS, T., ZHANG, X., NESPER, J., TREUNER-LANGE, A., GOMEZ-SANTOS, N., HOPPERT, M., JENAL, U. & SOGAARD-ANDERSEN, L. 2012. The orphan histidine protein kinase SgmT is a c-di-GMP receptor and regulates composition of the extracellular matrix together with the orphan DNA binding response regulator DigR in *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol*, 84, 147-65.
- PHIPPEN, C. W., MIKOLAJEK, H., SCHLAEFLI, H. G., KEEVIL, C. W., WEBB, J. S. & TEWS, I. 2014. Formation and dimerization of the phosphodiesterase active site of the

- Pseudomonas aeruginosa* MorA, a bi-functional c-di-GMP regulator. *FEBS Lett*, 588, 4631-6.
- PITZER, J. E., SULTAN, S. Z., HAYAKAWA, Y., HOBBS, G., MILLER, M. R. & MOTALEB, M. A. 2011. Analysis of the *Borrelia burgdorferi* cyclic-di-GMP-binding protein PlzA reveals a role in motility and virulence. *Infect Immun*, 79, 1815-25.
- PLATE, L. & MARLETTA, M. A. 2012. Nitric oxide modulates bacterial biofilm formation through a multicomponent cyclic-di-GMP signaling network. *Mol Cell*, 46, 449-60.
- PODUST, L. M., IOANOVICIU, A. & ORTIZ DE MONTELLANO, P. R. 2008. 2.3 A X-ray structure of the heme-bound GAF domain of sensory histidine kinase DosT of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry*, 47, 12523-31.
- PONGRATZ, I., ANTONSSON, C., WHITELAW, M. L. & POELLINGER, L. 1998. Role of the PAS domain in regulation of dimerization and DNA binding specificity of the dioxin receptor. *Mol Cell Biol*, 18, 4079-88.
- PONTING, C. P. & ARAVIND, L. 1997. PAS: a multifunctional domain family comes to light. *Curr Biol*, 7, R674-7.
- POPLAWSKY, A. R., URBAN, S. C. & CHUN, W. 2000. Biological role of xanthomonadin pigments in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Appl Environ Microbiol*, 66, 5123-7.
- POTRYKUS, K. & CASHEL, M. 2008. (p)ppGpp: still magical? *Annu Rev Microbiol*, 62, 35-51.
- POVOLOTSKY, T. L. & HENGGE, R. 2012. 'Life-style' control networks in *Escherichia coli*: signaling by the second messenger c-di-GMP. *J Biotechnol*, 160, 10-6.
- PRATT, J. T., TAMAYO, R., TISCHLER, A. D. & CAMILLI, A. 2007. PilZ domain proteins bind cyclic diguanylate and regulate diverse processes in *Vibrio cholerae*. *J Biol Chem*, 282, 12860-70.
- PRESTON, G. M., STUDHOLME, D. J. & CALDELARI, I. 2005. Profiling the secretomes of plant pathogenic Proteobacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 29, 331-60.
- PRICE, M. N., HUANG, K. H., ALM, E. J. & ARKIN, A. P. 2005. A novel method for accurate operon predictions in all sequenced prokaryotes. *Nucleic Acids Res*, 33, 880-92.
- PROBER, J. M., TRAINOR, G. L., DAM, R. J., HOBBS, F. W., ROBERTSON, C. W., ZAGURSKY, R. J., COCUZZA, A. J., JENSEN, M. A. & BAUMEISTER, K. 1987. A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science*, 238, 336-41.
- PUNTA, M., COGGILL, P. C., EBERHARDT, R. Y., MISTRY, J., TATE, J., BOURSNEILL, C., PANG, N., FORSLUND, K., CERIC, G., CLEMENTS, J., HEGER, A., HOLM, L., SONNHAMMER, E. L., EDDY, S. R., BATEMAN, A. & FINN, R. D. 2012. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res*, 40, D290-301.
- PURICH, D. L. 2010. Enzyme kinetics catalysis & control : a reference of theory and best-practice methods. 1st ed. Amsterdam: Elsevier/Academic Press.
- QI, Y., CHUAH, M. L., DONG, X., XIE, K., LUO, Z., TANG, K. & LIANG, Z. X. 2011. Binding of cyclic diguanylate in the non-catalytic EAL domain of FimX induces a long-range conformational change. *J Biol Chem*, 286, 2910-7.
- QI, Y., RAO, F., LUO, Z. & LIANG, Z. X. 2009. A flavin cofactor-binding PAS domain regulates c-di-GMP synthesis in AxDGC2 from *Acetobacter xylinum*. *Biochemistry*, 48, 10275-85.
- QIAN, W., HAN, Z. J., TAO, J. & HE, C. 2008. Genome-scale mutagenesis and phenotypic characterization of two-component signal transduction systems in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ATCC 33913. *Mol Plant Microbe Interact*, 21, 1128-38.

- QIAN, W., JIA, Y., REN, S. X., HE, Y. Q., FENG, J. X., LU, L. F., SUN, Q., YING, G., TANG, D. J., TANG, H., WU, W., HAO, P., WANG, L., JIANG, B. L., ZENG, S., GU, W. Y., LU, G., RONG, L., TIAN, Y., YAO, Z., FU, G., CHEN, B., FANG, R., QIANG, B., CHEN, Z., ZHAO, G. P., TANG, J. L. & HE, C. 2005. Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Res*, 15, 757-67.
- RAKSHE, S., LEFF, M. & SPORMANN, A. M. 2011. Indirect modulation of the intracellular c-Di-GMP level in *Shewanella oneidensis* MR-1 by MxdA. *Appl Environ Microbiol*, 77, 2196-8.
- RAMELOT, T. A., YEE, A., CORT, J. R., SEMESI, A., ARROWSMITH, C. H. & KENNEDY, M. A. 2007. NMR structure and binding studies confirm that PA4608 from *Pseudomonas aeruginosa* is a PilZ domain and a c-di-GMP binding protein. *Proteins*, 66, 266-71.
- RAO, F., JI, Q., SOEHANO, I. & LIANG, Z. X. 2011. Unusual heme-binding PAS domain from YybT family proteins. *J Bacteriol*, 193, 1543-51.
- RAO, F., PASUNOOTI, S., NG, Y., ZHUO, W., LIM, L., LIU, A. W. & LIANG, Z. X. 2009a. Enzymatic synthesis of c-di-GMP using a thermophilic diguanylate cyclase. *Anal Biochem*, 389, 138-42.
- RAO, F., QI, Y., CHONG, H. S., KOTAKA, M., LI, B., LI, J., LESCAR, J., TANG, K. & LIANG, Z. X. 2009b. The functional role of a conserved loop in EAL domain-based cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase. *J Bacteriol*, 191, 4722-31.
- RAO, F., YANG, Y., QI, Y. & LIANG, Z. X. 2008. Catalytic mechanism of cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase: a study of the EAL domain-containing RocR from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 190, 3622-31.
- RASKIN, D. M., JUDSON, N. & MEKALANOS, J. J. 2007. Regulation of the stringent response is the essential function of the conserved bacterial G protein CgtA in *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 4636-41.
- RAY, S. K., RAJESHWARI, R., SHARMA, Y. & SONTI, R. V. 2002. A high-molecular-weight outer membrane protein of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* exhibits similarity to non-fimbrial adhesins of animal pathogenic bacteria and is required for optimum virulence. *Mol Microbiol*, 46, 637-47.
- RAY, S. K., RAJESHWARI, R. & SONTI, R. V. 2000. Mutants of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* deficient in general secretory pathway are virulence deficient and unable to secrete xylanase. *Mol Plant Microbe Interact*, 13, 394-401.
- REINELT, S., HOFMANN, E., GERHARZ, T., BOTT, M. & MADDEN, D. R. 2003. The structure of the periplasmic ligand-binding domain of the sensor kinase CitA reveals the first extracellular PAS domain. *J Biol Chem*, 278, 39189-96.
- RIGANO, L. A., SICILIANO, F., ENRIQUE, R., SENDIN, L., FILIPPONE, P., TORRES, P. S., QUESTA, J., DOW, J. M., CASTAGNARO, A. P., VOJNOV, A. A. & MARANO, M. R. 2007. Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Mol Plant Microbe Interact*, 20, 1222-30.
- ROJAS, A. M., EHRENBERG, M., ANDERSSON, S. G. & KURLAND, C. G. 1984. ppGpp inhibition of elongation factors Tu, G and Ts during polypeptide synthesis. *Mol Gen Genet*, 197, 36-45.
- ROMEO, T., VAKULSKAS, C. A. & BABITZKE, P. 2013. Post-transcriptional regulation on a global scale: form and function of Csr/Rsm systems. *Environ Microbiol*, 15, 313-24.
- ROMLING, U. 2012. Cyclic di-GMP, an established secondary messenger still speeding up. *Environ Microbiol*, 14, 1817-29.

- ROMLING, U. & AMIKAM, D. 2006. Cyclic di-GMP as a second messenger. *Curr Opin Microbiol*, 9, 218-28.
- ROMLING, U., GALPERIN, M. Y. & GOMELSKY, M. 2013. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol Mol Biol Rev*, 77, 1-52.
- ROMLING, U., GOMELSKY, M. & GALPERIN, M. Y. 2005. C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. *Mol Microbiol*, 57, 629-39.
- ROSENBERG, A. H., LADE, B. N., CHUI, D. S., LIN, S. W., DUNN, J. J. & STUDIER, F. W. 1987. Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene*, 56, 125-35.
- ROSENBLUM, B. B., LEE, L. G., SPURGEON, S. L., KHAN, S. H., MENCHEN, S. M., HEINER, C. R. & CHEN, S. M. 1997. New dye-labeled terminators for improved DNA sequencing patterns. *Nucleic Acids Res*, 25, 4500-4.
- ROSS, P., ALONI, Y., WEINHOUSE, H., MICHAELI, D., WEINBERGER-OHANA, P., MAYER, R. & BENZIMAN, M. 1986. Control of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*. A unique guanyl oligonucleotide is the immediate activator of the cellulose synthase. *Carbohydr Res*, 149, 101-117.
- ROSS, P., WEINHOUSE, H., ALONI, Y., MICHAELI, D., WEINBERGER-OHANA, P., MAYER, R., BRAUN, S., DE VROOM, E., VAN DER MAREL, G. A., VAN BOOM, J. H. & BENZIMAN, M. 1987. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature*, 325, 279-81.
- RYAN, R. P. 2013. Cyclic di-GMP signalling and the regulation of bacterial virulence. *Microbiology*, 159, 1286-97.
- RYAN, R. P., FOUHY, Y., LUCEY, J. F., CROSSMAN, L. C., SPIRO, S., HE, Y. W., ZHANG, L. H., HEEB, S., CAMARA, M., WILLIAMS, P. & DOW, J. M. 2006a. Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 6712-7.
- RYAN, R. P., FOUHY, Y., LUCEY, J. F. & DOW, J. M. 2006b. Cyclic di-GMP signaling in bacteria: recent advances and new puzzles. *J Bacteriol*, 188, 8327-34.
- RYAN, R. P., FOUHY, Y., LUCEY, J. F., JIANG, B. L., HE, Y. Q., FENG, J. X., TANG, J. L. & DOW, J. M. 2007. Cyclic di-GMP signalling in the virulence and environmental adaptation of *Xanthomonas campestris*. *Mol Microbiol*, 63, 429-42.
- RYAN, R. P., LUCEY, J., O'DONOVAN, K., MCCARTHY, Y., YANG, L., TOLKER-NIELSEN, T. & DOW, J. M. 2009. HD-GYP domain proteins regulate biofilm formation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol*, 11, 1126-36.
- RYAN, R. P., MCCARTHY, Y., ANDRADE, M., FARAH, C. S., ARMITAGE, J. P. & DOW, J. M. 2010. Cell-cell signal-dependent dynamic interactions between HD-GYP and GGDEF domain proteins mediate virulence in *Xanthomonas campestris*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 5989-94.
- RYAN, R. P., VORHOLTER, F. J., POTNIS, N., JONES, J. B., VAN SLUYS, M. A., BOGDANOVA, A. J. & DOW, J. M. 2011. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. *Nat Rev Microbiol*, 9, 344-55.
- RYBAK, M., MINSAVAGE, G. V., STALL, R. E. & JONES, J. B. 2009. Identification of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* host specificity genes in a heterologous expression host. *Mol Plant Pathol*, 10, 249-62.
- RYJENKOV, D. A., SIMM, R., ROMLING, U. & GOMELSKY, M. 2006. The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: the PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. *J Biol Chem*, 281, 30310-4.

- RYJENKOV, D. A., TARUTINA, M., MOSKVIN, O. V. & GOMELSKY, M. 2005. Cyclic diguanylate is a ubiquitous signaling molecule in bacteria: insights into biochemistry of the GGDEF protein domain. *J Bacteriol*, 187, 1792-8.
- SABNIS, N. A., YANG, H. & ROMEO, T. 1995. Pleiotropic regulation of central carbohydrate metabolism in *Escherichia coli* via the gene *csrA*. *J Biol Chem*, 270, 29096-104.
- SAHIN, E. & ROBERTS, C. J. 2012. Size-exclusion chromatography with multi-angle light scattering for elucidating protein aggregation mechanisms. *Methods Mol Biol*, 899, 403-23.
- SALOMON, M., CHRISTIE, J. M., KNIEB, E., LEMPERT, U. & BRIGGS, W. R. 2000. Photochemical and mutational analysis of the FMN-binding domains of the plant blue light receptor, phototropin. *Biochemistry*, 39, 9401-10.
- SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. 2001. *Molecular cloning : a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-7.
- SARDIWAL, S., KENDALL, S. L., MOVAHEDZADEH, F., RISON, S. C., STOKER, N. G. & DJORDJEVIC, S. 2005. A GAF domain in the hypoxia/NO-inducible *Mycobacterium tuberculosis* DosS protein binds haem. *J Mol Biol*, 353, 929-36.
- SAVAKIS, P., DE CAUSMAECKER, S., ANGERER, V., RUPPERT, U., ANDERS, K., ESSEN, L. O. & WILDE, A. 2012. Light-induced alteration of c-di-GMP level controls motility of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol Microbiol*, 85, 239-51.
- SAWAI, H., YOSHIOKA, S., UCHIDA, T., HYODO, M., HAYAKAWA, Y., ISHIMORI, K. & AONO, S. 2010. Molecular oxygen regulates the enzymatic activity of a heme-containing diguanylate cyclase (HemDGC) for the synthesis of cyclic di-GMP. *Biochim Biophys Acta*, 1804, 166-72.
- SCHAAD, N. W., POSTNIKOVA, E., LACY, G., SECHLER, A., AGARKOVA, I., STROMBERG, P. E., STROMBERG, V. K. & VIDAVER, A. K. 2006. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. *Syst Appl Microbiol*, 29, 690-5.
- SCHAAD, N. W., POSTNIKOVA, E., LACY, G. H., SECHLER, A., AGARKOVA, I., STROMBERG, P. E., STROMBERG, V. K. & VIDAVER, A. K. 2005. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and "var. *fuscans*" of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. *Syst Appl Microbiol*, 28, 494-518.
- SCHIRMER, T. & JENAL, U. 2009. Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signalling. *Nat Rev Microbiol*, 7, 724-35.
- SCHLUTER, K., JOCKUSCH, B. M. & ROTHKEGEL, M. 1997. Profilins as regulators of actin dynamics. *Biochim Biophys Acta*, 1359, 97-109.
- SCHMIDT, A. J., RYJENKOV, D. A. & GOMELSKY, M. 2005. The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: enzymatically active and inactive EAL domains. *J Bacteriol*, 187, 4774-81.

- SCHMITZ, K. S. 1990. *An introduction to dynamic light scattering by macromolecules*, Boston, Academic Press.
- SCHREIBER, G., RON, E. Z. & GLASER, G. 1995. ppGpp-mediated regulation of DNA replication and cell division in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol*, 30, 27-32.
- SCHRODINGER, LLC 2010. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1.
- SCHULTZ, J. E. 2009. Structural and biochemical aspects of tandem GAF domains. *Handb Exp Pharmacol*, 93-109.
- SCHWARZ, C. & MEHNERT, W. 1999. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. II. Drug incorporation and physicochemical characterization. *J Microencapsul*, 16, 205-13.
- SCHWER, B. & VERDIN, E. 2008. Conserved metabolic regulatory functions of sirtuins. *Cell Metab*, 7, 104-12.
- SELF, W. T., HASONA, A. & SHANMUGAM, K. T. 2001. N-terminal truncations in the FhlA protein result in formate- and MoeA-independent expression of the hyc (formate hydrogenlyase) operon of *Escherichia coli*. *Microbiology*, 147, 3093-104.
- SESHASAYEE, A. S., FRASER, G. M. & LUSCOMBE, N. M. 2010. Comparative genomics of cyclic-di-GMP signalling in bacteria: post-translational regulation and catalytic activity. *Nucleic Acids Res*, 38, 5970-81.
- SHANAHAN, C. A. & STROBEL, S. A. 2012. The bacterial second messenger c-di-GMP: probing interactions with protein and RNA binding partners using cyclic dinucleotide analogs. *Org Biomol Chem*, 10, 9113-29.
- SHIMIZU, T. 2013. The Heme-Based Oxygen-Sensor Phosphodiesterase Ec DOS (DosP): Structure-Function Relationships. *Biosensors (Basel)*, 3, 211-37.
- SIMM, R., LUSCH, A., KADER, A., ANDERSSON, M. & ROMLING, U. 2007. Role of EAL-containing proteins in multicellular behavior of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol*, 189, 3613-23.
- SIMM, R., MORR, M., KADER, A., NIMTZ, M. & ROMLING, U. 2004. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol Microbiol*, 53, 1123-34.
- SLATER, H., ALVAREZ-MORALES, A., BARBER, C. E., DANIELS, M. J. & DOW, J. M. 2000. A two-component system involving an HD-GYP domain protein links cell-cell signalling to pathogenicity gene expression in *Xanthomonas campestris*. *Mol Microbiol*, 38, 986-1003.
- SMITH, K. D., LIPCHOCK, S. V., AMES, T. D., WANG, J., BREAKER, R. R. & STROBEL, S. A. 2009. Structural basis of ligand binding by a c-di-GMP riboswitch. *Nat Struct Mol Biol*, 16, 1218-23.
- SMITH, K. D., SHANAHAN, C. A., MOORE, E. L., SIMON, A. C. & STROBEL, S. A. 2011. Structural basis of differential ligand recognition by two classes of bis-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate-binding riboswitches. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 7757-62.
- SOMMERFELDT, N., POSSLING, A., BECKER, G., PESAVENTO, C., TSCHOWRI, N. & HENGGE, R. 2009. Gene expression patterns and differential input into curli fimbriae regulation of all GGDEF/EAL domain proteins in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 155, 1318-31.
- SONDERMANN, H., SHIKUMA, N. J. & YILDIZ, F. H. 2012. You've come a long way: c-di-GMP signaling. *Curr Opin Microbiol*, 15, 140-6.

- SOUSA, E. H., TUCKERMAN, J. R., GONZALEZ, G. & GILLES-GONZALEZ, M. A. 2007. DosT and DevS are oxygen-switched kinases in *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Sci*, 16, 1708-19.
- SPAKOV, A. O. & PERTSEVA, M. N. 2008. [Signal transduction systems of prokaryotes]. *Zh Evol Biokhim Fiziol*, 44, 113-30.
- SPIRA, B., SILBERSTEIN, N. & YAGIL, E. 1995. Guanosine 3',5'-bispyrophosphate (ppGpp) synthesis in cells of *Escherichia coli* starved for Pi. *J Bacteriol*, 177, 4053-8.
- SPURBECK, R. R., TARRIEN, R. J. & MOBLEY, H. L. 2012. Enzymatically active and inactive phosphodiesterases and diguanylate cyclases are involved in regulation of Motility or sessility in *Escherichia coli* CFT073. *MBio*, 3.
- SRIVASTAVA, D., HARRIS, R. C. & WATERS, C. M. 2011. Integration of cyclic di-GMP and quorum sensing in the control of vpsT and aphA in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol*, 193, 6331-41.
- STACEY, K. A. 1956. *Light-scattering in physical chemistry*, London,, Butterworths Scientific Publications.
- STALL, R. E. & SEYMOUR, C. P. 1983. Canker, a Threat to Citrus in the Gulf-Coast States. *Plant Disease*, 67, 581-585.
- STARR, M. P., JENKINS, C. L., BUSSEY, L. B. & ANDREWES, A. G. 1977. Chemotaxonomic significance of the xanthomonadins, novel brominated aryl-polyene pigments produced by bacteria of the genus *Xanthomonas*. *Arch Microbiol*, 113, 1-9.
- STOCK, A. M., ROBINSON, V. L. & GOUDREAU, P. N. 2000. Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 69, 183-215.
- SUDARSAN, N., LEE, E. R., WEINBERG, Z., MOY, R. H., KIM, J. N., LINK, K. H. & BREAKER, R. R. 2008. Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP. *Science*, 321, 411-3.
- SULTAN, S. Z., PITZER, J. E., BOQUOI, T., HOBBS, G., MILLER, M. R. & MOTALEB, M. A. 2011. Analysis of the HD-GYP domain cyclic dimeric GMP phosphodiesterase reveals a role in motility and the enzootic life cycle of *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun*, 79, 3273-83.
- SVITIL, A. L., CASHEL, M. & ZYSKIND, J. W. 1993. Guanosine tetraphosphate inhibits protein synthesis in vivo. A possible protective mechanism for starvation stress in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 268, 2307-11.
- SWANSON, H. I. & BRADFIELD, C. A. 1993. The AH-receptor: genetics, structure and function. *Pharmacogenetics*, 3, 213-30.
- SWARUP, S., YANG, Y., KINGSLEY, M. T. & GABRIEL, D. W. 1992. An *Xanthomonas citri* pathogenicity gene, pthA, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts. *Mol Plant Microbe Interact*, 5, 204-13.
- SWINGS, J. G. & CIVEROLO, E. L. 1993. *Xanthomonas*, London, Chapman & Hall.
- SY, J. 1977. In vitro degradation of guanosine 5'-diphosphate, 3'-diphosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5529-33.
- SZCZESNY, R., JORDAN, M., SCHRAMM, C., SCHULZ, S., COGEZ, V., BONAS, U. & BUTTNER, D. 2010. Functional characterization of the Xcs and Xps type II secretion systems from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. *New Phytol*, 187, 983-1002.
- SZURMANT, H., WHITE, R. A. & HOCH, J. A. 2007. Sensor complexes regulating two-component signal transduction. *Curr Opin Struct Biol*, 17, 706-15.

- TABOADA, B., CIRIA, R., MARTINEZ-GUERRERO, C. E. & MERINO, E. 2012. ProOpDB: Prokaryotic Operon DataBase. *Nucleic Acids Res*, 40, D627-31.
- TAL, R., WONG, H. C., CALHOON, R., GELFAND, D., FEAR, A. L., VOLMAN, G., MAYER, R., ROSS, P., AMIKAM, D., WEINHOUSE, H., COHEN, A., SAPIR, S., OHANA, P. & BENZIMAN, M. 1998. Three cdg operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes. *J Bacteriol*, 180, 4416-25.
- TAMAYO, R., TISCHLER, A. D. & CAMILLI, A. 2005. The EAL domain protein VieA is a cyclic diguanylate phosphodiesterase. *J Biol Chem*, 280, 33324-30.
- TANAKA, A., TAKAHASHI, H. & SHIMIZU, T. 2007. Critical role of the heme axial ligand, Met95, in locking catalysis of the phosphodiesterase from *Escherichia coli* (Ec DOS) toward Cyclic diGMP. *J Biol Chem*, 282, 21301-7.
- TANG, J. L., LIU, Y. N., BARBER, C. E., DOW, J. M., WOOTTON, J. C. & DANIELS, M. J. 1991. Genetic and molecular analysis of a cluster of *rpf* genes involved in positive regulation of synthesis of extracellular enzymes and polysaccharide in *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. *Mol Gen Genet*, 226, 409-17.
- TAO, F., HE, Y. W., WU, D. H., SWARUP, S. & ZHANG, L. H. 2010a. The cyclic nucleotide monophosphate domain of *Xanthomonas campestris* global regulator Clp defines a new class of cyclic di-GMP effectors. *J Bacteriol*, 192, 1020-9.
- TAO, F., SWARUP, S. & ZHANG, L. H. 2010b. Quorum sensing modulation of a putative glycosyltransferase gene cluster essential for *Xanthomonas campestris* biofilm formation. *Environ Microbiol*, 12, 3159-70.
- TARUTINA, M., RYJENKOV, D. A. & GOMELSKY, M. 2006. An unorthodox bacteriophytochrome from *Rhodobacter sphaeroides* involved in turnover of the second messenger c-di-GMP. *J Biol Chem*, 281, 34751-8.
- TAYLOR, B. L. & ZHULIN, I. B. 1999. PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev*, 63, 479-506.
- TCHIGVINTSEV, A., XU, X., SINGER, A., CHANG, C., BROWN, G., PROUDFOOT, M., CUI, H., FLICK, R., ANDERSON, W. F., JOACHIMIAK, A., GALPERIN, M. Y., SAVCHENKO, A. & YAKUNIN, A. F. 2010. Structural insight into the mechanism of c-di-GMP hydrolysis by EAL domain phosphodiesterases. *J Mol Biol*, 402, 524-38.
- THEISEN, A. 2000. *Refractive increment data-book for polymer and biomolecular scientists*, Nottingham, Nottingham University Press.
- THIEME, F., KOEBNIK, R., BEKEL, T., BERGER, C., BOCH, J., BUTTNER, D., CALDANA, C., GAIGALAT, L., GOESMANN, A., KAY, S., KIRCHNER, O., LANZ, C., LINKE, B., MCHARDY, A. C., MEYER, F., MITTENHUBER, G., NIES, D. H., NIESBACH-KLOSGEN, U., PATSCHKOWSKI, T., RUCKERT, C., RUPP, O., SCHNEIKER, S., SCHUSTER, S. C., VORHOLTER, F. J., WEBER, E., PUHLER, A., BONAS, U., BARTELS, D. & KAISER, O. 2005. Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *J Bacteriol*, 187, 7254-66.
- TISCHLER, A. D. & CAMILLI, A. 2005. Cyclic diguanylate regulates *Vibrio cholerae* virulence gene expression. *Infect Immun*, 73, 5873-82.
- TONDO, M. L., PETROCELLI, S., OTTADO, J. & ORELLANO, E. G. 2010. The monofunctional catalase KatE of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* is required for full virulence in citrus plants. *PLoS One*, 5, e10803.

- TRAXLER, M. F., SUMMERS, S. M., NGUYEN, H. T., ZACHARIA, V. M., HIGHTOWER, G. A., SMITH, J. T. & CONWAY, T. 2008. The global, ppGpp-mediated stringent response to amino acid starvation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 68, 1128-48.
- TUCKERMAN, J. R., GONZALEZ, G. & GILLES-GONZALEZ, M. A. 2011. Cyclic di-GMP activation of polynucleotide phosphorylase signal-dependent RNA processing. *J Mol Biol*, 407, 633-9.
- TUCKERMAN, J. R., GONZALEZ, G., SOUSA, E. H., WAN, X., SAITO, J. A., ALAM, M. & GILLES-GONZALEZ, M. A. 2009. An oxygen-sensing diguanylate cyclase and phosphodiesterase couple for c-di-GMP control. *Biochemistry*, 48, 9764-74.
- UETZ, P., GIOT, L., CAGNEY, G., MANSFIELD, T. A., JUDSON, R. S., KNIGHT, J. R., LOCKSHON, D., NARAYAN, V., SRINIVASAN, M., POCHART, P., QURESHI-EMILI, A., LI, Y., GODWIN, B., CONOVER, D., KALBFLEISCH, T., VIJAYADAMODAR, G., YANG, M., JOHNSTON, M., FIELDS, S. & ROTHBERG, J. M. 2000. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 403, 623-7.
- UKAEGBU, U. E. & ROSENZWEIG, A. C. 2009. Structure of the redox sensor domain of *Methylococcus capsulatus* (Bath) MmoS. *Biochemistry*, 48, 2207-15.
- VALVERDE, C., LINDELL, M., WAGNER, E. G. & HAAS, D. 2004. A repeated GGA motif is critical for the activity and stability of the riboregulator RsmY of *Pseudomonas fluorescens*. *J Biol Chem*, 279, 25066-74.
- VAN DOORN, J., BOONEKAMP, P. M. & OUDEGA, B. 1994. Partial characterization of fimbriae of *Xanthomonas campestris* pv. *hyacinthi*. *Mol Plant Microbe Interact*, 7, 334-44.
- VAN SLUYS, M. A., MONTEIRO-VITORELLO, C. B., CAMARGO, L. E., MENCK, C. F., DA SILVA, A. C., FERRO, J. A., OLIVEIRA, M. C., SETUBAL, J. C., KITAJIMA, J. P. & SIMPSON, A. J. 2002. Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. *Annu Rev Phytopathol*, 40, 169-89.
- VARSHAVSKY, A. 1997. The N-end rule pathway of protein degradation. *Genes Cells*, 2, 13-28.
- VAUTERIN, L., HOSTE, B., KERSTERS, K. & SWINGS, J. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45, 472-489.
- VINELLA, D., ALBRECHT, C., CASHEL, M. & D'ARI, R. 2005. Iron limitation induces SpoT-dependent accumulation of ppGpp in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 56, 958-70.
- VOJNOV, A. A., DO AMARAL, A. M., DOW, J. M., CASTAGNARO, A. P. & MARANO, M. R. 2010. Bacteria causing important diseases of citrus utilise distinct modes of pathogenesis to attack a common host. *Appl Microbiol Biotechnol*, 87, 467-77.
- VOJNOV, A. A., ZORREGUIETA, A., DOW, J. M., DANIELS, M. J. & DANKERT, M. A. 1998. Evidence for a role for the gumB and gumC gene products in the formation of xanthan from its pentasaccharide repeating unit by *Xanthomonas campestris*. *Microbiology*, 144 (Pt 6), 1487-93.
- VOROBIEV, S. M., NEELY, H., YU, B., SEETHARAMAN, J., XIAO, R., ACTON, T. B., MONTELLIONE, G. T. & HUNT, J. F. 2012. Crystal structure of a catalytically active GG(D/E)EF diguanylate cyclase domain from *Marinobacter aquaeolei* with bound c-di-GMP product. *J Struct Funct Genomics*, 13, 177-83.
- WALKER, J. M. 2002. *The protein protocols handbook*, Totowa, N.J., Humana Press.
- WAN, X., TUCKERMAN, J. R., SAITO, J. A., FREITAS, T. A., NEWHOUSE, J. S., DENERY, J. R., GALPERIN, M. Y., GONZALEZ, G., GILLES-GONZALEZ, M. A. & ALAM, M.

2009. Globins synthesize the second messenger bis-(3'-5')-cyclic diguanosine monophosphate in bacteria. *J Mol Biol*, 388, 262-70.
- WANG, L., RONG, W. & HE, C. 2008. Two *Xanthomonas* extracellular polygalacturonases, PghAxc and PghBxc, are regulated by type III secretion regulators HrpX and HrpG and are required for virulence. *Mol Plant Microbe Interact*, 21, 555-63.
- WANG, X., DUBEY, A. K., SUZUKI, K., BAKER, C. S., BABITZKE, P. & ROMEO, T. 2005. CsrA post-transcriptionally represses pgaABCD, responsible for synthesis of a biofilm polysaccharide adhesin of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 56, 1648-63.
- WANG, X., PRESTON, J. F., 3RD & ROMEO, T. 2004. The pgaABCD locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. *J Bacteriol*, 186, 2724-34.
- WASSMANN, P., CHAN, C., PAUL, R., BECK, A., HEERKLOTZ, H., JENAL, U. & SCHIRMER, T. 2007. Structure of BeF3⁻-modified response regulator PleD: implications for diguanylate cyclase activation, catalysis, and feedback inhibition. *Structure*, 15, 915-27.
- WATERHOUSE, A. M., PROCTER, J. B., MARTIN, D. M., CLAMP, M. & BARTON, G. J. 2009. Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25, 1189-91.
- WEBER, H., PESAVENTO, C., POSSLING, A., TISCHENDORF, G. & HENGGE, R. 2006. Cyclic-di-GMP-mediated signalling within the sigma network of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 62, 1014-34.
- WEI, B. L., BRUN-ZINKERNAGEL, A. M., SIMECKA, J. W., PRUSS, B. M., BABITZKE, P. & ROMEO, T. 2001. Positive regulation of motility and flhDC expression by the RNA-binding protein CsrA of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 40, 245-56.
- WEINHOUSE, H., SAPIR, S., AMIKAM, D., SHILO, Y., VOLMAN, G., OHANA, P. & BENZIMAN, M. 1997. c-di-GMP-binding protein, a new factor regulating cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*. *FEBS Lett*, 416, 207-11.
- WEN, J., ARAKAWA, T. & PHILO, J. S. 1996. Size-exclusion chromatography with on-line light-scattering, absorbance, and refractive index detectors for studying proteins and their interactions. *Anal Biochem*, 240, 155-66.
- WENGELNIK, K., ROSSIER, O. & BONAS, U. 1999. Mutations in the regulatory gene hrpG of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* result in constitutive expression of all hrp genes. *J Bacteriol*, 181, 6828-31.
- WENGELNIK, K., VAN DEN ACKERVEKEN, G. & BONAS, U. 1996. HrpG, a key hrp regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component response regulators. *Mol Plant Microbe Interact*, 9, 704-12.
- WHITE, F. F., POTNIS, N., JONES, J. B. & KOEBNIK, R. 2009. The type III effectors of *Xanthomonas*. *Mol Plant Pathol*, 10, 749-66.
- WHITELEY, C. G. & LEE, D. J. 2015. Bacterial diguanylate cyclases: Structure, function and mechanism in exopolysaccharide biofilm development. *Biotechnol Adv*, 33, 124-141.
- WHITNEY, J. C., COLVIN, K. M., MARMONT, L. S., ROBINSON, H., PARSEK, M. R. & HOWELL, P. L. 2012. Structure of the cytoplasmic region of PelD, a degenerate diguanylate cyclase receptor that regulates exopolysaccharide production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*, 287, 23582-93.
- WILKINS, M. R., GASTEIGER, E., BAIROCH, A., SANCHEZ, J. C., WILLIAMS, K. L., APPEL, R. D. & HOCHSTRASSER, D. F. 1999. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol Biol*, 112, 531-52.

- WILKSCH, J. J., YANG, J., CLEMENTS, A., GABBE, J. L., SHORT, K. R., CAO, H., CAVALIERE, R., JAMES, C. E., WHITCHURCH, C. B., SCHEMBRI, M. A., CHUAH, M. L., LIANG, Z. X., WIJBURG, O. L., JENNEY, A. W., LITHGOW, T. & STRUGNELL, R. A. 2011. MrkH, a novel c-di-GMP-dependent transcriptional activator, controls *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation by regulating type 3 fimbriae expression. *PLoS Pathog*, 7, e1002204.
- WILSON, C. L. & SAFE, S. 1998. Mechanisms of ligand-induced aryl hydrocarbon receptor-mediated biochemical and toxic responses. *Toxicol Pathol*, 26, 657-71.
- WOLFE, A. J. & VISICK, K. L. 2008. Get the message out: cyclic-Di-GMP regulates multiple levels of flagellum-based motility. *J Bacteriol*, 190, 463-75.
- YAMADA, S., SUGIMOTO, H., KOBAYASHI, M., OHNO, A., NAKAMURA, H. & SHIRO, Y. 2009. Structure of PAS-linked histidine kinase and the response regulator complex. *Structure*, 17, 1333-44.
- YAN, Q., HU, X. & WANG, N. 2012. The novel virulence-related gene *nlxA* in the lipopolysaccharide cluster of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* is involved in the production of lipopolysaccharide and extracellular polysaccharide, motility, biofilm formation and stress resistance. *Mol Plant Pathol*, 13, 923-34.
- YAN, Q. & WANG, N. 2011. The ColR/ColS two-component system plays multiple roles in the pathogenicity of the citrus canker pathogen *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *J Bacteriol*, 193, 1590-9.
- YANG, C. Y., CHIN, K. H., CHUAH, M. L., LIANG, Z. X., WANG, A. H. & CHOU, S. H. 2011. The structure and inhibition of a GGDEF diguanylate cyclase complexed with (c-di-GMP)(2) at the active site. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 67, 997-1008.
- ZAHRINGER, F., LACANNA, E., JENAL, U., SCHIRMER, T. & BOEHM, A. 2013. Structure and signaling mechanism of a zinc-sensory diguanylate cyclase. *Structure*, 21, 1149-57.
- ZAHRINGER, F., MASSA, C. & SCHIRMER, T. 2011. Efficient enzymatic production of the bacterial second messenger c-di-GMP by the diguanylate cyclase YdeH from *E. coli*. *Appl Biochem Biotechnol*, 163, 71-9.
- ZHANG, S. S., HE, Y. Q., XU, L. M., CHEN, B. W., JIANG, B. L., LIAO, J., CAO, J. R., LIU, D., HUANG, Y. Q., LIANG, X. X., TANG, D. J., LU, G. T. & TANG, J. L. 2008. A putative *colR*(XC1049)-*colS*(XC1050) two-component signal transduction system in *Xanthomonas campestris* positively regulates *hrpC* and *hrpE* operons and is involved in virulence, the hypersensitive response and tolerance to various stresses. *Res Microbiol*, 159, 569-78.
- ZHAO, H., BROWN, P. H. & SCHUCK, P. 2011. On the distribution of protein refractive index increments. *Biophys J*, 100, 2309-17.
- ZHAO, K., CHAI, X. & MARMORSTEIN, R. 2004. Structure and substrate binding properties of *cobB*, a Sir2 homolog protein deacetylase from *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, 337, 731-41.
- ZHOU, Y. F., NAN, B., NAN, J., MA, Q., PANJIKAR, S., LIANG, Y. H., WANG, Y. & SU, X. D. 2008. C4-dicarboxylates sensing mechanism revealed by the crystal structures of DctB sensor domain. *J Mol Biol*, 383, 49-61.
- ZHULIN, I. B., NIKOLSKAYA, A. N. & GALPERIN, M. Y. 2003. Common extracellular sensory domains in transmembrane receptors for diverse signal transduction pathways in bacteria and archaea. *J Bacteriol*, 185, 285-94.
- ZIMM, B. H. 1948. The Scattering of Light and the Radial Distribution Function of High Polymer Solutions. *J Chem Phys*, 16, 1093-1099.

- ZOGAJ, X., NIMTZ, M., ROHDE, M., BOKRANZ, W. & ROMLING, U. 2001. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol Microbiol*, 39, 1452-63.
- ZORAGHI, R., CORBIN, J. D. & FRANCIS, S. H. 2004. Properties and functions of GAF domains in cyclic nucleotide phosphodiesterases and other proteins. *Mol Pharmacol*, 65, 267-78.

APÊNDICE

Dedução das equações de velocidade para a reação catalisada por DGCs

Considere um modelo em que “E” representa uma proteína previamente dimerizada (homodímero), “S” representa o substrato (GTP) e “P” representa os produtos da reação de DGC (c-di-GMP + 2PP_i):

Assumindo as condições de equilíbrio rápido e estado estacionário pode-se retirar, do mecanismo cinético acima, as seguintes constantes de equilíbrio:

$$K_1 = \frac{[E][S]}{[E^S]} \Rightarrow [E] = \frac{K_1[E^S]}{[S]}$$

$$K_2 = \frac{[E^S][S]}{[E_S^S]} \Rightarrow [E^S] = \frac{K_2[E_S^S]}{[S]}$$

$$K_3 = \frac{[E][S]}{[E_S]} \Rightarrow [E] = \frac{K_3[E_S]}{[S]}$$

$$K_4 = \frac{[E_S][S]}{[E_S^S]} \Rightarrow [E_S] = \frac{K_4[E_S^S]}{[S]}$$

Pela relação entre K_1 e K_2 tem-se que:

$$[E] = \frac{K_1 \frac{K_2[E_S^S]}{[S]}}{[S]} \Rightarrow [E] = \frac{K_1 K_2 [E_S^S]}{[S]^2}$$

Considerando o princípio de conservação de massa:

$$[E]_T = [E] + [E^S] + [E_S] + [E_S^S]$$

E substituindo pelos valores acima, obtém-se:

$$[E]_T = \frac{K_1 K_2 [E_S^S]}{[S]^2} + \frac{K_2 [E_S^S]}{[S]} + \frac{K_4 [E_S^S]}{[S]} + [E_S^S]$$

$$[E]_T = \frac{K_1 K_2 [E_S^S] + K_2 [E_S^S] [S] + K_4 [E_S^S] [S] + [E_S^S] [S]^2}{[S]^2}$$

$$[E]_T = \frac{[E_S^S]}{[S]^2} (K_1 K_2 + K_2 [S] + K_4 [S] + [S]^2)$$

Rearranjando:

$$[E_S^S] = \frac{[E]_T [S]^2}{K_1 K_2 + K_2 [S] + K_4 [S] + [S]^2}$$

Considerando que:

$$V_0 = k_{cat} [E_S^S]$$

$$V_{max} = k_{cat} [E]_T$$

E assumindo que $K_1=K_3$ na relação:

$$K_1 K_2 = K_3 K_4$$

Então, $K_2=K_4$, e obtém-se a seguinte equação de velocidade:

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]^2}{K_1 K_2 + 2K_2 [S] + [S]^2}$$

Que pode ser escrita também na forma de duplo-recíproco:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{2K_2}{V_{max}} \left(\frac{1}{[S]} \right) + \frac{K_1 K_2}{V_{max}} \left(\frac{1}{[S]^2} \right)$$

LISTA DE ANEXOS

Anexo A – Trabalho publicado em revista científica

Maycon C. Oliveira, Raphael D. Teixeira, Maxuel O. Andrade, Glaucia M.S. Pinheiro, Carlos H.I. Ramos, Chuck S. Farah, Cooperative Substrate Binding by a Diguanylate Cyclase, Journal of Molecular Biology, Volume 427, Issue 2, 30 January 2015, Pages 415-432, ISSN 0022-2836, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2014.11.012>.

Anexo B – Súmula curricular