**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

RAPHAEL DIAS TEIXEIRA

**Estudo de proteínas GGDEF-EAL
em vias de sinalização de c-di-GMP
em *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.**

Versão original da Tese defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

04/03/2015

RAPHAEL DIAS TEIXEIRA

**Estudo de proteínas GGDEF-EAL
em vias de sinalização de c-di-GMP
em *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.

T266e Teixeira, Raphael Dias
Estudo de proteínas GGDEF-EAL em vias de sinalização de c-di-
GMP em *Xanthomonas citri* subsp. *citri* / Raphael Dias Teixeira. --
São Paulo, 2015.
191p.

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

1. Proteína : Estrutura : Bioquímica 2. Microbiologia I. T. II.
Farah, Shaker Chuck, orientador.

574.19245 CDD

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Chuck Farah por me acolher em seu laboratório e sempre se preocupar em providenciar as melhores condições para o desenvolvimento da minha pesquisa. Por sempre disponibilizar uma parte de seu tempo para discussões quando necessitei e pela liberdade me dada para direcionar meu trabalho.

À todos que fazem parte de minha família, Mariana, Ângela, Anelise, Ana Alice, Madalena, Denilton, Eliane, Isabella, Lucas, Ricardo, Lina, e especialmente à meus pais, Denise e Luiz.

Aos meus companheiros de laboratório, atuais e passados pelos tantos anos de boa convivência e ajuda nos experimentos: Diorge Souza, Cristiane Guzzo, Maxuel Andrade, Maycon Oliveira, Ilda Souza, Camila Schroeder, Cristina Martinez, German Dunger, Gabriel Oka, Edgar Llontop, German Sgro, Layara Abiko, Cláudia Pereda, Denize Favaro, Ronaldo Quaggio, Phelipe Vitale, Luciana Coutinho, Pricila Hauk, Fernanda Nogales, Nikolas Koshiyama, Ligia Colombo, Srinivas Manchalu, Ewa Księżopolska, Lise Hobeika, Santiago Arevalo e Natália Bueno.

Aos colegas e professores do departamento de Bioquímica do IQ-USP pelas conversas e interações científicas: Roberto Salinas, Regina Baldini, Frederico Gueiros, Alexandre Bisson, Valdir Blasios, Gianluca Nicastro, Duilio Oliveira, Fábio Kendi e Raphael Sayegh.

Às agências financiadoras CNPq e FAPESP.

“Ah, tem uma repetição, que sempre outras vezes em minha vida acontece. Eu atravesso as coisas – e no meio da travessia não vejo! – só estava era entretido na ideia dos lugares de saída e de chegada. Assaz o senhor sabe: a gente quer passar um rio a nado, e passa; mas vai dar na outra banda é num ponto muito mais embaixo, bem diverso do em que primeiro se pensou. Viver nem não é muito perigoso?”

J. Guimarães Rosa

RESUMO

Teixeira, R.D. **Estudo de proteínas GGDEF-EAL em vias de sinalização de c-di-GMP em *Xanthomonas citri* subsp. *citri***. 2015. 191p. Tese - Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Segundos mensageiros nucleotídicos são amplamente utilizados por bactérias para se adaptar às mudanças ambientais e fisiológicas. Neste cenário destaca-se o c-di-GMP, um segundo mensageiro praticamente universal em bactérias responsável por controlar a transição do estilo de vida bacteriano. Em geral, altos níveis celulares de c-di-GMP promovem um estado sésil, de formação de biofilme, enquanto baixos níveis induzem a motilidade. *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), um fitopatógeno de grande importância econômica no Brasil, possui uma complexa regulação da sinalização de c-di-GMP, possuindo mais de 30 proteínas envolvidas na síntese, na degradação e na detecção deste segundo mensageiro. Dentre essas proteínas, destacam-se as que possuem os domínios de síntese e degradação presentes na mesma cadeia polipeptídica, os domínios GGDEF e EAL respectivamente. A análise das estruturas primárias das 11 proteínas GGDEF-EAL codificadas pelo genoma de Xac revelou que a maior parte delas (6) provavelmente possui o domínio GGDEF inativo, enquanto o EAL é ativo. Três possivelmente possuem ambos os domínios ativos enquanto outras duas possuem ambos os domínios inativos. O nocaute do gene *xac2382* que codifica uma dessas proteínas (que possui um domínio periplasmático seguido dos domínios citoplasmáticos HAMP-GGDEF-EAL), demonstra um aumento de motilidade e uma diminuição na formação de biofilme. Construções de fragmentos da proteína revelaram que XAC2382 necessita pelo menos dos domínios HAMP-GGDEF para

complementar a cepa nocaute e que a atividade de diguanilato ciclase é essencial para isto. O domínio periplasmático de XAC2382 se mostrou interagir com XAC2383, uma proteína codificada por um gene presente no mesmo cluster do gene de XAC2382, e essa interação parece importante para o controle da motilidade de Xac. A estrutura de XAC2383 foi resolvida por cristalografia de raios X na qual foi revelada uma topologia típica de proteínas da família das periplasmic binding proteins (PBPs) possuindo ainda uma cavidade carregada positivamente contendo um motivo Ser-Thr-Ser (aminoácidos 152-154) importante para a ligação de compostos com grupos fosfatos ou fosfonatos. A mutação sítio dirigida nesse motivo aboliu os efeitos na motilidade dependentes dessa proteína. Esses resultados sugerem que XAC2383 é um sensor periplasmático de um composto eletronegativo e esta proteína interage com XAC2382 regulando a motilidade bacteriana. XAC0495, uma proteína com ambos os domínios GGDEF-EAL provavelmente inativos, pode fazer parte de um sistema de dois componentes com a histidina quinase XAC0494. XAC0495 se comporta como um monômero em solução e possui um formato alongado, como revelado por experimentos de SAXS.

Palavras-chave: c-di-GMP, GGDEF-EAL, *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, periplasmic binding proteins.

ABSTRACT

Teixeira, R.D. **Study of GGDEF-EAL proteins in c-di-GMP pathways in *Xanthomonas citri* subsp. *citri***. 2015. 191p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Nucleotide based second messengers are widely used by bacteria in signaling pathways that mediate adaptations to environmental and physiological changes. c-di-GMP is a nucleotide second messenger ubiquitous in Gram-negative bacteria, where it plays a role in many important behaviors that define bacterial lifestyle. In general, high cellular levels of c-di-GMP promote biofilm formation, while low levels induce bacterial motility. *Xanthomonas citri* subsp. *Citri* (Xac), a pathogen of great economic importance in Brazil, has a complex repertoire of c-di-GMP signaling molecules, with more than 30 genes coding for proteins involved in the synthesis, degradation and detection of this second messenger. Among these proteins, many have both GGDEF and EAL domains (often associated with c-di-GMP synthesis and degradation, respectively) present in the same polypeptide chain. Analysis of the primary structure of 11 GGDEF-EAL proteins coded by the Xac genome revealed that six most likely possess an inactive GGDEF domain plus an active EAL domain. Another three proteins have both domains active while the other two have both domains inactive. The knockout of the *xac2382* gene, coding for a protein which contains a periplasmic domain followed by cytoplasmic HAMP, GGDEF (active) and EAL (active) domains, shows an increase in motility and a decrease in biofilm formation. Constructions containing fragments of this protein revealed that constructs containing at least the HAMP and GGDEF domains are able to complement the knockout strain and that diguanilate cyclase activity is essential for this. The XAC2382 periplasmic domain was shown to interact with a protein encoded by a gene situated in the same cluster, XAC2383, and that this interaction

seems crucial for the control of Xac motility. The structure of XAC2383 was solved by X-ray crystallography and was shown to adopt a topology typical of the periplasmic binding proteins (PBP) family. The protein possesses a positively charged groove that contains a Ser-Thr-Ser motif (₁₅₂STS₁₅₄) important for the binding of compounds with phosphate or phosphonate groups. Site-directed mutagenesis of this motif abolished the effects on motility caused by this protein. These results suggest that XAC2383 is a periplasmic protein responsible for sensing a compound with electronegative characteristics and which interacts with XAC2382, thereby regulating the bacterial motility. Another protein, XAC0495 (with both GGDEF-EAL domains probably inactive) may be part of a two-component system with the histidine kinase XAC0494. Small-angle X-ray scattering (SAXS) experiments reveal that XAC0495 exists as an elongated monomer in solution.

Keywords: c-di-GMP, GGDEF-EAL, *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, periplasmic binding proteins.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ap^R – resistência à ampicilina

Cam^R – resistência à cloranfenicol

c-di-GMP – diguanilato cíclico

DGC – diguanilato ciclase

DMSO – dimetilsulfóxido

DO – densidade ótica

Gm^R – resistência à gentamicina

GTP – guanosina trifosfato

IPTG – isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

kb – quilobases

kDa – quilodalton

Kan^R – resistência à kanamicina

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

pb – pares de base

pBAD – promotor induzível por L-arabinose

PBP - periplasmic binding proteins

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

PDB – banco de Dados de Proteínas (*Protein Data Bank*)

PDE – fosfodiesterase

PEG – polietilenoglicol

PP_i – pirofosfato

rpm – rotações por minuto

SAD – single-wavelength anomalous dispersion

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

SAXS – espalhamento de luz a baixo ângulo

Spc^R – resistência à spectinomicina

Str^R – resistência à streptomicina

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

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. OS SEGUNDOS MENSAGEIROS BACTERIANOS.....	14
1.1.1. AMP cíclico	16
1.1.2. GMP cíclico.....	17
1.1.3. Penta ou tetra fosfato de guanosina.....	18
1.1.4. Diadenilato cíclico	18
1.1.5. Adenosina monofosfato-guanosina monofosfato cíclico	19
1.2. DIGUANILATO CÍCLICO	19
1.2.1. Produção de c-di-GMP, o domínio GGDEF.....	20
1.2.2. Degradação de c-di-GMP, os domínios EAL e HD-GYP.	22
1.2.3. Transição motilidade-sessilidade, o paradigma da sinalização por c-di-GMP	26
1.2.4. Sentindo o c-di-GMP, moléculas receptoras intracelulares.	27
1.2.5. A diversidade dos domínios regulatórios de diguanilato ciclases e fosfodiesterases.....	33
1.2.6. GGDEF-EAL, uma arquitetura muito comum em proteínas da via de c-di-GMP....	37
1.3. O FITOPATÓGENO <i>XANTHOMONAS CITRI</i> SUBSP. <i>CITRI</i>	38
1.3.1. O cancro cítrico, doença causada por <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	39
1.3.2. O genoma de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> e fatores de patogenicidade em <i>Xanthomonas</i>	42
2. OBJETIVOS	46
2.1. OBJETIVO GERAL	46
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
3.1. MEIOS DE CULTIVO E LINHAGENS UTILIZADAS.....	48
3.2. IDENTIFICAÇÃO DE DOMÍNIOS GGDEF E EAL EM XAC.....	52
3.3. REAÇÕES DE PCR, CLONAGEM E EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS.	52
3.4. MUTAÇÃO SÍTIO DIRIGIDA	60
3.5. INDUÇÃO EXPRESSÃO E LISE DE PROTEÍNAS	62
3.6. EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS COM SELENOMETIONINA (SeMet)	63
3.7. PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS COM CAUDA DE HISTIDINA POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE.....	63
3.8. PURIFICAÇÃO DE XAC2383	64
3.9. PREPARAÇÃO E TRANSFORMAÇÃO DE XAC.....	64
3.10. PRODUÇÃO DO NOCAUTE Δ XAC2383	65
3.11. ENSAIO DE MOTILIDADE DO TIPO TWITCHING	68
3.12. ENSAIO DE MOTILIDADE DO TIPO SLIDING	69
3.13. ENSAIO DE FORMAÇÃO DE BIOFILME.....	69
3.14. ENSAIO DE VIRULÊNCIA DE XAC EM LARANJEIRA.	70
3.15. DUPLO HÍBRIDO EM LEVEDURA.....	70
3.16. ATIVIDADE DE DIGUANILATO CICLASE EM CÉLULAS (CONGO RED)	71
3.17. ENSAIO DE ATIVIDADE DIGUANILATO CICLASE E FOSFODIESTERASE.....	72
3.18. ENSAIO DE CROMATOGRAFIA DE GEL FILTRAÇÃO ANALÍTICA	72

3.19.	ENSAIO DE INTERAÇÃO XAC2382-XAC2383	73
3.20.	DICROÍSMO CIRCULAR	74
3.21.	SAXS (SMALL-ANGLE X-RAY SCATTERING)	74
3.22.	CRISTALIZAÇÃO E DIFRAÇÃO DOS CRISTAIS OBTIDOS DA PURIFICAÇÃO DO COMPLEXO XAC2382-XAC2383	75
3.23.	ESTRUTURA DE XAC2383	76
3.24.	ENSAIO DE <i>SOAKING</i>	77
4.	RESULTADOS.....	78
4.1.	PREDIÇÃO DE ATIVIDADE DE PROTEÍNAS GGDEF-EAL DE <i>XANTHOMONAS CITRI</i> SUBSP. <i>CITRI</i> . 78	
4.2.	EXPRESSÃO DE GGDEF-EALS DE <i>XANTHOMONAS CITRI</i> SUBSP. <i>CITRI</i>	84
4.3.	ENSAIO QUALITATIVO DE ATIVIDADE DE DIGUANILATO CICLASE <i>IN VIVO</i> DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EXPRESSAS EM <i>E. COLI</i>	90
4.4.	ENSAIO DE ATIVIDADE DE DIGUANILATO CICLASE E FOSFODIESTERASE DE C-DI-GMP <i>IN VITRO</i> 92	
4.5.	A CEPA NOCAUTE <i>XACΔ2382</i> AFETA A MOTILIDADE <i>SLIDING</i> DE <i>XANTHOMONAS CITRI</i> SUBSP. <i>CITRI</i>	94
4.6.	COMPLEMENTAÇÃO DA CEPA <i>XACΔ2382</i>	97
4.7.	EFEITO DE MUTAÇÕES PONTUAIS EM XAC2382.....	99
4.8.	ENSAIO DE MOTILIDADE DO TIPO <i>TWITCHING</i>	105
4.9.	ENSAIO DE DUPLO HÍBRIDO EM LEVEDURA.....	107
4.10.	EFEITO DO NOCAUTE EM <i>XAC2382</i> NA VIRULÊNCIA	108
4.11.	CONTEXTO GENÔMICO DE XAC2382 E A PROTEÍNA XAC2383.	109
4.12.	XAC2383 INTERAGE COM O DOMÍNIO PERIPLASMÁTICO DE XAC2382	115
4.13.	EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E CRISTALIZAÇÃO DE XAC2383	118
4.14.	CRISTALIZAÇÃO E DADOS PRELIMINARES DA DIFRAÇÃO POR RAIOS X.	119
4.15.	XAC2383 POSSUI UMA TOPOLOGIA TÍPICA DE <i>PERIPLASMIC BINDING PROTEINS</i> (PBPs). 126	
4.16.	XAC2383 FOI CRISTALIZADA COM UM ÍON DE CLORETO LIGADO EM SUA FENDA CENTRAL 132	
4.17.	XAC2383 POSSUI UMA FENDA CENTRAL CARREGADA POSITIVAMENTE	134
4.18.	<i>SCREENING</i> DE LIGANTES ATRAVÉS DA TÉCNICA DE <i>SOAKING</i>	137
4.19.	CARACTERIZAÇÃO DA CEPA NOCAUTE EM XAC2383.	140
4.20.	XAC2383 COM MUTAÇÃO NO SÍTIO DE LIGAÇÃO DEIXA DE AFETAR A MOTILIDADE.....	141
4.21.	A MUTAÇÃO STS152-154AAA CRIADA EM XAC2383 PARECE AFETAR A INTERAÇÃO COM O DOMÍNIO PERIPLASMÁTICO DE XAC2382	143
4.22.	CONTRIBUIÇÃO DE XAC2382 E XAC2383 NA FORMAÇÃO DE BIOFILME	144
4.23.	XAC0495, UMA PROTEÍNA GGDEF-EAL DEGENERADA	147
4.24.	XAC0495 SE COMPORTA COMO UM MONÔMERO EM SOLUÇÃO	148
5.	DISCUSSÃO.....	156
5.1.	PREDIÇÃO DE ATIVIDADE DAS PROTEÍNAS GGDEF-EAL DE XAC	156
5.2.	ATIVIDADE <i>IN VIVO</i> DE XAC2382	158
5.3.	ENVOLVIMENTO DE XAC2382 NA VIRULÊNCIA DE <i>XANTHOMONAS CITRI</i> SUBSP. <i>CITRI</i> ..	159
5.4.	INTERAÇÃO XAC2382-XAC2383	160
5.5.	ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DE XAC2383	162

5.6.	UM MODELO DO PARA XAC2382-XAC2383 NO CONTROLE DA MOTILIDADE DE <i>XANTHOMONAS CITRI</i> SUBSP. <i>CITRI</i>	163
5.7.	XAC0495 É UM MONÔMERO ALONGADO EM SOLUÇÃO	167
6.	CONCLUSÕES	169
7.	REFERENCIAS	171

1. INTRODUÇÃO

1.1.Os segundos mensageiros bacterianos

Bactérias frequentemente deparam com mudanças no ambiente que vivem e no seu estado fisiológico, sendo preciso saber lidar com estas variações para melhor se adaptar. Neste contexto, a sinalização através de segundos mensageiros é uma das principais formas usadas pelas bactérias para preparar a célula para contornar transformações que ocorrem em seu universo. Segundos mensageiros são moléculas intracelulares geralmente produzidas por enzimas com o objetivo final de promover as mudanças fisiológicas necessárias para a adaptação ¹.

Frequentemente as enzimas que controlam os níveis dos segundos mensageiros estão presas às membranas bacterianas e possuem regiões sensoras voltadas para fora da célula, de forma a responder rapidamente às variações ambientais. Uma vez ativadas, estas enzimas conseguem produzir ou degradar várias moléculas do sinalizador, o que gera uma amplificação do sinal, uma das características mais importantes das vias de sinalização por segundos mensageiros. Os segundos mensageiros interagem com moléculas intracelulares, as chamadas moléculas efetoras, que sentem seus níveis e promovem a execução de seus efeitos (Figura 1).

Os sinais iniciais que desencadeiam a sinalização por segundos mensageiros são extremamente diversos. Podem ser acúmulo de moléculas de tRNA descarregadas de aminoácidos, moléculas de comunicação bacteriana (*quorum sensing*), falta de açúcares, oxigênio e até luz ^{2; 3; 4; 5; 6}.

Figura 1. Axioma da sinalização celular por segundos mensageiros em bactérias. Uma enzima transmembranar (enzima 1, azul escuro) capta sinais ambientais (estrela vermelha) do lado de fora da membrana plasmática. Na porção intracelular, esta enzima muda os níveis do segundo mensageiro (hexágono verde). Alterações no estado fisiológico da bactéria (estrela alaranjada) são sinalizadas e sentidas por uma enzima citoplasmática (enzima 2, azul claro) que também muda os níveis do segundo mensageiro. Em amarelo, uma molécula efetora sente as alterações nas concentrações do segundo mensageiro e promove mudanças fisiológicas na célula.

Os segundos mensageiros bacterianos mais comuns e estudados são os de natureza nucleotídica, ainda que, recentemente têm aparecido evidências de que Ca^{2+} também tem um importante papel na sinalização procariótica, assim como ocorre em eucariotos ⁷. Neste cenário, destacam-se o AMP cíclico (cAMP) ⁸, GMP cíclico (cGMP) ⁹, penta ou tetrafosfato de guanosina ((p)ppGpp) ¹⁰, diguanilato cíclico (c-di-GMP) ¹¹, diadenilato cíclico (c-di-AMP) ¹² e o adenosina monofosfato-guanosina monofosfato cíclico (cAMP-GMP) ¹³ (Figura 2).

Figura 2. Segundos mensageiros nucleotídicos encontrados em bactérias.

1.1.1. AMP cíclico

O primeiro segundo mensageiro bacteriano a ser estudado foi o AMP cíclico (cAMP), o que faz dele peça participante do paradigma do controle transcricional em biologia molecular. Desde a década de 70 já se conhecia seu envolvimento na repressão catabólica e no controle da transcrição¹⁴. Em situações de abundância de açúcares, o domínio chamado EIIA do transportador de glicose permanece desfosforilado, visto que o fosfato é transferido deste domínio para o domínio EIIB e posteriormente para o açúcar que será transportado para dentro da célula onde será utilizado. Por outro lado, em situações de carência de açúcares acumula-se o domínio EIIA no seu estado fosforilado, pois não há fonte de carbono disponível para transferência de fosfato e consequente transporte através da membrana. O domínio EIIA

fosforilado interage com uma adenilato ciclase, ativando-a e culminando na elevação dos níveis intracelulares de cAMP. O AMP cíclico por sua vez se liga à proteína efetora CAP (*catabolite activator protein*) que regula a transcrição de vários genes relacionados à utilização de fontes alternativas de carbono ¹⁵. Este sem dúvida é um dos exemplos mais bem conhecidos da sinalização por segundos mensageiros bacterianos ¹⁶.

1.1.2. GMP cíclico

A sinalização por cGMP em procariotos, ao contrário de eucariotos, é bastante inexplorada. Durante anos faltavam-se evidências do papel deste segundo mensageiro na regulação de quaisquer processos bacterianos sendo difícil até mesmo a identificação de enzimas envolvidas na síntese de cGMP (guanilil ciclases) ¹⁷. Somente em 2008 foi confirmado que Cya2 é uma guanilato ciclase presente na cianobactéria *Synechocystis* PCC6803 e que a proteína homóloga em *Rhodospirillum centenum* é essencial para a formação de cisto nesta bactéria ^{18; 19}. Recentemente foi descoberta uma via de sinalização em *Xanthomonas campestris* em que o cGMP produzido por uma guanilil ciclase interage com uma enzima produtora do segundo mensageiro c-di-GMP ativando-a e tendo papel importante na virulência deste fitopatógeno ²⁰. Muito ainda precisa ser conhecido sobre os efeitos do cGMP em bactérias, principalmente no que diz respeito às moléculas que interagem com este nucleotídeo e a sua universalidade nesses organismos.

1.1.3. Penta ou tetra fosfato de guanosina

O (p)ppGpp, um dos segundos mensageiros mais estudados, é um sinalizador bacteriano que funciona como um alerta celular em condições de carência nutricional, podendo ser aminoácidos, ácidos graxos, carbonos e até fosfatos ²¹. O aumento dos níveis de (p)ppGpp nestas situações de estresse resultam em baixo crescimento celular, levando ao que chamamos de resposta estrigente ²². O (p)ppGpp interage com a RNA polimerase e com seus fatores sigma para modular a transcrição e com fatores de elongação ribossomais, controlando a tradução de proteínas ^{22; 23}. Proteínas com domínio RelA sintetizam este segundo mensageiro a partir de GTP (ou GDP) e ATP e proteínas contendo o domínio SpoT o degradam ²⁴.

1.1.4. Diadenilato cíclico

O c-di-AMP foi descoberto em 2008 como sendo um sinalizador de quebras de DNA e regulador da esporulação de *Bacillus subtilis*, estando presente principalmente em bactérias Gram-positivas, embora também apareça em Gram-negativas ²⁵. Quando a proteína DisA, que produz c-di-AMP em *B. subtilis*, encontra quebras duplas nas fitas de DNA, a atividade de produção de c-di-AMP é inibida. Essa diminuição nos níveis do segundo mensageiro acarreta a interrupção da esporulação nesta bactéria ^{12; 26}. Foram encontradas proteínas com o domínio de síntese de c-di-AMP juntamente com outros domínios além do de reconhecimento de quebras de DNA, sugerindo que este segundo mensageiro exerça outras funções no mundo bacteriano ²⁵.

1.1.5. Adenosina monofosfato-guanosina monofosfato cíclico

Em *Vibrio cholerae* foi descoberta a proteína DncV pertencente à superfamília das nucleotidil transferase que é capaz de sintetizar os segundos mensageiros c-di-AMP, c-di-GMP e o híbrido c-AMP-GMP. Visto que a presente enzima sintetiza a molécula híbrida c-AMP-GMP com muito mais eficiência que os outros dinucleotídeos, e que ela é capaz de regular a quimiotaxia desta bactéria, o c-AMP-GMP foi colocado no rol dos segundos mensageiros baseados em nucleotídeos ¹³. Ainda que proteínas homólogas a DncV foram encontradas em outros organismos, nada mais sabemos até o momento a respeito da sinalização por esse mensageiro.

1.2.Diguanilato cíclico

O segundo mensageiro c-di-GMP emergiu nos últimos 20 anos como um dos mais importantes e abrangentes segundos mensageiros bacterianos. Ele foi descoberto no final dos anos 80 quando o grupo de Moshe Benziman estudava a produção de celulose no organismo modelo *Gluconacetobacter xylinus*, naquela época classificada como *Acetobacter xylinum*. Benziman e colaboradores estavam há algum tempo atrás de um fator que estimulava a produção da celulose e no ano de 1987 mostraram que esse fator era o c-di-GMP ²⁷.

Somente depois de mais de 10 anos, os genes envolvidos na síntese e degradação do c-di-GMP foram sequenciados e confirmados que participavam da produção e degradação deste segundo mensageiro ^{28; 29; 30}. Se tratavam das proteínas que possuíam os domínios chamados GGDEF para a produção, e os domínios EAL ou HD-GYP que realizam a degradação (Figura 3).

Figura 3. Ciclo do c-di-GMP controlado pelas proteínas produtoras e degradadoras.

Estas enzimas também possuíam domínios conhecidamente regulatórios e presentes em outras proteínas sinalizadoras o que levantava pistas sobre o c-di-GMP regular outros processos além da produção de celulose. Com o advento do sequenciamento dos genomas, não se teve mais dúvidas, as proteínas envolvidas no metabolismo de c-di-GMP eram tão numerosas, vastamente presente nos genomas e com uma diversidade de domínios adjacentes tão intrigante que este segundo mensageiro só poderia ter outras funções desconhecidas além da produção de celulose. Começou a partir daí os estudos a respeito de tudo que permeia o c-di-GMP, sua síntese, degradação, os alvos moleculares e os efeitos mediados por ele.

1.2.1. Produção de c-di-GMP, o domínio GGDEF

O c-di-GMP é sintetizado por enzimas (diguilato ciclases, DGCs) contendo o domínio GGDEF. O nome do domínio é devido à presença no sítio ativo de um motivo conservado Gly-Gly-(Asp/Glu)-Glu-Phe³¹. Os GGDEF possuem uma estrutura similar a adenilato ciclases do tipo III, apesar de possuírem baixa similaridade de estrutura primária com essas proteínas (Figura 4A)

³². A reação é catalisada a partir de duas moléculas de GTP, necessitando da assistência de dois íons metálicos (Mg^{2+} ou Mn^{2+}) resultando em c-di-GMP e duas moléculas de pirofosfato (Figura 4B). O domínio GGDEF se liga a somente uma molécula de GTP por vez, o que implica que a forma ativada da proteína deve ser ao menos um dímero. O motivo GGDEF é indispensável para a atividade de diguanilato ciclase e se localiza em uma região de *β -hairpin* onde estão resíduos como o ácido aspártico que coordena um dos metais e o ácido glutâmico que pode funcionar como um aceptor de prótons do 3' OH da molécula de GTP. Praticamente qualquer mutação nesta assinatura leva a abolição da atividade de diguanilato ciclase ³³. Quando buscamos domínios GGDEFs em bancos de dados como o Pfam ³⁴, observamos que quase sempre ele está acompanhado de domínios adjacentes ou regiões transmembranares, situados no N-terminal da proteína. Esses domínios muitas vezes são regulatórios e regulam a dimerização ou aproximação dos GGDEFs para controle da atividade de diguanilato ciclase ³⁵. Além disso, em cerca de 50% das diguanilato ciclasas já sequenciadas existe um motivo RXXD, situado próximo à região do sítio ativo e que têm a função de se ligar ao produto c-di-GMP (dímero de c-di-GMP) e inibir a atividade de DGC, recebendo por essa razão o nome de sítio inibitório (sítio I) ³⁶. Essas características adicionais trazem complexidade à regulação da atividade de diguanilato ciclase, expondo um cenário em que estudar o domínio GGDEF e seu sítio ativo somente, não é suficiente para entender o mecanismo de ação destas proteínas.

Figura 4. Domínio GGDEF de produção de c-di-GMP. A) Modelo de estrutura cristalográfica do domínio GGDEF de PleD de *Caulobacter crescentus* (PDBID: 2WB4) com destaque em vermelho para o β -hairpin onde se localiza o motivo GGDEF e em amarelo o motivo RXXD que forma parte do sítio inibitório (sítio I) ³⁵. B) Esquema da produção de c-di-GMP por uma diguanilato ciclase. A partir de duas moléculas de GTP forma-se o c-di-GMP e duas moléculas de pirofosfato como produto secundário. Em muitos casos, a atividade somente ocorre após um sinal estimulatório (estrela vermelha) ser sentido por um domínio regulatório que passa a informação para o domínio GGDEF.

Em um trabalho desenvolvido pelo aluno de doutorado do nosso grupo, Maycon Oliveira e que eu faço parte, mostramos que XAC0610, uma diguanilato ciclase de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, liga o substrato GTP com cooperatividade, sendo que a ligação da segunda molécula de GTP possui uma constante de dissociação cerca de 5 vezes menor que a ligação da primeira. Propomos pela primeira vez que a cooperatividade possa ser um mecanismo comum para as diguanilato ciclases ³⁷.

1.2.2. Degradação de c-di-GMP, os domínios EAL e HD-GYP.

O c-di-GMP é degradado a 5'pGpG por proteínas que possuem o domínio EAL, e utilizam dois íons Mg^{2+} ou Mn^{2+} para a catálise, sendo este domínio extremamente específico para c-di-

GMP e incapaz de hidrolizar ligações fosfodiester presentes em outras moléculas, como o cAMP^{38; 39; 40}. O domínio EAL também recebe esse nome devido ao motivo conservado Glu-Ala-Leu presente nessas fosfodiesterases. A mutação do glutamato desta assinatura abole a atividade de fosfodiesterase por ser esse resíduo responsável por coordenar um dos metais que é importante para ativar o ataque nucleofílico no sítio ativo. Sua estrutura cristalográfica revela uma topologia do tipo *triose phosphate isomerase* (TIM) barril-like β -(β/α)₆- β na qual a primeira fita- β é antiparalela às outras sete (Figura 5A)⁴⁰. Acreditava-se até pouco tempo que ao contrário dos domínios GGDEFs, os domínios EALs poderiam catalisar a reação como um monômero, já que necessita-se somente de um domínio para ligar uma molécula de c-di-GMP. Entretanto, um trabalho publicado no ano passado mostra que o domínio EAL de YahA de *Escherichia coli* está em equilíbrio monômero-dímero e a ligação à molécula de c-di-GMP induz o deslocamento do equilíbrio em direção ao estado dimerizado. Através de estruturas cristalográficas e mutações sítio dirigidas, os autores deste trabalho provaram que a enzima só possui atividade de fosfodiesterase quando na forma de um homodímero. Acredita-se que este mecanismo tenha surgido como mecanismo de controle da atividade de fosfodiesterase, pois dessa forma, qualquer domínio regulatório que controlasse a dimerização do domínio EAL poderia ativar ou inativar a enzima (Figura 5B)⁴¹. Praticamente todos os relatos de atividade de domínios EAL envolvem a existência de um dímero ou oligômeros, o que nos permite caracterizar esse mecanismo como geral^{39; 40; 42}. O motivo DFG(T/A)GYSS presente em uma região de *loop*, chamada de *loop 6*, possui papel importante nesta dimerização e consequentemente na atividade enzimática, o que leva proteínas que não possuem esta região conservada a não serem cataliticamente ativas⁴³.

Figura 5. Domínio de degradação EAL. A) Modelo de estrutura cristalográfica de RocR de *Pseudomonas aeruginosa* (3SY8) com sua topologia semelhante à TIM-barril e com o motivo EAL situado na região do sítio ativo marcado em vermelho ⁴⁴. B) Esquema mostrando degradação do c-di-GMP a pGpG por um domínio EAL. Após um estímulo, representado pela estrela vermelha, o domínio EAL inicia a catálise da reação.

O domínio EAL não é capaz de hidrolisar o produto gerado 5'pGpG. Estudos mostram que é necessário outra fosfodiesterase adicional para gerar duas moléculas de GMP que serão reciclados para novas produções de GTP ^{45; 46}.

O domínio EAL não é o único conhecido como responsável por degradar o c-di-GMP. Através de análises de bioinformática foram observados domínios protéicos que estavam frequentemente juntos com domínios GGDEF e que fazem parte de uma grande família de hidrolases de substratos diversos, chamada HD. Esses domínios possuem os resíduos His-Asp conservados e após uma separação de aproximadamente 60 resíduos, possuem o motivo Gly-Tyr-Pro conservado, sendo assim denominados de HD-GYP ²⁹. Diferentemente do domínio EAL, o HD-GYP consegue converter o c-di-GMP a duas moléculas de GMP, não necessitando de uma fosfodiesterase adicional ⁴⁷. Conhece-se muito pouco desta classe de enzimas. Somente em 2014 foi resolvida uma estrutura deste domínio ativo mostrando que ele possui uma topologia similar a

da família HD com um cerne constituído de 5 alfa-hélices onde se situam os resíduos do sítio ativo e mais duas alfa-hélices adicionais no C-terminal que não são encontradas em outras HD. Foi revelado ainda um novo tipo de sítio catalítico composto de três íons de Fe^{2+} ⁴⁸. Das enzimas metabolizadoras de c-di-GMP esta é a que menos se conhece até o momento (Figura 6).

Figura 6. Modelo da estrutura cristalográfica de um domínio HD-GYP da proteína PmGH de *Persephonella marina* (PDBID:4MCW). O novo sítio de ligação trinuclear de Fe^{2+} envolvido na catálise e reconhecimento de c-di-GMP é evidenciado⁴⁸.

Em um trabalho do ex-aluno de doutorado do nosso grupo, Maxuel Andrade, foi revelado que a proteína RpfG de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* que possui um domínio HD-GYP e faz parte da comunicação bacteriana por meio da molécula de *quorum sensing* DSF (*diffusible signaling factor*) interage com uma série de proteínas contendo domínio GGDEF, revelando pela primeira vez uma ligação direta entre vias de quorum sensing e do c-di-GMP³.

1.2.3. Transição motilidade-sessilidade, o paradigma da sinalização por c-di-GMP

Em 2004, Römling e colaboradores realizaram um trabalho em que super-expressaram diguanilato ciclases e fosfodiesterases em cepas de *Salmonella Typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* e observaram fenótipos semelhantes ⁴⁹. Enquanto altos níveis de c-di-GMP provocados pela super-expressão de proteínas com domínio GGDEF resultam em uma diminuição da motilidade, produção de celulose e outros componentes da matriz levando à formação de biofilme, a super-expressão de proteínas com domínio EAL levava a uma diminuição nos níveis de c-di-GMP provocando um aumento na motilidade bacteriana. Assim, o c-di-GMP foi proposto como sendo um regulador da transição sessilidade-motilidade bacteriana, também conhecido como um modulador do estilo de vida bacteriano (Figura 7).

Figura 7. Paradigma da sinalização por c-di-GMP. Aumento dos níveis intracelulares do segundo mensageiro levam a transição de um estado móvel para um de formação de biofilme.

A produção de celulose pelo c-di-GMP descoberta por Benziman na década de 80 era somente a ponta do *iceberg* dos efeitos provocados por este segundo mensageiro (a celulose é um importante componente do biofilme de algumas bactérias). Cada vez mais, diguanilato ciclases e fosfodiesterases de c-di-GMP foram sendo descobertas em novos genomas sequenciados, sendo encontradas nos principais filos bacterianos o que caracteriza este segundo mensageiro como universal ⁵⁰. Além disso, foi encontrada uma diguanilato ciclase em *Dictyostelium discoideum*, uma ameba de vida livre, que possui um mecanismo de diferenciação celular regulado por c-di-GMP. Até o momento, é o único eucarioto conhecido que possui sinalização por c-di-GMP ⁵¹. Não foram encontradas diguanilato ciclases e fosfodiesterases em arqueobactérias.

O paradigma da sinalização por c-di-GMP denota que altos níveis do dinucleotídeo cíclico induzem a bactéria a um estado sésil, enquanto baixos níveis ativam a motilidade. Mas a sinalização por este mensageiro muitas vezes não fica presa somente a essa regra. Em *Caulobacter crescentus*, por exemplo, o c-di-GMP está envolvido com a progressão do ciclo celular ⁵², em *Xanthomonas campestris* e *Vibrio cholerae* com a virulência ^{53; 54}, em *Pseudomonas aeruginosa* com a resistência a antibiótico e regulação da expressão de sistemas de secreção ^{55; 56}.

1.2.4. Sentindo o c-di-GMP, moléculas receptoras intracelulares.

O controle da produção e degradação do c-di-GMP é feito por proteínas GGDEF, EAL e HD-GYP, mas para exercer os seus efeitos, os níveis de c-di-GMP precisam ser sentidos por receptores específicos intracelulares, que por sua vez transmitem sinais para as chamadas

moléculas efetoras. Os receptores e efetores podem ser moléculas diferentes ou simplesmente domínios diferentes da mesma proteína.

Existem múltiplas famílias proteicas que podem atuar como receptores para c-di-GMP. Uma das mais importantes são as proteínas com domínios PilZ ⁵⁷. Esse domínio recebe esse nome devido à participação de uma dessas proteínas na formação do pilus tipo IV bacteriana, uma estrutura essencial na motilidade do tipo *twitching* ⁵⁸. PilZ também é o domínio que está presente na subunidade da celulose sintase sendo responsável por ativar a produção de celulose ao se ligar ao c-di-GMP. Em *E. coli*, a proteína YcgR, que possui um domínio PilZ, ao se ligar c-di-GMP muda a forma de interação com MotA, uma proteína da base do motor flagelar bacteriano. Esta mudança faz com que a rotação do flagelo diminua ou que passe a girar no sentido anti-horário, ao invés do sentido horário, o que leva a uma mudança de direção e diminuição da motilidade bacteriana ⁵⁹.

Ensaio de ligação do segundo mensageiro com domínios PilZ mostraram uma afinidade da ordem de submicromolar, o que é compatível com as concentrações de c-di-GMP intracelulares ^{60; 61}. Essa alta especificidade e grande ocorrência deste domínio nos genomas bacterianos qualifica o domínio PilZ como um dos principais receptores para o c-di-GMP que pode modular diversas funções na célula, por interações proteína-proteína ou por transmitir por alterações alostéricas para domínios adjacentes (Figura 8).

Figura 8. Mecanismos de atuação de domínios PilZ. Domínios PilZ podem modular a atividade de proteínas através de interações ou de um domínio adjacente por alterações alostéricas.

De outro modo dos domínios PilZ, algumas proteínas receptoras de c-di-GMP funcionam como fatores de transcrição. É o caso de FleQ e VpsR de *P. aeruginosa* e *V. cholerae*, respectivamente, que pertencem à família de fatores de transcrição NtrC^{62; 63}. Interessantemente, em *Xanthomonas campestris* foi descoberta uma proteína que faz parte da família da CAP (*catabolite activator protein*) que, ao contrário de se ligar a cAMP, se liga ao c-di-GMP e regula transcrição de alguns genes relacionados à virulência⁵³. Em *Vibrio cholerae*, a proteína VpsT possui um domínio regulador de resposta (REC ou CheY) que, ao invés de participar numa reação de transfosforilização com uma histidina quinase cognata como normalmente ocorre, se liga ao c-di-GMP, se dimeriza e modula a transcrição de genes envolvidos na formação de biofilme através do seu domínio de ligação a DNA⁶⁴ (Figura 9).

Figura 9. Receptor de c-di-GMP atuando como fator de transcrição. O c-di-GMP funciona como uma fosforilação no domínio REC e induz uma mudança do estado de oligomerização de VpsT de *Vibrio cholerae* que por sua vez altera a expressão gênica ⁶⁴.

Outros importantes receptores para o c-di-GMP foram descobertos a partir da observação de que muitas proteínas com domínios de fosfodiesterases de c-di-GMP (EAL e HD-GYP) não possuíam todos os resíduos necessários para a catálise em seu sítio ativo, este fato fez com que pesquisadores se perguntassem se o domínio poderia ter perdido a capacidade de metabolizar o c-di-GMP, mas retido a função de ligação, tornando-o um novo receptor. Chamamos esses domínios de degenerados. Esse é o caso de FimX, uma proteína caracterizada pela ex-aluna de

doutorado do nosso grupo Cristiane Guzzo e por outros grupos, que possui um domínio EAL que se tornou um receptor de c-di-GMP. Como PilZ, FimX também atua como um regulador do pilus tipo IV ^{65; 66}. FimX interage com um domínio PilZ que por sua vez interage com PilB, uma ATPase que dá energia ao sistema para a projeção do pilus em superfícies sólidas ou semi-sólidas ^{67; 68}. O mecanismo de regulação do c-di-GMP no sistema não é conhecido, visto que FimX parece interagir com PilZ estando ou não ligada a este segundo mensageiro (Figura 10).

Figura 10. Regulação do pilus tipo IV pela interação de FimX, PilZ e PilB. Adaptado de Guzzo et. al, 2013 ⁶⁷.

Domínios GGDEFs, tanto os ativos quanto os degenerados também podem se tornar receptores de c-di-GMP. O sítio ativo pode ter perdido a capacidade de sintetizar o segundo mensageiro através de GTP, mas o sítio inibitório (sítio I, Figura 4) pode ter se mantido intacto e dessa forma funcionar como um receptor. De fato, isso acontece com PopA de *Caulobacter crescentus*, uma GGDEF degenerada que reteve o sítio I e com PelD de *P. aeruginosa* que também se tornou um receptor, embora PelD demorou a ser reconhecida como um membro da

família GGDEF tamanha é a divergência de estrutura primária^{69; 70}. Acredita-se que PelD ao ligar c-di-GMP sofre uma mudança conformacional e passa a ativar um complexo na membrana envolvido na produção de exopolissacarídeos importantes na estrutura do biofilme de *Pseudomonas*⁷¹.

Ultimamente, foram empregadas novas técnicas que consistem em imobilizar o c-di-GMP em resinas de afinidade e aplicar um extrato de lisado bacteriano para isolar novos receptores. Após eluição com gradiente de pH e subsequente análise através de proteólise e espectrometria de massas, consegue-se identificar proteínas que interagem com c-di-GMP. Essa abordagem permitiu encontrar novos alvos, como por exemplo, uma proteína da família YajQ em *Xanthomonas campestris* que possui uma afinidade pelo ligante de aproximadamente 2 μ M, comparável à das proteínas PilZ⁷². Também foi identificado através de uma técnica chamada DRaCALA (*Differential Radial Capillary Action of Ligand Assay*) empregando c-di-GMP marcado com um radioisótopo, um novo domínio chamado GIL (GGDEF I-site Like domain) que possui um motivo RxxD semelhante ao sítio de inibição dos domínios GGDEF.

O c-di-GMP não utiliza somente alvos protéicos como moléculas sensoras. Em 2008 foi revelado que existem *riboswitches* para c-di-GMP. *Riboswitches* são segmentos de RNA mensageiros (mRNA) que são estruturados e podem se ligar a pequenas moléculas que culmina com mudanças na transcrição, tradução e estabilidade do mRNA⁷³. Um *riboswitch* identificado em *Vibrio cholerae* foi denominado GEMM e possui afinidade da ordem de nanomolar pelo c-di-GMP (Figura 11)⁷⁴.

Figura 11. Riboswitch de c-di-GMP. A molécula de RNA de *Vibrio cholerae* (PDBID:3IRW) com o c-di-GMP apontado por uma seta situado na junção entre três dupla-hélices ⁷⁵.

1.2.5. A diversidade dos domínios regulatórios de diguanilato ciclases e fosfodiesterases

Uma das questões mais importantes na sinalização por c-di-GMP é acerca dos sinais que desencadeiam a produção ou degradação do c-di-GMP. Quais são os fatores que levam a alterações nos níveis do segundo mensageiro?

Para responder a essa pergunta é necessário analisar a arquitetura de domínios que compõem as diguanilato ciclases e fosfodiesterases. Diferentemente de outros mensageiros, é comum encontrar em genomas um número muito grande de proteínas envolvidas na sinalização do c-di-GMP, sejam elas metabolizadoras ou receptoras ⁷⁶. Por exemplo, *Vibrio vulnificus* possui 99 destas proteínas, entre proteínas contendo domínios GGDEF, EAL, HD-GYP e PilZ, isso sem contar outras possíveis moléculas efetoras ainda não identificadas (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Complete_Genomes/c-di-GMP.html). E esse número varia muito de bactéria para bactéria, *Escherichia coli* possui 31 dessas proteínas, enquanto a bactéria

intracelular *Rickettsia typhi* possui somente duas. Ao analisarmos os genomas, claramente há uma correlação entre o número destas proteínas e a capacidade da bactéria em colonizar vários ambientes, ou ambientes sujeitos à maiores variações de condições ⁷⁷. A respeito disso, é razoável imaginar que as regiões acessórias das proteínas GGDEF, EAL e HD-GYP possam sentir variações ambientais ou fisiológicas para iniciar a síntese ou a degradação.

Cerca de 50% de todas as proteínas com domínios GGDEF e EAL possuem predição de hélices transmembranares ou algum tipo de peptídeo sinal, o que indica que a localização pode ser uma importante forma de controle da atividade ⁷⁶. Além disso, uma parte significativa dessas proteínas podem possuir domínios voltados para o periplasma ou para o meio extracelular.

Os domínios acessórios mais comuns presentes em proteínas GGDEF, EAL e HD-GYP são PAS, GAF, REC e HAMP ⁷⁶: i) Os domínios PAS são domínios sensores presentes em proteínas sinalizadoras, desde bactérias até mamíferos. São domínios que se divergem enormemente em sequência primária, mas mantém uma topologia característica e frequentemente estão ligadas a cofatores tais como heme e FAD (flavina adenina dinucleotídeo) podendo sentir pequenas moléculas ⁷⁸. Esse é o caso de Ec_Dos, uma proteína com domínio PAS-EAL de *E. coli* que possui sua atividade de fosfodiesterase aumentada quando o domínio PAS se liga a oxigênio, o que leva a bactéria a ficar mais móvel nessa condição ⁷⁹; ii) Os domínios GAF também são encontrados em uma variedade de organismos e possuem uma topologia similar ao do domínio PAS, podendo ligar cofatores ou nucleotídeos cíclicos ⁸⁰. Na cianobactéria um domínio GAF funciona como sensor de luz azul e ativa a atividade de diguanilato ciclase do domínio GGDEF adjacente ⁸¹. iii) O domínio REC é frequentemente encontrado em sistemas de dois componentes e recebe um grupo fosfato da sua histidina kinase cognata após esta ser ativada por um estímulo externo. Normalmente domínios REC fazem parte de proteínas que também possuem domínios de ligação a DNA (e por isso controlam a transcrição gênica) ⁸² ou domínios com atividade

enzimática. PleD de *Caulobacter crescentus* possui uma arquitetura REC-REC-GGDEF que após sofrer fosforilação (em um dos domínios REC) se dimeriza favorecendo o encontro dos domínios GGDEF e subsequente produção de c-di-GMP³⁵. iv) Domínios HAMP frequentemente estão presentes em proteínas GGDEF e EAL quando estas estão presas à membrana e possuem uma porção periplasmática. O domínio HAMP é responsável por fazer a ligação e transdução de sinais através de uma face para outra da membrana, sendo muito comum também em sistemas de dois componentes e proteínas envolvidas em quimiotaxia (Figura 12)⁸³.

Figura 12. Domínios acessórios mais comuns encontrados em proteínas envolvidas em vias de c-di-GMP. Domínios PAS, GAF, e REC que são responsáveis por sentir sinais e domínio HAMP que transmite informações entre domínios separados por membranas.

Pseudomonas fluorescens, por exemplo, possui uma proteína chamada de LapD que tem a arquitetura de domínios HAMP-GGDEF-EAL, em que os domínios GGDEF e EAL são enzimaticamente inativos. Quando os níveis de c-di-GMP estão altos dentro da célula seu domínio EAL se liga ao c-di-GMP sem hidrolizá-lo. Esse processo gera uma mudança

conformacional em toda a proteína que é transmitida via domínio HAMP para a porção que fica localizada no periplasma da bactéria. Esse domínio passa então a recrutar uma protease periplasmática que nessa circunstância deixa de degradar a adesina LapA. LapA uma vez íntegra, é fundamental para a formação do biofilme desta bactéria (Figura 13) ⁸⁴.

Figura 13. Regulação do biofilme de *Pseudomonas fluorescens* pela proteína LapD. Em situações de carência de fosfato, há pouco c-di-GMP na célula devido à ação de uma fosfodiesterase RapA. No periplasma, a protease LapG degrada a adesina LapA inibindo assim a formação do biofilme. Em situações de alta de fosfato, diguanilato ciclasas sintetizam c-di-GMP que por sua vez se liga no domínio inativo EAL da proteína GGDEF-EAL, LapD. Consequentemente, LapD sofre uma mudança conformacional que é transmitida ao seu domínio periplasmático que passa a recrutar a protease LapG, deixando a adesina LapA livre para contribuir para a formação do biofilme. Retirado de Navarro et. al ⁸⁴.

1.2.6. GGDEF-EAL, uma arquitetura muito comum em proteínas da via de c-di-GMP.

Uma das coisas que mais chama a atenção na sinalização por c-di-GMP é o fato de que cerca de 50% de todas as diguanilato ciclases e fosfodiesterases de c-di-GMP possuem ambos os domínios GGDEF-EAL na mesma cadeia polipeptídica ⁷⁶. Dessa forma, 4 diferentes cenários podem existir para estas proteínas: (i) ambos os domínios serem cataliticamente ativos; (ii) ambos os domínios serem cataliticamente inativos; (iii) o domínio diguanilato ciclase ser inativo e o de fosfodiesterase ser ativo; e por fim (iv) o domínio de diguanilato ciclase ser ativo e o de fosfodiesterase inativo. Um trabalho que investigou, usando ferramentas de bioinformática, a conservação de resíduos no sítio ativo de mais de quase 4000 destas proteínas presentes nos bancos de dados, mostrou que um pouco mais de metade delas (55%), apresenta ambos os sítios ativos conservados, portanto, possivelmente apresentando na mesma proteína a função de síntese e degradação ⁷⁶. Isto levanta perguntas importantes acerca do mecanismo funcional das GGDEF-EAL. Como funciona a intercomunicação entre esses dois domínios para que não tenham atividades opostas em um mesmo momento? Esses domínios devem coordenar suas atividades para que não haja desperdício energético ao gerar um ciclo vicioso de produção e degradação de c-di-GMP. Existem fatores externos para controlar a produção e/ou degradação do c-di-GMP, ou existe uma regulação intrínseca destes domínios?

Quando do início do desenvolvimento deste trabalho, não havia sequer nenhuma estrutura cristalográfica de uma proteína com os dois domínios GGDEF-EAL, somente domínios GGDEF e EAL separados. Navarro et. al, em 2009 ⁶⁵ havia cristalizado um fragmento de FimX de *P. aeruginosa* contendo os dois domínios mas não foi observada densidade eletrônica para o domínio GGDEF, o que indica que todo o domínio está bem flexível, embora a proteína tenha cristalizado. O mesmo foi observado em FimX de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (somente 30%

idêntico ao seu homólogo de *P. aeruginosa*) cristalizada pelo aluno de doutorado Edgar Llontop do nosso grupo (dados não publicados). Somente em 2011 a primeira estrutura de uma proteína GGDEF-EAL foi resolvida, a de LapD, permanecendo até o momento como a mais bem estudada desse tipo de proteínas. No final de 2014 a segunda estrutura de uma GGDEF-EAL foi depositada, a proteína MorA de *P. aeruginosa* que possui o domínio de síntese e degradação conservados. Foi mostrado que para possuir atividade de fosfodiesterase ativa essa proteína sofre uma mudança conformacional no motivo conservado DDFGTGYSS do domínio EAL trazendo-o para a proximidade do sítio ativo e favorecendo a dimerização por meio dos resíduos Tyr-Ser⁸⁵. Não se conhece a regulação da atividade do domínio GGDEF para esta enzima e nem como funcionaria outras GGDEF-EAL no contexto de domínios adicionais, como PAS, e regiões transmembranares. São necessários mais estudos sobre as proteínas GGDEF-EAL, tão recorrentes nos genomas bacterianos.

1.3.O fitopatógeno *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

Xanthomonas é um gênero de bactérias gram-negativas pertencentes à classe das Gamaproteobactérias e que possuem colônias bem características devido à presença de um pigmento amarelo conhecido como xantomonadina (*xanthos* que vem do grego significa amarelo)⁸⁶. As colônias também apresentam aspecto mucóide devido à presença de exopolissacarídeos, sendo o principal deles a goma xantana, usada em vários processos e produtos industriais, tais como molhos para saladas, sorvetes e pastas de dente. Fazem parte do gênero cerca de 30 espécies que juntas infectam aproximadamente 400 diferentes plantas, incluindo algumas de grande importância econômica como o arroz e a laranja^{87; 88}. *Xanthomonas* possuem geralmente

de 0,4 a 0,7 μM de extensão, um único flagelo polar, são aeróbicas obrigatórias com um crescimento ótimo entre 25 e 30 °C (Figura 14) ^{89; 90}.

Figura 14. A) Placa de colônias de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em meio nutritivo com seu aspecto mucóide ⁹¹. B) Micrografia de transmissão de célula de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* com seu flagelo polar ⁹².

Cada espécie infecta um tipo específico de planta e mesmo dentro de cada espécie existem diferentes patovares (pv) que também possuem especificidade para um tipo de planta ou tecido vegetal a ser colonizado. Por exemplo, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* infecta arroz ⁹³, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* infecta plantas brassicaceas (couve, repolho) ⁹⁴, *X. euvesicatoria* infecta pimenta e tomate ⁹⁵, *X. axonopodis* pv. *malvacearum* infecta algodão ⁹⁶ e *X. citri* frutas cítricas, causando o cancro cítrico, uma importante doença que acomete cultivos ao redor do mundo ⁸⁹.

1.3.1. O cancro cítrico, doença causada por *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

Xanthomonas citri subsp. *citri* (Xac), antes conhecida como *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, infecta a planta hospedeira após entrar através dos estômatos, hidatódios ou feridas. *X. citri*

coloniza o parênquima da folha e aproximadamente após 10 dias de infecção pequenas lesões surgem, tornam-se proeminentes, marrons escuras e frequentemente com um halo clorótico ⁹⁷. Os sintomas também aparecem de forma similar nos caules, galhos e frutos, fazendo estes últimos perder seu valor comercial (Figura 15). Podem ser acometida pela doença plantas de laranja, limão, tangerina, e lima.

Figura 15. Doença do cancro cítrico em plantas cítricas. A) Folha apresentando sintomas do cancro cítrico com erupções e clorose ao redor ⁹¹. B) Galho apresentando erupções causadas em decorrência da doença ⁹¹. C) Fruto com sintomas do cancro cítrico que eventualmente leva à ruptura da casca ⁹¹. D) Estômato de uma folha apresentando *Xanthomonas citri* subsp. *citri* após 5 dias de infecção ⁸⁹.

Quando há umidade na superfície da lesão, as bactérias são desprendidas da planta e por efeito de chuvas, ventos e ação humana podem contaminar novas árvores. Provavelmente, outras formas bem comuns de espalhamento da doença são através de sementes contaminadas e do uso de solo com bactérias, visto que *Xanthomonas* podem viver no solo associadas com tecidos de

plantas mortas^{89; 98}. A larva minadora de citrus (*Phyllocnistis citrella*) pode ser um fator que contribui para o aumento da transmissão, visto que esse inseto deixa lesões na folha o que torna a planta mais suscetível à infecção⁹⁹.

O cancro cítrico surgiu no continente asiático, região nativa das frutas cítricas e posteriormente foi espalhado para ilhas do Japão, Oceania, Estados Unidos e América do Sul⁹¹. No Brasil, a doença foi identificada pela primeira vez no estado de São Paulo na década de 50, se espalhando por outros estados até ser considerada endêmica. Durante muitos anos foi adotada como forma de erradicação da doença no Brasil a destruição de todas as plantas em um raio de 30 metros da planta infectada. Hoje, este processo foi descontinuado e agora somente a planta infectada é destruída sendo borrifada solução de 0,1% de cobre metálico em plantas dentro de um raio de 30 metros. Esses procedimentos diminuem a incidência, mas não se mostraram eficazes para a completa erradicação da doença¹⁰⁰.

O Brasil os Estados Unidos são os maiores produtores mundiais de laranja sendo que o Brasil possui mais de um milhão de hectares de cultivo de frutas cítricas e é responsável por cerca de 50% da produção mundial de suco de laranja concentrado, respondendo por 80% da exportação mundial. Este mercado gera entre 1,5 bilhão a 2,5 bilhões de dólares todos os anos ocupando cerca de 230 mil empregos diretos. Esses dados mostram a importância deste segmento para economia brasileira¹⁰¹.

Na última década, o Brasil perdeu cerca de 40 milhões de árvores causando grandes prejuízos econômicos devido à três principais doenças: Cancro cítrico (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*), clorose variegada dos citros (*Xylella fastidiosa*) e *greening* (*Candidatus Liberibacter spp*), esta última ainda bem desconhecida pelos pesquisadores e que hoje é a principal doença em pomares paulistas, tendo afetado em 2012 aproximadamente 7 % das plantas¹⁰⁰. Em 2012 o cancro cítrico também atingiu seu maior índice de plantas contaminadas desde seu primeiro relato

na década de 50, cerca de 1,4% dos pomares estavam infectados, chegando até quase 12% em algumas regiões do estado de São Paulo ^{100; 102}.

1.3.2. O genoma de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e fatores de patogenicidade em *Xanthomonas*.

O genoma de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* subsp. *citri* (*Xanthomonas axonopodis* pv *citri* cepa 306; *Xac*) foi completamente sequenciado no Brasil e publicado no ano de 2002 ¹⁰³. *X. citri* possui um cromossomo circular de 5,2Mb e dois plasmídeos de 34 e 65 Kb. Após a anotação foram reveladas 4313 ORFs (open reading frames) sendo que 37% codificavam para proteínas hipotéticas (de função desconhecida). Os principais fatores de virulência relacionados à fitopatógenos são os sistemas de secreção II e III. Em *Xac* o sistema de secreção do tipo III injeta efetores de virulência dentro da célula hospedeira inibindo a resposta da planta ¹⁰⁴. A deleção dos genes do locus que codifica para o sistema de secreção do tipo III, chamado de *hrp* (*Hypersensitive Response and Pathogenicity*), abole completamente o surgimento do cancro cítrico ¹⁰⁵. *X. citri* também possui um sistema de secreção do tipo IV que não tem função na virulência ¹⁰⁶. Diorge Souza, um pos-doc do nosso grupo mostrou que ele é usado para matar outras espécies de bactérias ao injetar toxinas em células-alvo (trabalho no prelo).

O segundo mensageiro c-di-GMP também têm se mostrado importante na virulência de *Xanthomonas*. Foram identificados 13 genes em *Xanthomonas campestris* que codificam domínios HD-GYP, EAL ou GGDEF e seus mutantes são deficientes em causar doença em rabanete ¹⁰⁷. Ainda em *Xanthomonas campestris* foi identificado 4 genes codificantes para proteínas com domínios PilZ, e também através de mutações pôde-se comprovar que três delas provocam uma diminuição da virulência, e ainda podem reduzir a motilidade ou afetar a

produção de enzimas extracelulares ¹⁰⁸. Além disso, mais recentemente foi identificada uma diguanilato ciclase que aumenta a produção de c-di-GMP após ligação a GMP cíclico, produzida por uma guanilato ciclase codificada pelo mesmo *operon*. O duplo mutante nestes genes também tem um efeito na virulência de *X. campestris*, sendo a primeira vez que é reportada uma interação entre as vias de cGMP e c-di-GMP ²⁰.

Em um trabalho do nosso grupo, foi mostrada pela primeira vez uma ligação direta entre a via de sinalização deste segundo mensageiro e o *quorum-sensing* (comunicação bacteriana) mediado pela molécula difusora DSF (*diffusible signal factor*). Neste trabalho, a proteína RpfG, que faz parte do sistema de sinalização do DSF, mostrou-se interagir com 9 diferentes proteínas contendo domínios GGDEFs, o que pode ser importante para regular a produção de c-di-GMP por essas diguanilato ciclases ³. Em dois outros trabalhos, nosso grupo mostrou as bases importantes da interação entre uma proteína com domínio PilZ (XAC1133) e FimX (XAC2398), uma GGDEF-EAL. Através da estrutura do complexo ternário PilZ-FimX-c-di-GMP além de outros experimentos foram reveladas importantes pistas sobre o funcionamento do pilus tipo IV ^{109; 110}. Mais recentemente mostramos existir cooperatividade na ligação ao GTP pelo domínio GGDEF de XAC0610, e que essa proteína está envolvida no controle da motilidade e resistência a peróxido de hidrogênio ³⁷. Devido a todos esses fatores e à conservação de vias de c-di-GMP em diferentes organismos, *Xanthomonas* tem servido como modelo para estudar os efeitos deste segundo mensageiro na célula.

Xanthomonas citri subsp. *citri*, objeto de estudo do nosso grupo, possui uma complexa regulação das vias de c-di-GMP, com 41 proteínas que possuem os domínios GGDEF, EAL HD-GYP e PilZ codificadas pelo genoma, sendo 32 delas proteínas com os domínios GGDEF e EAL o que qualifica este organismo como um interessante modelo para estudar a sinalização deste segundo mensageiro (Figura 16). Um terço dessas proteínas (11) possuem os domínios de

diguanilato ciclase e fosfodiesterase de c-di-GMP (GGDEF-EAL) presentes na mesma cadeia polipeptídica e somente XAC2398 (FimX) foi caracterizada quanto a estrutura e função. Em virtude destes elementos mencionados acima e à carência de estudos sobre as tão ocorrentes proteínas GGDEF-EAL, focamos nessas proteínas para a realização desta tese de doutoramento.

Figura 16. Proteínas com domínios de diguanilato ciclase (GGDEF) e fosfodiesterase de c-di-GMP (EAL) encontradas no genoma de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Realizar um estudo sobre as proteínas GGDEF-EAL e suas relações com as vias de c-di-GMP que controlam certos fenótipos de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, com foco especial na proteína XAC2382 e sua parceira XAC2383.

2.2. Objetivos específicos

- Analisar a estrutura primária de todas as proteínas contendo os domínios GGDEF-EAL presentes no genoma de *X. citri* para realizar predições quanto à atividade de diguanilato ciclase e fosfodiesterase com base na conservação de resíduos importantes para a atividade.
- Clonar, expressar, purificar e realizar tentativas de cristalização de 7 proteínas ou fragmentos de proteínas GGDEF-EAL de *X. citri* (XAC1795, XAC1938, XAC1992, XAC1993, XAC2382, XAC2711, XAC2812) e expressar e purificar e tentar cristalizar outras duas já clonadas em vetor de expressão (XAC0495, XAC1887).
- Avaliar a influência de XAC2382 no controle dos fenótipos motilidade (dos tipos *sliding* e *twitching*), formação de biofilme e virulência através de estudos da cepa nocaute *XACΔ2382*.
- Testar a atividade enzimática de fragmentos de XAC2382 *in vivo* e *in vitro*.
- Realizar ensaios de duplo híbrido em levedura da porção citoplasmática e periplasmática de XAC2382 para identificar possíveis proteínas que interajam.

- Avaliar a importância de cada um dos domínios de XAC2382 no controle da motilidade de *X. citri*.
- Realizar mutações sítio dirigidas em XAC2382 e relacioná-las com a função da proteína.
- Produzir cepa nocaute em *xac2383*, um gene presente no mesmo cluster que *xac2382*, e avaliar fenótipos de motilidade e formação de biofilme.
- Testar a interação entre XAC2383 e a porção periplasmática de XAC2382.
- Resolver a estrutura tridimensional de XAC2383 por cristalografia de raios X e relacionar com sua função.
- Identificar possíveis ligantes de XAC2383.
- Produzir mutante sítio dirigido no sítio de ligação de XAC2383 e avaliar seu efeito na complementação da cepa nocaute em *xac2383*, e seu fenótipo de motilidade.
- Caracterizar uma segunda proteína GGDEF-EAL, XAC0495, através da determinação do seu estado oligomérico e da geração de seu envelope eletrônico por espalhamento de luz a baixo ângulo (SAXS).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Meios de cultivo e linhagens utilizadas

Os seguintes meios de cultura foram utilizados durante o desenvolvimento do trabalho:

- 2xTY: 16 g/L Triptona, 10g/L extrato de levedura, 5 g/L NaCl.
- LB: 10 g/L Triptona, 5 g/L extrato de levedura, 10 g/L NaCl pH 7,5.
- SB: 5 g/L sacarose, 5 g/L extrato de levedura, 5 g/L peptona, 1g/L ácido glutâmico e pH 7,0.
- Meio mínimo para incorporação de selênio-metionina: 6 g/L de Na_2HPO_4 pH 7,35, 3 g/L de KH_2HPO_4 , 0,5 g/L NaCl, 2 mM MgSO_4 , 0,4% glicose, 100 μM CaCl_2 , 1g/L NH_4Cl .
- CircleGrow (Genese) 40 g/L.
- YAPD: Extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2%, adenina 0,008% e quando em meio sólido ágar 1,6%.
- YPD: Extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2%, e quando em meio sólido ágar 1,6%.
- SC: 0,66% de Bases nitrogenadas de leveduras sem aminoácido, 2% de glicose, 2 % de mistura de aminoácidos (300 mg de isoleucina, 1500 mg de valina, 200 mg de arginina, 300 mg de lisina, 200 mg de metionina, 500 mg de fenilalanina, 200 mg de treonina, 300 mg de tirosina, 200 mg de uracila, 1000 mg de ácido glutâmico, 1000 mg de ácido aspártico, 4000 mg de serina, 18 mg de adenina, 60 mg de leucina, 12 mg de histidina e 12 mg de triptofano) acrescida de 0,083% de adenina e uracila, 1,6% ágar (quando meio sólido) e pH 5,6.

Modificações do meio SC foram feitas resultando nos seguintes meios: SC-W (sem triptofano), SC-L (sem leucina), SC-WLH (sem triptofano, leucina e histidina), SC-WLHA (sem triptofano, leucina, histidina e adenina).

Os antibióticos quando necessários foram usados nas seguintes concentrações:

- Ampicilina: 100 µg/µL.
- Kanamicina: 100 µg/µL.
- Espectinomicina: 100 µg/µL para *Escherichia coli* e 150 µg/µL para *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.
- Estreptomicina 100 µg/µL.
- Cloranfenicol 100 µg/µL.
- Gentamicina 10 µg/µL.

A cepa *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (antigamente *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* strain 306; Xac) foi utilizada como selvagem para todos os ensaios desta tese sendo as cepas nocautes construídas a partir desta linhagem. Para a realização dos ensaios Xac foi crescida rotineiramente sob agitação a 30°C a 200 r.p.m em meio 2xTY suplementado com ampicilina (100 µg/µL) (Tabela 1).

Tabela 1. Linhagens utilizadas no presente trabalho.

Linhagens	Características	Referência
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	F Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r $_K^-$, m $_K^+$) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> λ^-	Invitrogen
BL21 DE3	F $^-$ <i>dcm ompT hsdS</i> (r $_B^-$ m $_B^-$) <i>gal</i> λ (DE3)	Novagen
BL21 DE3 RIL	F $^-$ <i>ompT hsdS</i> (r $_B^-$ m $_B^-$) <i>dcm</i> $^+$ Tet R <i>gal</i> λ (DE3) <i>endA</i> Hte [<i>argU ileYleuW</i> Cam R]	Stratagene
BL21 DE3 RP	F $^-$ <i>ompT hsdS</i> (r $_B^-$ m $_B^-$) <i>dcm</i> $^+$ Tet R <i>gal</i> λ (DE3) <i>endA</i> Hte [<i>argU proLC</i> Cam R]	Stratagene
BL21 DE3 pLysS	F $^-$ <i>ompT hsdS_B</i> (r $_B^-$ m $_B^-$) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysS, Cam R	Novagen
BL21 DE3 Star	F $^-$ <i>ompT hsdS_B</i> (r $_B^-$ m $_B^-$) <i>gal dcm rne131</i> (DE3)	Novagen
ArcticExpress DE3	F $^-$ <i>ompT hsdS</i> (r $_B^-$ m $_B^-$) <i>dcm</i> $^+$ Tetr <i>gal</i> λ (DE3) <i>endA</i> Hte [<i>cpn10 cpn60</i> Gent f]	Agilent
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> (r $_K^-$, m $_K^+$) <i>supE44 relA1</i> $^-$ [F' <i>proAB lacI^q Z</i> Δ M15 Tn10(Tet R)]	Stratagene
KC8	<i>hsdR leuB600 trpC9830 pyr::Tn5 hisB463 lacDeltaX74 strA galU galK</i>	Stratagene
<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>		
XACwt (<i>Xac</i> str. 306)	Linhagem selvagem, Ap R	da Silva et. AL (2002) ¹¹¹
XACwt + pBRA	Linhagem selvagem transformada com o vetor pBRA vazio, Ap R , Spec R	Este trabalho ¹⁰³¹⁰³¹⁰³¹⁰³¹⁰³¹⁰³¹⁰³
XACwt + pBRAXac2382	Linhagem selvagem transformada com o vetor pBRA contendo <i>xac2382</i> , Ap R , Spec R	Este trabalho
XAC Δ 2382	<i>Xac</i> str. 306 com o gene <i>xac2382</i> nocauteado, Ap R	Andrade (2011) ¹¹²
XAC Δ 2382 + pBRA	<i>Xac</i> str. 306 com o gene <i>xac2382</i> nocauteado e com o vetor pBRA vazio, Ap R , Spec R	Este trabalho
XAC Δ 2382 + pBRAXac2382 _{full-length}	XAC Δ 2382 complementada com <i>xac2382</i> , Ap R , Spec R	Este trabalho
XAC Δ 2382 + pBRAXac2382 _{198HG446}	XAC Δ 2382 complementada com a construção 198-446 de <i>xac2382</i> em vetor pBRA, Ap R , Spec R	Este trabalho
XAC Δ 2382 + pBRAXac2382 _{198HGE705}	XAC Δ 2382 complementada com a construção 198-705 de <i>xac2382</i> em vetor pBRA, Ap R , Spec R	Este trabalho

Tabela 1. Continuação

<i>XAC</i> Δ2382 + pBRAXac2382 _{269GE705}	<i>XAC</i> Δ2382 complementada com a construção 269-705 de <i>xac2382</i> em vetor pBRA, Ap ^R , Spec ^R	Este trabalho
<i>XAC</i> Δ2382 + pBRAXac2382 _{269G446}	<i>XAC</i> Δ2382 complementada com a construção 269-446 de <i>xac2382</i> em vetor pBRA, Ap ^R , Spec ^R	Este trabalho
<i>XAC</i> Δ2382 + pBRAXac2382 _{446E705}	<i>XAC</i> Δ2382 complementada com a construção 446-705 de <i>xac2382</i> em vetor pBRA, Ap ^R , Spec ^R	Este trabalho
<i>XAC</i> Δ2382 + pBRAXac2382 _{R108A_H111A}	<i>XAC</i> Δ2382 complementada com <i>xac2382</i> contendo mutação em R108A_H111A em vetor pBRA, Ap ^R , Spec ^R	Este trabalho
<i>XAC</i> Δ2382 + pBRAXac2382 _{F259E}	<i>XAC</i> Δ2382 complementada com <i>xac2382</i> contendo mutação em F259E em vetor pBRA, Ap ^R , Spec ^R	Este trabalho
<i>XAC</i> Δ2382 + pBRAXac2382 _{360AAA362}	<i>XAC</i> Δ2382 complementada com <i>xac2382</i> contendo mutação em 360AAA362 em vetor pBRA, Ap ^R , Spec ^R	Este trabalho
<i>XAC</i> Δ2383 + pBRA	<i>Xac</i> str. 306 com o gene <i>xac2383</i> nocauteado e com o vetor pBRA vazio, Ap ^R , Spec ^R	Este trabalho
<i>XAC</i> Δ2383 + pBRAXac2383	<i>Xac</i> str. 306 com o gene <i>xac2383</i> nocauteado e complementado com <i>xac2383</i> em vetor pBRA, Ap ^R , Spec ^R	Este trabalho
<i>XAC</i> Δ2383 + pBRAXac2383 _{152AAA154}	<i>Xac</i> str. 306 com o gene <i>xac2383</i> nocauteado e complementado com <i>xac2383</i> com mutação 152AAA154 em vetor pBRA, Ap ^R , Spec ^R	Este trabalho

3.2. Identificação de domínios GGDEF e EAL em Xac

Inicialmente foram obtidos os perfis hidden Markov models (HMMs) de domínios GGDEF e EAL do servidor HMMER e o proteoma de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* 306 do server KEGG em formato fasta^{103; 113; 114}. O programa HMMER v3.1b1 foi usado utilizando a busca *hmmsearch* e os HMMs de domínios GGDEF e EAL e o proteoma de Xac como input, nos parâmetros padrão do programa.

3.3. Reações de PCR, clonagem e expressão de proteínas.

As reações de PCR foram realizadas utilizando-se 0,5 μ M de oligonucleotídeos *forward* e *reverse*, 300 ng de DNA gênomico de Xac, 200 μ M de cada dNTP (Fermentas), 1,5% DMSO, 1X Phusion GC Buffer (Thermo Scientific) e 1U da enzima Phusion High Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) completando-se para o volume final de 50 μ L com água ultra-pura. A temperatura de anelamento para cada uma das amplificações foi determinada de acordo com a temperatura de *melting* (T_m) de cada par de primers utilizando o programa *GeneRunner* (Tabela 2, 3, 4,5). As amplificações ocorreram após desnaturação inicial a 98°C por 30 segundos, seguido de 30 ciclos de aquecimento a 98°C por 10 segundos, 30 segundos na temperatura T_m de cada primer e 72°C por 30 segundos por kb. Ao final dos ciclos foi feita uma etapa de 72°C por 10 minutos. O produto amplificado foi analisado através de eletroforese em gel de agarose 1 % e purificado através do kit GeneJET PCR Purification (Fermentas).

Os fragmentos amplificados foram digeridos com suas respectivas enzimas de restrição seguindo as especificações dos fabricantes (New England Biolabs e Thermo Scientific) e ligados diretamente nos vetores de expressão pET3a e pET28a (EMD Biosciences) e no vetor induzível

por arabinose pBRA (Figuras 17A e B e 18). As reações de ligação foram realizadas utilizando a enzima T4 DNA Ligase (New England Biolabs) e o produto da reação foi usado para transformar células de *E.coli* DH5 α que foram selecionadas em meio contendo o antibiótico adequado. As colônias que cresceram foram usadas para inocular meio líquido 2xTY com o antibiótico adequado e permitida crescer sob agitação a 37°C por 16 horas e o DNA plasmidial foi extraído utilizando o kit de mini-prep da Fermentas. O sequenciamento dos clones foi feito com base no método de Sanger através do kit ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit III (Applied Biosystems). Foram utilizados os oligonucleotídeos que flanqueiam as regiões MCS (*multiple cloning site*) dos vetores pET3a e pET28a, T7 *promoter* (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') e T7 *terminator* (5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'). Foram utilizados também oligonucleotídeos que pareiam em regiões internas dos próprios genes para o completo sequenciamento de fragmentos que não eram possíveis de serem sequenciados utilizando os primers flaqueadores. A reação foi preparada utilizando 5 μ L de DNA plasmidial, 1 μ L de oligonucleotídeo sense ou antisense (4 pmol), 6 μ L tampão de reação para BigDye, 2 μ L BigDye terminator e água ultra pura para um volume final de 20 μ L. Foi utilizado o termociclador Applied Biosystems GeneAmp 9700 (Life Technologies) utilizando o seguinte procedimento: 96°C por 45 segundos, 50°C por 30 segundos, 60°C por 4 minutos por 35 ciclos. Após a reação, foi adicionado isopropanol 75% e os tubos foram centrifugados por 40 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi retirado e a solução residual foi seca no termociclador a 100°C por 1 minuto. A reação foi protegida da luz e sequenciada no sequenciador automático ABI 377 Perkin-Elmer (Applied Biosystems).

Tabela2. Primers para clonagens de 8 construções de proteínas GGDEF-EAL em vetores pET3a e pET28a.

Primer	Enzima de restrição	Sequência 5'-3'	Tm (°C)	Tamanho (pb)
XAC1795 for ₁	NdeI	TTTTTTT <u>CATATG</u> CCTTCCCTGCCCCGCTC	64,2	1857 (<i>Full-length</i>)
XAC1795 rev ₆₁₈	HindIII	TTTTT <u>AAGCTT</u> GGTTGGTTTGTGGCTGCGCCTAGAC	65,7	
XAC1938 for ₂₇₂	NdeI	CACCCGT <u>CATATG</u> AACCGCATCCTGCTG	64,4	1275 (GGDEF-EAL)
XAC1938 rev ₆₉₈	HindIII	ATATT <u>AAGCTT</u> TCACTGGCCAGGCGGCGC	67,3	
XAC1992 for ₁	NdeI	TTTTTTT <u>CATATG</u> TGGAGCCCCGTAATCCCGCC	64,7	1722 (<i>Full-length</i>)
XAC 1992 rev ₅₇₃	HindIII	TTC <u>AAGCTT</u> CTATTCCCGGCCGTTACGCAACTC	65,6	
XAC1993 for ₁	NdeI	TTTTTTT <u>CATATG</u> GCGTTCACCTTGAGCATTC	59,9	2517 (<i>Full-length</i>)
XAC1993 for ₄₀₈	NdeI	GACCAAT <u>CATATG</u> AACCGCTTCCTGTTG	59,6	
XAC1993 rev ₈₃₈	BamHI	TT <u>GGATCC</u> TCAGTTGGCGATGACCAGAC	63,5	
XAC2382 for ₂₈₅	NdeI	TTTTTTT <u>CATATG</u> ACCAACCGGCTAGGCTTTCG	62,1	1263 (GGDEF-EAL)
XAC2382 rev ₇₀₅	EcoRI	TT <u>GAATTC</u> TCACCCTGCAGCGATCAGCTTGACC	65,8	
XAC2711 for ₃₆₁	NdeI	GACTGTG <u>CATATG</u> AACCGCATCTGG	59,9	1284 (GGDEF-EAL)
XAC2711 rev ₇₈₈	BamHI	TT <u>GGATCC</u> TCATCGCTGCACACCTG	63,0	
XAC2812 for ₂₄₅	NdeI	TTTTTTT <u>CATATG</u> GCGCTGGGCATGGTCAAGTTC	63,9	1638 (GGDEF-EAL)
XAC2812 rev ₇₈₈	BamHI	TT <u>GGATCC</u> TTACCCGGAGACGGCCACCAGC	69,2	

Tabela 3. Primers para clonagens de construções de frações de XAC1795, XAC1887, XAC2382, XAC2383 e XAC2812 em vetor pET28a

Primer	Enzima de restrição	Sequência 5'-3'	Tm (°C)	Tamanho (pb)
XAC1795 for ₁₆₆	NdeI	AAATTATCATATGCGCGTGGAAAACCTGCG	58,7	1362 (GGDEF-EAL)
XAC1795 rev ₃₃₆	EcoRI	TTGAATTC TACTTGCGCTCGTACATGCTCCAC	61,4	513 (GGDEF)
XAC1795 for ₃₃₁	NdeI	TTTTTTTCATATGAGCATGTACGAGCGCAAGCA	63,0	867 (EAL)
XAC1887 for ₂₉₄	NdeI	TTTTTTTCATATGATCCGCCAGCGCGTGC	64,6	1308 (GGDEF-EAL)
XAC1887 rev ₄₆₅	HindIII	TTTAAAGCTTCTAGTCGGAAGTGAAGAAACGGAAG	59,5	516 (GGDEF)
XAC1887 for ₄₆₀	NdeI	GGCTTTTCATATGCGTTTCTTCAGTTCCGACATG	63,8	810 (EAL)
XAC1887 rev ₇₂₈	EcoRI	TGAATTC TTACGGTTGCGCGTCCAGCC	62,5	
XAC2382 for ₂₁₉	NheI	TTTTTTTGCTAGCATGACCCTGGTGGCGCCGATTC	74,0	
XAC2382 for ₂₄₉	NheI	TTTTTTTGCTAGCATGCGCAACGACGAGATCG	67,5	1464 (GGDEF-EAL)
XAC2382 for ₂₆₉	NheI	TTTTTTTGCTAGCATGCACGACCGCGAAGTG	66,0	1374 (GGDEF-EAL)
XAC2382 rev ₄₄₄	EcoRI	TGAATTC TAGGCGGCGCGGCTATAG	66,5	1314 (GGDEF-EAL)
XAC2382 for ₄₅₀	NdeI	TTTTTTTCATATG GTGGAGCGCCGCGTGCA	57,8	534 (GGDEF)
XAC2382 for ₃₇	NdeI	CCGCTTTTCATATGCAGCGCGAAGTG	67,7	771 (EAL)
XAC2382 rev ₁₉₂	EcoRI	TTTGAATTC TCACTTGCCGATGGCGTTGA	58,5	467 (Periplasmático)
			62,1	
XAC2383 for ₃₁	NdeI	TTTTTTTCATATGTCCTCGGTCCTGGTGCTTGG	64,0	839 (XAC2383)
XAC2383 rev ₃₀₉	EcoRI	TTGAATTC TCATTCCACGTGATCCCTGAC	57,5	
XAC2812 for ₃₄₉	NdeI	TTTTTGACATATGCTGGCCGACGAAGTGG	61,6	1323 (GGDEF-EAL)
XAC2812 rev ₅₂₁	EcoRI	GGAATTC TAGTTTTCGTTGAAGCAGCG	54,4	519 (GGDEF)
XAC2812 for ₅₂₀	NdeI	TGTTATT CATATGGAAAACGATCTGGCACTGGCGC	66,5	810 (EAL)

Tabela 4. Primers para clonagens de construções de XAC2382 e XAC2383 em vetor pBRA.

Primer	Enzima de restrição	Sequência 5'-3'	Tm (°C)	Tamanho (pb)
XAC2382 for ₁	EcoRI	TTTTGAATTCATGACTCAGGTGCGCTTCGGCT	66,0	2118 (<i>Full-length</i>) 1527 (HAMP-GGDEF-EAL) 1314 (GGDEF-EAL) 533 (GGDEF) 770 (EAL)
XAC2382 for ₁₉₈	EcoRI	TTTTGAATTCATGTTGCTGGTCCTGCTGGCCG	67,5	
XAC2382 for ₂₆₉	EcoRI	TTTGAATTCATGCACGACCGCGAAGTG	60,0	
XAC2382 for ₄₅₀	EcoRI	TTTGAATTCATGGTGGAGCGCCGCGTGC	60,1	
XAC2382 rev ₄₄₆	XhoI	TTCTCGAGCTAGGCGGCGCGGCTATAGAA	64,9	
XAC2382 rev ₇₀₅	XhoI	TTCTCGAGTCACCCTGCAGCGATCAGC	61,3	
XAC2383 for ₁	NheI	TTTTTGCTAGCATGTCCGTTTTGCGCGGTCT	65,9	930 (<i>Full-length</i>)
XAC2383 rev ₃₀₉	EcoRI	TTGAATTCATTCACGTGATCCCTGAC	57,5

Figura 17. Mapas dos vetores de expressão pET3a (A) e pET28a (B).

Figura 18. Mapa do vetor pBRA mostrando o sítio múltiplo de clonagens, a origem de replicação pBBR1, o gene de resistência a espectinomicina e estreptomicina e o promotor pBAD induzível por arabinose.

Figura 19. Mapa do vetor de clonagem da isca no ensaio de duplo híbrido.

Tabela 5. Primers para clonagens de construções de fragmentos de XAC2382 para em vetor pOBD.

Primer	Enzima de restrição	Sequência 5'-3'	Tm (°C)	Tamanho (pb)
XAC2382 for ₁₉₈	EcoRI	TTTTGAATTCATGTTGCTGGTCCTGCTGGCCG	67,5	1527 (HAMP-GGDEF-EAL) 1314 (GGDEF-EAL) 533 (GGDEF) 770 (EAL)
XAC2382 for ₂₆₉	EcoRI	TTTGAATTCATGCACGACCGCGAAGTG	60,0	
XAC2382 for ₄₅₀	EcoRI	TTTGAATTCATGGTGGAGCGCCGCGTGC	60,1	
XAC2382 rev ₄₄₆	XhoI	TTCTCGAGCTAGGCGGCGGGCTATAGAA	64,9	
XAC2382 rev ₇₀₅	XhoI	TTCTCGAGTCACCCTGCAGCGATCAGC	61,3	467 (Periplasmático)
XAC2382 for ₃₇	EcoRI	TTTTGAATTCATGCAGCGCGAAGTG	56,0	
XAC2382 rev ₁₉₂	XhoI	ATCTCGAGTCAGAACGGCTACCGCAACT	58,7	

3.4.Mutação sítio dirigida

As mutações sítio dirigidas foram produzidas através de amplificação direta utilizando o kit Quickchange Site-Directed Mutagenesis (Stratagene). O protocolo consiste em uma única reação de PCR contendo oligos específicos e o plasmídeo contendo o gene a ser mutado (Tabela 6). A reação continha 5 µL do tampão de reação, 1 µL de DNA Polimerase *Pfu* Turbo, 1 µL dNTP mix (25 mM), 1 µL de oligonucleotídeo sense e antisense (10 pmol), 1 µL de plasmídeo (~50 ng) e água ultra pura para completar um volume final de 50 µL. Foi utilizado o termociclador Applied Biosystems GeneAmp 9700 (Life Technologies) em ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 68°C por 1 minuto por kb do plasmídeo, repetindo por 5 ciclos de repetições. Ao final da reação foi adicionada a enzima DpnI e a reação incubada por 1 hora a 37°C. As reações foram usadas para transformar cepas de *E.coli* XL1-Blue (STRATAGENE) por choque térmico, como descrito na seção de transformação. As colônias que cresceram foram picadas em meio líquido 2xTY com o antibiótico adequado e deixadas em crescimento sob agitação a 37°C por 16 horas e o DNA plasmidial foi extraído utilizando o kit de mini-prep da Fermentas. Os fragmentos foram sequenciados como descrito na seção 3.3 acima.

Tabela 6. Primers para produções de mutações sítio dirigidas de XAC2382 e XAC2383.

Primer	Mutação	Sequência 5'-3'	T _m (°C)	Região da mutação
XAC2382_{R108A_H111A} for	R ₁₀₈ A H ₁₁₁ A	GACCGCCATGGCGCGCTGGTGGCTGACGGCACGCC	83,5	Domínio Periplasmático
XAC2382_{R108A_H111A} rev		GGCGTGCCGTCAGCCACCAGCGCGCCATGGCGGTC	83,5	
XAC2382_{F259E} for	F ₂₅₉ E	CGAGCTGATTTCCGCGGAGGGGCGCATGAGCGAAA	78,24	Domínio HAMP
XAC2382_{F259E} rev		TTTCGCTCATGCGCCCCTCCGCGGAAATCAGCTCG	78,24	
XAC2382₃₆₀AAAEF₃₆₄ for	360GGDEF ₃₆₄	CTGGCGCGCTTCGCCGCGGCTGAGTTCGTGATC	79,29	Domínio GGDEF
XAC2382₃₆₀AAAEF₃₆₄ rev	360AAAEF ₃₆₄	GATCACGAACCTCAGCCGCGGCGAAGCGCGCCAG	79,29	
XAC2383₁₅₂AAA₁₅₄ for	152STS ₁₅₄	TTGCAGAACGCCTCGGCCGCCGCGGCTACCTGCTAC	79,1	Sítio de ligação ao fosfato
XAC2383₁₅₂AAA₁₅₄ rev	152AAA ₁₅₄	GGTAGCAGGTAGCCGGCGGCGGCCGAGGCGTTCTGC	79,1	

3.5. Indução expressão e lise de proteínas

Os vetores de expressão pET3a e pET28a foram transformados em *E. coli* BL21(DE3) quimiocompetentes por choque térmico (2 minutos em banho a 42°C e 5 minutos no gelo). As células foram recuperadas por 50 minutos em banho 37°C em meio 2xTY e plaqueadas em meio LB 1,5% ágar suplementado com 100 µg/µL dos antibióticos ampicilina ou kanamicina. Após 16 horas a 37°C as colônias foram utilizadas para inocular 5 mL de meio líquido 2xTY suplementado com o antibiótico adequado e incubadas sob agitação a 37°C durante a noite. No dia seguinte a bactéria foi diluída na proporção de 1:500 em meio 2xTY com 100 µg/µL de ampicilina ou kanamicina e colocada para crescer sob agitação a 37°C e quando na D.O₆₀₀ de 0,8 a expressão de proteínas foi induzida pela adição de IPTG (*isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside*) (Thermo Scientific) na concentração final de 400 µM por 4 horas.

Após coleta das células por centrifugação, as células foram ressuspensas em 50 mL de solução de 50 mM Tris pH 8, 25% sacarose, 1% glicerol, 0,03% Triton X-100, 0,03% Tween 20 e lisadas usando um aparelho *French Press*. A solução foi submetida à pressão de 15000 psi por 6 vezes. O material lisado foi centrifugado por 1 hora a 16000 rpm no rotor JA-20 uma centrífuga Beckman a 4°C. Alíquotas das frações não-induzida, sobrenadante e *pellet* com adição do tampão de amostra (10% p/v glicerol; 2% SDS p/v; 50 mM Tris HCl pH 6,8, 0,1% bromofenol blue, 1 mM β-mercaptoetanol) foram fervidas por 5 minutos submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE 12% para verificar a solubilidade das proteínas.

3.6.Expressão de proteínas com selenometionina (SeMet)

As bactérias BI21(DE3) transformadas com o plasmídeo pET3a contendo o gene de XAC2383 foram incubadas em 5 mL de meio 2xTY com 100 µg/µL de ampicilina sob agitação a 37°C *overnight*. O pré inoculo foi centrifugado para tirar todo o meio 2xTY e ressuspendido em 1 mL de meio mínimo. Estas células foram transferidas para 500 mL de meio mínimo com 100 µg/µL de ampicilina e deixadas sob agitação a 37°C. Logo após atingir a D.O₆₀₀ de 0,8 foram adicionados os aminoácidos selênio-metionina (60 mg), valina e isoleucina (50 mg), lisina treonina e fenilalanina (100 mg cada). Após 15 minutos as células foram induzidas com IPTG a uma concentração final de 400 µM por 6 horas. Espera-se que após esse procedimento, XAC2383 esteja incorporada com 11 selênio-metioninas.

3.7.Purificação de proteínas com cauda de histidina por cromatografia de afinidade

O extrato lisado e induzido das proteínas com cauda de histidina (XAC2382₂₄₉HG₄₄₆, XAC2382₂₁₉HG₇₀₅, XAC0495) foram aplicados em uma coluna de 5 mL Hi-Trap (GE Healthcare) carregada com níquel e equilibrada em solução 50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl e 10 mM imidazol em um fluxo de 1 mL/min em um sistema AKTA purifier (GE Healthcare). Após lavagem de 5 volumes de coluna para remover as proteínas que não se ligaram à coluna foi aplicado um gradiente de 50 mL de 0-100% de solução 50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl e 500 mM imidazol em 50 minutos. As proteínas eluídas foram coletadas em frações de 5 mL e juntadas as contendo a proteína recombinante. Posteriormente as proteínas foram concentradas

até 10 mL e purificadas em colunas de gel filtração Superdex 75 ou Superdex 200 26/600 de 220 mL no tampão 50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl em fluxo de 0,5 mL/min.

3.8.Purificação de XAC2383

O extrato lisado e clarificado da expressão de XAC2383 (50 mL) foi aplicado em coluna de troca catiônica SP-Sepharose de 55 mL acoplada a um AKTA purifier (GE Healthcare) previamente equilibrada com 50 mM Tris pH 8. O fluxo usado foi de 2 mL/min e um gradiente de 0-100% de tampão 50 mM Tris pH 8, 1 M NaCl em 385 minutos foi usado. As frações foram coletadas de 10 em 10 mL. Devido ao fato da proteína ter cristalizado espontaneamente nos tubos coletores de fração, conseguiu-se obter proteína pura ao coletar os cristais, não sendo necessários passos adicionais de purificação.

3.9.Preparação e transformação de Xac

As células de *Xanthomonas* competentes foram preparadas utilizando 50 mL de meio de cultura *circlegrow* (Genese) e as bactérias crescidas a 30°C até uma D.O.₆₀₀ de 0,5. As células foram então centrifugadas por 10 minutos a 4000 g e ressuspensas em água, sendo o processo repetido 3 vezes. Após a última lavagem o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas no volume de água residual. O plasmídeo (aproximadamente 200 ng) de interesse foi adicionado às células e todo o volume (aproximadamente 200 µL) adicionado em cubetas de eletroporação 0,2 cm (BIO-RAD). A eletroporação foi realizada no aparelho Gene Pulser (BIO-RAD) com os parâmetros de 2 KV, 25 µF e 200 Ohms. As células foram recuperadas no meio 2xTY por 4 horas.

3.10. Produção do nocaute $\Delta XAC2383$

Inicialmente, foram utilizados *primers* para amplificar fragmentos de aproximadamente 1000 pb *upstream* e *downstream* que flanqueiam a região codificadora de XAC2383 (Tabela 7). Estes fragmentos denominados F1-R1 e F2-R2 foram então digeridos com a enzima BamHI cujos sítios se encontram na parte 3' da amplificação F1-R1 e na parte 5' de F2-R2. Estes fragmentos dois fragmentos de 1000 pb foram ligados por 16 horas a 16°C pela enzima T4 Ligase (New England Biolabs) gerando um fragmento de aproximadamente 2000 pb no qual ficou conservado 21 resíduos da proteína na mesma fase de leitura da ORF de *xac2383* (Tabela 8). Este fragmento de 2000 pb foi amplificado utilizando os oligos que pareiam as regiões F1 e R2 foi digerido pelas enzimas de restrição HindIII e EcoRI e clonado no vetor pNPTS138. A clonagem foi confirmada por sequenciamento e clivagem com enzimas de restrição. Este vetor possui múltiplos sítios de clonagem, marcador de resistência a kanamicina e o gene *sacB*, que é usado como seleção no segundo evento de recombinação.

Tabela 7. Primers para a produção da cepa nocaute *XACΔ2383*

Nocaute	Oligo	Sequências 5'-3'	Tm (°C)	Tamanho (pb)
<i>ΔXAC2383</i>	F1 HindIII	TTTTT <u>AAGCTT</u> TTGTTGATACCGCGCAACAGCACATTGCC		
	R1 BamHI	TTTT <u>GGATCC</u> ACACCATCGTAGACCGCGCAAAACGGACAC		1039
	F2 BamHI	TTTT <u>GGATCC</u> GTGCAACGCGTCAGGGATCACGTGGAATGA		1039
	R2 EcoRI	TT <u>GAATTC</u> GAACTGCAGCAAGGCTTCGTCGCCGGCCTCAT		

Tabela 8. Sequência de aminoácidos restantes nas sequências codificadoras de *xac2382* e *xac2383*.

Nocaute	Sequência de aminoácidos restantes
<i>ΔXAC2382</i>	MAHLSHSPMVIAAG
<i>ΔXAC2383</i>	MSVLRGLRWCPWVQRVRDHVE

Clones de Xac obtidos após transformação com o vetor pNPTS138 (Figura 20) contendo a construção produzida em placa com meio LB ágar 1,5% (suplementado com 100 µg/mL de ampicilina e 100 µg/µL de kanamicina) foram plaqueados em duas diferentes placas, uma com meio LB ágar 1,5% com 100 µg/µL de ampicilina e 100 µg/µL de kanamicina e outra com meio LB ágar 1,5% com 100 µg/µL de ampicilina e 100 µg/µL de kanamicina e 5% sacarose. As colônias que cresceram no meio sem sacarose e não cresceram no meio contendo sacarose foram inoculadas em 1 mL de meio líquido 2xTY com 100 µg/µL de ampicilina a 30°C sob agitação por 16 horas. Estas células do pré-inóculo foram plaqueadas em placas LB ágar 1,5% com 100 µg/µL de ampicilina. As colônias que apareceram foram transferidas para crescimento em placas em três diferentes condições: 1) LB 1,5% ágar suplementado com 100 µg/µL de ampicilina e 5% de sacarose; 2) LB 1,5% ágar suplementado com 100 µg/µL de ampicilina, 100 µg/µL de kanamicina e 5% sacarose; 3) LB 1,5% ágar suplementado com 100 µg/µL de kanamicina. As colônias que cresceram na condição 1 são repicadas novamente nas três condições. As colônias que voltaram a crescer somente na condição 1 foram incubadas em meio líquido 2xTY com 100 µg/µL de ampicilina a 30°C por 16 horas e armazenadas com 40% de glicerol no freezer a -80°C.

A confirmação das bactérias nocautes foi realizada a partir da amplificação por PCR utilizando como os oligonucleotídeos F1 e R2. O DNA molde de Xac é obtido picando cada colônia e diluindo em 100 µL de água ultrapura estéril e fervendo por 2 minutos. Deste volume utiliza-se 5 µL para a reação de PCR.

Figura 20. Mapa do vetor suicida pNPTS com resistência a kanamicina.

3.11. Ensaio de motilidade do tipo *twitching*

Este ensaio foi feito de acordo com um trabalho desenvolvido por German Dunger, pós doc do nosso laboratório ⁶⁸. Colônias de *Xac* transformadas com o vetor pBRA crescidas a 30°C por 2 dias em placas de petri em meio LB ágar 1,5% suplementado com 150 µg/mL de espectinomicina (Sigma-Aldrich) foram tocadas com um palito de dente estéril de forma que a ponta ficasse coberta de bactérias. Este palito foi usado para perfurar meio de cultura SB ágar 1,0% suplementado com 150 µg/mL de espectinomicina e 0,2% de arabinose (Sigma-Aldrich) até tocar o fundo da placa por duas vezes em pontos diferentes para cada cepa a ser testada, a fim de constituir uma duplicata experimental. Após 5 dias a 30°C o meio de cultura solidificado foi retirado da placa com o auxílio de uma espátula e a placa lavada com água de forma suave. Solução de cristal violeta 0,2% (Sigma-Aldrich) foi despejada até cobrir o fundo da placa e deixada corando por 20 minutos. Após uma segunda lavagem suave com água, a motilidade do tipo *twitching* pôde ser visualizada pela coloração do cristal violeta. O diâmetro da

movimentação foi medido e a média aritmética calculada. Três experimentos independentes foram usados para o cálculo da motilidade.

3.12. Ensaio de motilidade do tipo *sliding*

Culturas de Xac transformadas com o vetor pBRA foram crescidas por 16 horas a 30°C em meio rico 2xTY com o antibiótico espectinomicina (Sigma-Aldrich) na concentração 150 µg/mL. Após leitura da densidade ótica a 600 nm ($D.O_{600}$) as amostras foram diluídas em meio 2xTY até a $D.O_{600}$ de 0,3. Alíquotas de 3 µL foram então adicionados no centro de uma placa com meio SB 0,5% suplementado com 150 µg/mL de espectinomicina e 0,02% de arabinose (Sigma-Aldrich) e a placa foi incubada com o meio voltado para baixo em repouso por 4 dias. Após este período fotografias foram tiradas.

3.13. Ensaio de formação de biofilme

Culturas de Xac crescidas por 16 horas em meio 2xTY suplementado com 150 µg/mL de espectinomicina tiveram a $D.O_{600}$ determinada e diluída para uma densidade final de 1,0 e um volume final de 2 mL de 2xTY (150 µg/mL de espectinomicina e 0,02% de arabinose) e adicionadas a tubos de ensaio de vidro borossilicato. Após dois dias de repouso a 30°C o meio foi retirado e foi adicionado 2 mL de cristal violeta 0,2% e deixado corar por 20 minutos. Após lavagem suave com água para tirar o cristal violeta não aderido ao biofilme, fotos foram tiradas e a coloração provocada pelo biofilme avaliada.

No ensaio da quantificação de biofilme formado as bactérias crescidas overnight foram diluídas para uma $D.O_{600}$ de 1,0 e para um volume final de 250 µL em meio 2xTY (150 µg/mL de espectinomicina e 0,02% de arabinose), adicionadas em placas de ELISA de 96 poços estéreis

(TPP Techno Plastic Products AG) e deixadas em repouso por 2 dias a 30°C. Após este período o meio bacteriano foi retirado com uma micropipeta e lavado de forma suave com água para tirar o excesso de meio. Então, 300 µL de cristal violeta 0,2% foi adicionado e deixado corar por 20 minutos. Novamente, os poços foram lavados com água para tirar todo o cristal violeta não ligado e posteriormente foi adicionado 250 µL de etanol 70% para eluir o corante que ficou aderido à parede do poço. As placas foram submetidas à leitura de absorbância à 590 nm em um leitor de placas Spectramax Paradigm (Molecular Devices).

3.14. Ensaio de virulência de Xac em laranjeira.

A influência de XAC2382 na virulência de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* foi avaliada através das cepas XAC2382 e tipo selvagem crescidas em meio 2xTY overnight a 30°C a uma densidade ótica de 0,5. As bactérias foram espalhadas por folhas jovens de laranja utilizando uma haste de algodão autoclavada (Jiangsu Suyun Medical Materials Co. Ltd). As plantas foram mantidas em uma sala com temperatura (23-30°C), umidade (58%) e luminosidade controlada (ciclos de luz/escuro de 16/10 horas) e sintomas do cancro cítrico foram observados após 30 dias.

3.15. Duplo híbrido em levedura

O ensaio de duplo híbrido em levedura foi realizado de acordo com protocolo descrito em nosso laboratório ¹¹⁵. Os fragmentos codificando XAC2382₂₁₉HGE₇₀₅ ou XAC2382₃₇PERI₁₉₂ foram clonados no vetor pOBD (Figura 19) foi transformada em *Saccharomyces cerevisiae* da linhagem PJ69-4a (MATa trp1-901 leu2-3, 112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::G11-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ) através de eletroporação ¹¹⁵. A transformação consiste em

crescer a levedura em placas de petri contendo o meio YAPD. Aproximadamente 25 µL de células foram coletadas e lavadas com água autoclavada sendo posteriormente adicionado 240 µL de 50 % PEG 3350, 36 µL de 1 M acetato de lítio, 50 µL de esperma de salmão, 4 µL de DNA plasmidial com o gene de interesse (vetor pOBD) e 30 µL de água. A levedura foi incubada por 30 minutos a 42°C seguida de centrifugação a 6000 r.p.m por 2 minutos. O sobrenadante foi coletado, adicionado a 200 µL de água e incubado a temperatura ambiente por 5 minutos. As leveduras transformadas foram selecionadas em meio SC-W (sem triptofano) e foi feito um teste de auto ativação em meio SC-WH (sem triptofano e histidina) para determinar a concentração de 3-aminotriazol para utilizar nos ensaios posteriores. O 3-aminotriazol é um inibidor da síntese de histidina, usado na triagem. Concentrações crescentes de 3-amino triazol (0 mM, 3 mM, 10 mM, 25 mM e 50 mM) foram utilizadas e a concentração mínima de 3mM foi escolhida por não ter crescido nenhuma colônia em nenhuma das condições.

A levedura transformada com o vetor pOBD contendo a sequência da isca de interesse foi transformada contra uma biblioteca do genoma de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* clonada no vetor pOAD. Após a realização deste procedimento foi verificada a presença de colônias após 14 dias em meio SC-WLH (sem triptofano, leucina e histidina) ³⁰. O vetor pOAD foi selecionado no meio SC-L (sem leucina) e transformado em bactérias da linhagem KC8 (hsdR, leuB600. trpC9830, pyrF:: tn5, hisB463, lacDX74, strA, galU,K) para posteriormente realizar *miniprep* e sequenciamento dos clones ¹¹⁵.

3.16. Atividade de diguanilato ciclase em células (Congo red)

O Congo red é um composto conhecido por ter afinidade à celulose e fímbrias bacterianas. Se há produção de celulose e fímbrias, processo que é regulado por níveis altos de c-diGMP na célula, as colônias coraram-se mais de vermelho. Desta forma, esperamos através do seguinte

ensaio, observar indiretamente a capacidade dos polipeptídeos recombinantes produzir c-diGMP. O volume de 2,5µL de bactérias BL21 (DE3) transformadas com os plasmídeos de interesse a uma densidade ótica de 0,6 foi adicionado às placas contendo meio LB 1,5% com 50mg/L de congo red. Como controle negativo do experimento, foi usado o vetor vazio pET28a. Após 16 horas, a coloração das colônias foi observada.

3.17. Ensaio de atividade diguanilato ciclase e fosfodiesterase

20 µM de XAC2382₂₄₉HG₄₄₆ foi adicionada em solução contendo 2 mM de GTP, 2 mM MgCl₂ ou MnCl₂ no tampão 50 mM Tris pH 8, 10 mM NaCl em um volume final de 100 µL. A reação foi incubada por 16 hrs a 30°C e aplicada em coluna Resource Q de 1 mL (GE Healthcare) conectada a um sistema de purificação ÄKTA (GE Healthcare) utilizando um tampão 10 mM Tris HCl. Os tempos de retenção dos picos eluídos foram comparados com os das amostras padrão GTP e c-di-GMP. Os picos eluídos da coluna foram enviados a um HPLC (Shimadzu) acoplado a um espectrômetro de massas Esquire 3000 Plus (Bruker Daltonics) para identificação dos nucleotídeos GTP e c-di-GMP. Da mesma forma 20 µM de XAC2382₂₄₉HG₄₄₆ incubada com 500uM de c-di-GMP no tampão 50 mM Tris pH 8, 10 mM NaCl com 2 mM MgCl₂ ou MnCl₂ em um volume final de 100 µL foi testada em uma reação *overnight* a 30°C.

3.18. Ensaio de cromatografia de gel filtração analítica

Para os ensaios de gel filtração analítica, foi utilizado o kit de marcadores de peso molecular 12-200kda (Sigma Aldrich) para obter a curva padrão de eluição. Para a análise de XAC2382₂₄₉HG₄₄₆ e XAC0495 foi utilizada a coluna Superdex 200 10/300 GL de 24 mL (GE

Healthcare) sendo utilizado um volume de 100 μ L de amostra, tampão 50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 1mM $MgCl_2$ e um fluxo de 0,5 mL/min. Para as proteínas XAC2382₃₇PERI₁₉₂ e XAC2383 foi utilizada a coluna Superdex 200 26/600 de 220 mL (GE Healthcare) em um volume de 5 mL de amostra, tampão 50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl e um fluxo de 0,5 mL/min.

3.19. Ensaio de interação XAC2382-XAC2383

As construções XAC2383₃₇PERI₁₉₂ clonada em pET28a contendo cauda de histidina e XAC2383 clonada em pET3a sem cauda de histidina foram co-transformadas em células de *E.coli* BL21 DE3, como descrito na seção de transformação, utilizando 5 μ L de cada plasmídeo (250 ng). As células transformadas foram selecionadas em meio contendo os dois antibióticos (100 μ g/ μ L de ampicilina e 100 μ g/ μ L kanamicina) e as proteínas foram induzidas e lisadas conforme descrito na seção indução e lise de bactérias. O extrato celular clarificado foi aplicado em uma coluna Hi-Trap (GE-Healthcare) carregada com níquel e equilibrada com o tampão 50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 10 mM imidazol em um fluxo de 1 mL/minuto. Após lavagem por 10 minutos foi aplicado um gradiente de 0 a 100% de solução 50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl e 500 mM imidazol em um tempo de 50 minutos. As frações foram coletadas em volumes de 5 em 5 mL. As frações que continham bandas correspondentes às massas das duas proteínas foram concentradas para 5 mL e aplicadas na coluna de gel filtração Superdex 200 26/600 em um fluxo de 0,5 mL/min.

3.20. Dicroísmo circular

Dicroísmo circular é uma técnica que consiste na medida da diferença de absorção de luz circularmente polarizada para a esquerda ou para a direita por moléculas quirais. Esta técnica é particularmente útil para estudar a estrutura secundária de proteínas na faixa de comprimento de onda 240-190nm (UV). Assim, realizamos ensaios de desnaturação térmica de XAC0495 monitorando a absorção de luz polarizada a 215nm a cada 3⁰C a uma velocidade de 1⁰C/min em um espectrômetro JASCO 815. O tampão usado foi 20 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl e 1 mM MgCl₂ e 20 µM de XAC0495.

3.21. SAXS (Small-angle X-ray scattering)

Os experimentos foram realizados na linha SAXS1 (LNLS). Foram coletados experimentos com exposição à radiação de raios X de 10 segundos de XAC0495 nas seguintes condições: XAC0495 2,78g/L apo, XAC0495 (2,78g/L) + c-digmp (200 µM) e XAC0495 (2,78g/L) + GTP (1 mM), não sendo detectados danos de radiação para as amostras analisadas. Os tampões foram reduzidos de suas respectivas curvas. A distância do detector foi de 935 mm e os limites de qmin e qmax foram 0,00138 1/Å e 0.4 1/Å respectivamente. O comprimento de onda foi de 1.55 Å onde $q = (4\pi/\lambda) \cdot \sin\theta$ (2θ é o ângulo de espalhamento). As intensidades das curvas em função do ângulo de espalhamento foram processadas com o programa FIT2D ¹¹⁶. As análises das curvas foram realizadas com o pacote de software ATSAS ¹¹⁷. A função de distribuição de distância (p(r)), foi construída a partir da curva de Xac0495 APO com o programa GNOM ¹¹⁸. A partir da p(r) foram gerados 20 envelopes moleculares independentes de Xac0495 com o software DAMMIF ¹¹⁹. O envelope molecular de Xac0495 foi obtido a partir do

mapa de probabilidade dos 20 modelos com os programas DAMAVER e DAMFILT ¹²⁰. Além disso, foi gerado um modelo estrutural por modelagem molecular e a curva de espalhamento de Xac0495 com o programa SAXXTER ¹²¹. O envelope molecular de Xac0495 e o modelo estrutural gerado pelo SAXXTER foram superpostos com o programa SUPCOMB ¹²². A análise do Raio de Giro (Rg), e volume foram feitas a partir da interpretação dos gráficos de Guinier e Porod, respectivamente.

3.22. Cristalização e difração dos cristais obtidos da purificação do complexo XAC2382-XAC2383

Após a purificação do complexo XAC2382-XAC2383 em coluna de gel filtração a solução foi concentrada através de Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter de 3kDa (Millipore) até uma concentração de aproximadamente 5 mg/ml e a pureza foi verificada por eletroforese SDS-PAGE 12%. Foi realizado tentativas de cristalização utilizando os kits Crystal Screen 1 e 2, Index 1 e 2, da Hampton Research. Após duas semanas cristais foram vistos na condição número 38 do kit Crystal Screen 2 que consiste em 0,1 M HEPES sódio pH 7,5 e 1,4 M citrato de sódio tribásico. Os cristais foram difratados no difratômetro com anodo rotatório Rigaku MicroMax-007HR situado na Central Analítica do IQ-USP. A coleta foi realizada sob feixe de nitrogênio gasoso à -180°C e o detector R-axis IV ++ foi colocado a uma distância de 250 mm do cristal com a oscilação de 1° por imagem e um tempo de exposição de 7 minutos. Não foi coletado um conjunto completo para esses cristais.

3.23. Estrutura de XAC2383

Dados coletados a 2,3 Å de resolução no difratômetro com anodo rotatório Rigaku MicroMax-007HR situado na Central Analítica do IQ-USP foram indexados e integrados e escalonados utilizando o programa HKL2000. O arquivo final *.sca* foi convertido para um arquivo *.mtz* utilizando o programa *scalepack2mtz* presente no pacote do programa CCP4i, convertendo intensidades em fatores de estrutura ¹²³. Para resolver o problema das fases, inicialmente foram realizadas tentativas de substituição molecular utilizando o programa *Phaser* com base na estrutura de PhnD de *Escherichia coli* que possui 19% de identidade com XAC2383 ¹²⁴. Após tentativas sem sucesso de determinar as fases por este método, tentamos adicionar metais pesados à solução do cristal para tentar pelo método de substituição isomorfa múltipla (MIR) ¹²⁵. Os seguintes sais de metais pesados foram testados: K₂PtCl₄, K₂PtBr₄, K₂PtCl₆, AuCl₃, HgCl₂, Hg(CN)₂, HgI₂ e PbCl₂. Tampouco foi possível resolver por MIR devido aos cristais se desestabilizarem pela adição de AuCl₃ e por ter alterado as dimensões da célula unitária pelos demais sais de metais. As fases finalmente foram determinadas pela técnica *Single wavelength anomalous dispersion* (SAD). Para isto, cristais de XAC2383 produzidos com o aminoácido selênio-metionina (XAC2383 possui 11 metioninas) foram difratados na linha MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron utilizando raios X com comprimento de onda de 0,979 Å, correspondente ao pico máximo de espalhamento anômalo teórico do átomo de Selênio ¹²⁶. Os dados coletados neste comprimento de onda foram processados no programa HKL2000 e convertidos para um arquivo *.mtz* pelo programa *scalepack2mtz* do pacote de programas CCP4i ¹²⁷. O arquivo *mtz* foi utilizado como *input* pelo programa Autosol do pacote de programa Phenix para determinação das fases e para gerar um modelo tridimensional de XAC2383 ^{128; 129; 130}. Este modelo gerado foi usado para realizar substituição molecular através do programa Phaser de um

conjunto de dados de melhor resolução (1,9 Å)¹²⁴. Este modelo foi refinado através de ciclos alternados do programa Refmac e manualmente através da interface gráfica do Coot^{131; 132}. O modelo foi validado através do programa PROCHECK¹³³. Para gerar os demais modelos de cristais após *soaking*, foi realizada substituição molecular através do programa Phaser.

3.24. Ensaio de *Soaking*

Para o ensaio de *soaking*, cristais únicos foram transferidos para gotas da própria solução que eles se encontravam (50 mM Tris pH 8, ~300 mM NaCl) acrescentadas de 2 mM dos ligantes a serem testados. Os cristais foram deixados por 12 horas a 4°C nesta solução¹³⁰. Para evitar a formação de anéis de gelo durante a difração, antes de congelamento os cristais foram transferidos para gotas da mesma solução que se encontravam acrescentados de 30% de glicerol, que age como um crioprotetor. Rapidamente (após menos de um minuto na solução crioprotetora), os cristais foram transferidos para um goniômetro e congelados sob feixe de nitrogênio gasoso à -180°C.

4. RESULTADOS

4.1. Predição de atividade de proteínas GGDEF-EAL de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

Alguns trabalhos publicados anteriormente usaram a biologia estrutural e mutações sítio dirigidos para tentar identificar os resíduos importantes para a atividade enzimática das proteínas com domínios GGDEF e EAL. No artigo publicado por Malone et. al ¹³⁴, este grupo suíço realizou 76 substituições simples no motivo RYGGEF da diguanilato ciclase WspR de *Pseudomonas fluorescens* e testou a capacidade desses mutantes em provocar o fenótipo de rugosidade da colônia, assim como ocorre com WspR selvagem, quando super-expressas. Foi observado que quase qualquer substituição no motivo GGDEF era suficiente para abolir o fenótipo que está relacionado com a atividade de diguanilato ciclase. Em outro estudo, o mesmo grupo resolveu a estrutura cristalográfica da forma ativa de PleD, uma diguanilato ciclase de *Caulobacter crescentus* ³⁶. Neste modelo, estão revelados os resíduos que participam da ligação aos íons de magnésio (indispensáveis para a atividade) e à base do nucleotídeo. Utilizamos as conclusões destes trabalhos sobre os resíduos importantes para a formação de c-di-GMP para verificar a presença destes nos domínios diguanilato ciclasses de proteínas GGDEF-EAL de Xac para prever suas atividades (Tabela 9). Também verificamos a presença do motivo RXXD (Sítio I) que liga c-di-GMP e inibe a atividade de diguanilato ciclase (Figura 21).

Tabela 9. Resíduos importantes para a atividade de diguanilato ciclase e para a inibição desta atividade por *feedback* negativo. Numeração de acordo com PleD de *Caulobacter crescentus* ³⁶:

Sítio	Resíduo	Função
Sítio Ativo	D ₃₂₇	Coordenação do metal
	E ₃₇₀	Coordenação do metal
	N ₃₃₅	Liga GTP
	D ₃₄₄	Liga GTP
	K ₄₄₂	Liga GTP
	R ₄₄₆	Liga GTP
	G ₃₆₈	Importante na estruturação do β -hairpin do sítio ativo
	E ₃₇₁	Pode ser um acceptor de prótons do 3' hidroxil
	K ₃₃₂	Pode estabilizar o estado de transição do substrato
Sítio Inibitório	³⁵⁹ RXXD ₃₆₂	Liga c-di-GMP e inibe a atividade de diguanilato ciclase

Figura 21. Alinhamento da estrutura primária dos domínios GGDEF de todas as 11 proteínas GGDEF-EAL de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e de PleD de *Caulobacter crescentus*, gerado através do programa MUSCLE¹³⁵. Os triângulos coloridos indicam os resíduos importantes para a atividade de diguanilato ciclase. Em **vermelho**, resíduos responsáveis pela coordenação do metal; em **verde**, resíduos envolvidos na ligação ao GTP; em **azul**, o triângulo que indica a glicina presente na estrutura de um hairpin; em **amarelo**, o acceptor de prótons do 3' hidroxil; e finalmente em **rosa**, o triângulo que indica o resíduo que pode estabilizar o estado de transição do substrato.

De 2008 até o presente momento, diversos estudos estruturais e ensaios enzimáticos de mutantes trouxeram luz ao mecanismo de catálise das fosfodiesterases de c-di-GMP. Através de ensaios enzimáticos e estruturas cristalográficas de TdEAL de *Thiobacillus denitrificans* ⁴⁰, YahA ⁴¹ de *E. coli* e também de ensaios de atividade de RocR ¹³⁶ de *P. aeruginosa*, criamos uma lista de resíduos importantes para a atividade do domínio EAL de proteínas GGDEF-EAL de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Figura 22). A Tabela 10 lista tais resíduos que estão numerados de acordo com a fosfodiesterase RocR:

Tabela 10. Resíduos importantes para a atividade de fosfodiesterase de domínios EAL.

Resíduo	Função
E ₂₆₈	"Ancorador". Serve para interagir com o loop 6 e mantém sua estrutura
K ₃₁₆	Base geral
E ₂₆₅	Liga o Mg ²⁺
D ₂₉₅	Liga o Mg ²⁺
N ₂₃₃	Liga o Mg ²⁺
D ₃₁₈	Liga o Mg ²⁺
D ₂₉₆	Liga o Mg ²⁺
E ₃₅₂	Liga o Mg ²⁺
R ₁₇₉	Ligação do c-di-GMP (oxigênio aniônico do fosfato)
Q ₁₆₁	Ligação do c-di-GMP (porção guanina)

Figura 22. Alinhamento da estrutura primária do domínio EAL de todas as 11 GGDEF-EAL de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e de RocR de *Pseudomonas aeruginosa* gerado através do programa MUSCLE¹³⁵. Os triângulos indicam os resíduos importantes para a atividade de fosfodiesterase. Em **vermelho, os resíduos responsáveis pela coordenação dos metais; em **verde**, os dois resíduos importantes para a ligação do c-di-GMP; em **rosa**, o glutamato ancorador; e em **azul**, a base geral.**

Através desta análise, predizemos as atividades enzimáticas das proteínas GGDEF-EAL de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (resumidas nas Tabelas 11 e 12).

Tabela 11. Predição da atividade de diguanilato ciclase de proteínas GGDEF-EAL de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

Proteína	Predição	I site RXXD	Explicações
XAC0495	Inativa	- RXXS	Motivo GGDEF mutado para NDNSF. É pouco conservado para ser ativo. 1 dos 4 resíduos que ligam a base está mutado.
XAC1795	Inativa	- RXXA	Motivo GGDEF mutado para DPTTF. É pouco conservado para ser ativo. 3 dos 4 resíduos que liga a base estão mutados. D327G envolvido na ligação ao metal.
XAC1887	Inativa	+	D327N e R446G envolvidos na ligação ao metal e à base.
XAC1938	Inativa	- RXXA	D327N envolvido na ligação ao metal. Motivo GGDEF para GADEF. A acaba com a atividade de WspR.
XAC1992	Inativa	+	Motivo GGDEF para GSDEM. S abole a atividade de WspR. 2 dos quatros resíduos que ligam a base estão mutados.
XAC1993	Ativa	- RXXQ	Motivo GGDEF para SDDEF. S e D ainda produzem WspR ativa.
XAC2152	Inativa	- RXXA	Motivo GGDEF para ASMRF. É pouco conservado para ser ativo. Ausência de dois resíduos que coordenam metais
XAC2382	Ativa	- RXXR	GGDEF
XAC2398	Inativa	- HXXS	Motivo GGDEF para GEHSF, S não produz WspR ativa.
XAC2711	Inativa	+	K442G e R446T envolvidos em ligar à base. Motivo GGDEF para GSDEF, S acaba com a atividade de WapR.
XAC2812	Ativa	+	GGDEF

* Os símbolos + e - indicam a conservação do sítio inibitório RXXD

Tabela 12. Predição da atividade de fosfodiesterase de proteínas GGDEF-EAL de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

Proteína	Predição	DFG(T/A)GYSS Loop 6	Resíduos de ligação aos metais	Resíduos de ligação à base	Base Geral K316	Explicações
XAC0495	Inativa	2/8	3/4	2/2	K283R	Loop 6 pouco conservado
XAC1795	Ativa	7/8	4/4	2/2	+	
XAC1887	Ativa	8/8	4/4	2/2	+	
XAC1938	Ativa	7/8	4/4	2/2	+	
XAC1992	Ativa	6/8	4/4	2/2	+	
XAC1993	Ativa	7/8	4/4	2/2	+	
XAC2152	Ativa	6/8	4/4	2/2	+	
XAC2382	Ativa	7/8	4/4	2/2	+	
XAC2398	Inativa	4/8	0/4	2/2	+	Loop 6 pouco conservado. Nenhum dos resíduos de ligação ao metal
XAC2711	Ativa	8/8	4/4	2/2	+	
XAC2812	Ativa	6/8	4/4	2/2	+	

4.2. Expressão de GGDEF-EALs de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

No início do desenvolvimento deste projeto, tínhamos como foco resolver a estrutura tridimensional de uma proteína contendo os domínios GGDEF-EAL de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Havia no banco de dados do pdb estruturas do domínio GGDEF e EAL separadas, mas não se conhecia a estrutura dos dois domínios quando presentes na mesma cadeia polipeptídica. Tendo em vista que praticamente a metade das proteínas com domínios GGDEF e EAL possuem ambos os domínios presentes na mesma proteína⁷⁶, focamos na tentativa de resolver a estrutura tridimensional por cristalografia e para isto clonamos e expressamos o uma série de proteínas de *X. citri* (ou seus fragmentos) contendo os domínios GGDEF-EAL.

Das 11 GGDEF-EALs de *X. citri* escolhemos 7 para trabalhar, excluindo XAC2152 por conter um domínio GGDEF altamente degenerado o que gerava dúvidas sobre a classificação deste domínio. XAC0495 e XAC1887 já haviam sido clonadas pelo ex-aluno de doutorado Maxuel Andrade e XAC2398 pela ex-aluna Cristiane Guzzo.

Inicialmente, 8 construções de 7 diferentes proteínas ou fragmentos de GGDEF-EALs foram realizadas e tiveram a expressão induzida utilizando o vetor de expressão pET3a. Todas as proteínas se localizaram na fração insolúvel após a lise (Figura 23). As construções foram transferidas do vetor pET3a para pET28a, com o objetivo de adicionar cauda de histidina e facilitar o isolamento de uma fração solúvel, ainda que em pequena quantidade, da proteína nativa. Mesmo assim, não foi possível obter proteínas solúveis (dados não mostrados). Tentativas subsequentes de otimização da indução foram realizadas, tais como, expressão em temperaturas mais baixas, diminuição da concentração do indutor IPTG, mudança do tampão de lise, mudança no processo de lise (*French press* ou sonicador), ensaios de renaturação utilizando ureia 8 M e até expressão em cepa BL21(DE3) Arctic a 12°C. O fato de serem proteínas com múltiplos domínios, alguns transmembranares, e que possivelmente interagem com outras moléculas *in vivo*, pode ter contribuído para a falta de solubilidade observada. Quatro dessas proteínas possuem hélices transmembranares, e mesmo utilizando construções sem essas regiões, não detectamos uma fração da proteína recombinante em solução (Tabela 13). Notamos que algumas destas proteínas contêm domínios GAF, PAS ou outros domínios que e podem estar sem seus ligantes naturais, o que pode provocar instabilidade e consequentemente reduzir suas solubilidades^{79; 137; 138}.

A

B

Figura 23. Eletroforese em SDS-PAGE 12% da indução das proteínas em cepa BL21 DE3, de amostras retiradas do sobrenadante e do *pellet*. Canaletas: 1) XAC1795_{full-length} sobrenadante. 2) XAC1795_{full-length} pellet (67,912kDa). 3) XAC2812₂₄₅₋₇₈₈ sobrenadante. 4) XAC2812₂₄₅₋₇₈₈ pellet (60,2kDa). 5) XAC1993_{full-length} sobrenadante. 6) XAC1993_{full-length} pellet (95,1kDa). 7) XAC1993₄₀₈₋₈₃₈ sobrenadante 8) XAC1993₄₀₈₋₈₃₈ pellet (48,1kDa). 9) XAC1992_{full-length} sobrenadante. 10) XAC1992_{full-length} pellet (63,9kDa). 11) XAC1938₂₇₂₋₆₉₈ sobrenadante. 12) XAC1938₂₇₂₋₆₉₈ pellet (46,7kDa). 13) XAC2711₃₆₁₋₇₈₈ sobrenadante. 14) XAC2711₃₆₁₋₇₈₈ pellet. 15) XAC2382₂₈₅₋₇₀₅ sobrenadante (47,1kDa). 16) XAC2382₂₈₅₋₇₀₅ pellet (45,6kDa). B) Arquitetura dos domínios das construções expressas.

Tabela 13. Proteínas GGDEF-EAL de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* que apresentam hélices transmembranares preditas pelo server TMHMM¹³⁹.

Proteína	Nº de aminoácidos totais	Nº de aminoácidos em hélices transmembranares	Nº de hélices transmembranares	Trecho transmembranar
XAC1938	695	158	7	1º(10-28) 2º(35-57) 3º(72-94) 4º(101-123) 5º(138-160) 6º(172-194) 7º(214-236)
XAC2382	705	44	2	1º(10-32) 2º(195-217)
XAC2711	788	42	2	1º(10-32) 2º(274-296)
XAC2812	788	43	2	1º(10-32) 2º(198-220)

Assim sendo, mudamos nossa estratégia e decidimos focar o trabalho em um número menor de proteínas, de forma a realizar o estudo de forma mais profunda com foco na função das GGDEF-EALs, em especial em XAC2382, uma proteína de membrana predita de possuir tanto atividade de diguanilato ciclase quanto de fosfodiesterase em c-di-GMP.

Com o objetivo de estudar mais profundamente XAC2382, foram realizadas mais 5 construções desta proteína, a fim de obter fragmentos solúveis e estudar o papel de cada um dos domínios presentes na cadeia polipeptídica. XAC2382 é uma GGDEF-EAL que possui quatro domínios, totalizando 705 resíduos e 76,8 kDa (Figura 24). De acordo com o programa TMHMM¹³⁹ de predição de hélices transmembranares, XAC2382 possui duas dessas regiões, uma logo no N-terminal do resíduo 10 a 32, e outra do resíduo 195 a 217 (Figura 25A). Entre as duas hélices transmembranares reside uma porção de 162 aminoácidos que estaria localizada no periplasma bacteriano. Esse domínio formado por esses resíduos não possui similaridade de sequência significativa com nenhum domínio caracterizado, sendo portanto anotado como hipotético. A predição de estrutura secundária calculada pelo serve PSIPRED é muito similar à de domínios PAS, que consiste em três alfa-hélices no N-terminal, uma alfa-hélice central e uma alfa-hélice no C-terminal, separadas por duas ou três folhas-beta (Figura 25B)¹⁴⁰. A superfamília de domínios com PAS é numerosa e abrange uma grande diversidade de sequência primária

apesar de alta similaridade estrutural, o que pode dificultar sua identificação^{141; 142} Já foi reportada a presença destes domínios *PAS-like* na porção periplasmática de proteínas bacterianas fazendo parte de regiões sensoras das histidinas quinases CitA (receptor de citrato), DcuS (receptor de fumarato), e PhoQ (sensor de íons magnésio). Esses domínios por serem similares ao PAS, mas não idênticos foram chamados de PDC (PhoQ-DcuS-CitA)^{143; 144}.

Figura 24. Esquema de XAC2382 com seus quatro domínios e o modo como se inseriria na membrana.

Figura 25. Predição de regiões transmembranares de XAC2382 e de estrutura secundária do seu domínio periplasmático. A) A predição do programa TMHMM¹³⁹ da proteína XAC2382^{full-length} revela duas regiões com hélices transmembranares, representadas em vermelho. B) Predição de estrutura secundária do programa PSIPRED¹⁴⁰ do domínio periplasmático (predito) de XAC2382 (resíduos 33-161), que se encontra entre as hélices transmembranares.

Além disso, XAC2382 possui um domínio HAMP, que normalmente é responsável por fazer a ligação entre o meio citoplasmático e o periplasma bacteriano, participando da transdução de sinal de dentro para fora ou de fora para dentro da célula^{145; 146}.

4.3. Ensaio qualitativo de atividade de diguanilato ciclase *in vivo* das proteínas recombinantes expressas em *E. coli*.

A atividade diguanilato ciclase dos fragmentos recombinantes de XAC2382 foi avaliada *in vivo* após expressão em células de *Escherichia. coli*. Devido ao efeito do c-di-GMP em estimular a produção de celulose em *E. coli* ¹⁴⁷, utilizamos o reagente *congo red* que possui grande afinidade por esse carboidrato ¹⁴⁸. Logo, se colônias de *E. coli* ficarem com a coloração avermelhada ao super-expressar GGDEFs nestas células, temos um indício de que c-di-GMP está sendo produzido por essas proteínas, pelo efeito indireto da produção de celulose ^{149; 150}. Diversas construções recombinantes de XAC2382 foram produzidas, contendo os domínios HAMP-GGDEF-EAL (XAC2382₂₁₉HGE₇₀₅; XAC2382₂₄₉HGE₇₀₅), HAMP-GGDEF (XAC2382₂₁₉HG₄₄₆; XAC2382₂₄₉HG₄₄₆) e GGDEF (XAC2382₂₆₉G₄₄₆). Dois tipos diferentes de construções que contêm o domínio HAMP foram produzidas, uma desde o início do domínio (a partir do resíduo 219, sem conter a região transmembranar) e outra começando em uma alfa hélice (chamada hélice S) no N-terminal do domínio (a partir do resíduo 249) (Figura 26 A). O ensaio mostrou que as construções XAC2382₂₁₉HGE₇₀₅, XAC2382₂₄₉HGE₇₀₅, XAC2382₂₁₉HG₄₄₆ e XAC2382₂₄₉HG₄₄₆ possuem atividade de diguanilato ciclase por induzir a produção de celulose. A cepa XAC2382₂₆₉G₄₄₆ foi a única que não aparentou produzir c-di-GMP (Figura 26 B).

Esses resultados mostram que XAC2382 precisa de pelo menos de parte do domínio HAMP para produção de c-di-GMP. Neste caso, uma hipótese é que o domínio HAMP teria a função de aproximar os domínios GGDEF ou até mesmo promover a dimerização para ocorrer a catálise enzimática. Essas construções não contêm peptídeo sinal para endereçamento na membrana, tampouco as hélices transmembranares. Assim, estes resultados apontam que a XAC2382 não precisa estar inserida na membrana para manifestar sua atividade DGC.

Figura 26. Ensaio de atividade de diguanilato ciclase em *E. coli* utilizando *Congo red*. A) Construções realizadas em pET28a para a realização do experimento. B) Colônias de *E. coli* BL21 (DE3) crescidas em placas de meio LB 1,5% ágar suplementado com 50 µg/mL de corante *Congo red* e antibiótico kanamicina (100 µg/mL) após 24 horas a 30° C.

4.4. Ensaio de atividade de diguanilato ciclase e fosfodiesterase de c-di-GMP *in vitro*

A construção da proteína XAC2382₂₄₉HG₄₄₆ que aparenta produzir c-di-GMP após sua expressão em células de *E. coli* (através do ensaio de *Congo red*) foi purificada (Figura 27 A,B) e submetida a ensaios de produção do segundo mensageiro. Após incubação da proteína com o nucleotídeo GTP por 16 horas, não foi detectada a produção de c-di-GMP (Figura 27 D). Foram usados dois diferentes metais na reação, Mg^{2+} e Mn^{2+} e com nenhum deles a catálise ocorreu.

Para entender porque XAC2382₂₄₉HG₄₄₆ não estava produzindo c-di-GMP no ensaio *in vitro*, realizamos um ensaio de gel filtração analítica em coluna S200 para determinar o estado oligomérico da proteína em solução. XAC2382₂₄₉HG₄₄₆ foi eluída da coluna com uma massa aparente de 30kDa, que corresponde a um monômero (Figura 27 C), o que pode explicar a ausência de atividade diguanilato ciclase. Como, então explicar os resultados do ensaio de atividade em célula com congo red? A super-expressão induzida por IPTG certamente cria uma situação artificial. É possível que quando presentes em altas concentrações na célula as moléculas de proteínas tendem a se agregar, permitindo a aproximação dos domínios GGDEF e a catálise da formação de c-di-GMP. É possível também que o fragmento XAC2382₂₄₉HG₄₄₆ está interagindo com outras GGDEFs já existentes em *E. coli* de forma a produzir o segundo mensageiro. Duas outras possibilidades são que XAC2382₂₄₉HG₄₄₆ está provocando a produção de celulose por um outro mecanismo que não dependa da sua atividade de diguanilato ciclase, ou que um fator desconhecido esteja presente nas células de *E. coli* que pode ativar a proteína. Outra causa para a falta de atividade poderia ser a instabilidade mostrada por este fragmento recombinante. Dois dias após o término da purificação, a construção XAC2382₂₄₉HG₄₄₆ se mostrou muito instável, aparecendo bandas menores adicionais provenientes de degradação.

Figura 27. Ensaios *in vitro* com XAC2382₂₄₉HG₄₄₆. A) Construção utilizada de XAC2382₂₄₉HG₄₄₆ em vetor pet28a. B) Eletroforese SDS-PAGE 12% de XAC2382₂₄₉HG₄₄₆ purificada. C) Curva de calibração de massas moleculares em coluna de gel filtração analítica S200 com a indicação da eluição de XAC2382₂₄₉HG₄₄₆ com uma massa aparente de 30kDa. D) Cromatogramas derivados do ensaio de produção de c-di-GMP após purificação em coluna Q Sepharose monitorado pela absorbância a 260 nm (linha azul). 20 μ M de XAC2382₂₄₉HG₄₄₆ foi incubada com 2 mM de GTP, 2 mM Mg^{2+} ou Mg^{2+} no tampão 50 mM Tris pH 8, 10 mM NaCl.

Perguntamos-nos se XAC2382₂₄₉HG₄₄₆ ao menos se ligava ao GTP, mesmo no estado não catalítico, monomérico. Através de ensaio de desnaturação térmica monitorada por dicroísmo circular a 220 nm não observamos diferença nas temperaturas de desnaturação da proteína em tampão com e sem GTP. Assim, não há evidência que esta construção, na sua forma monomérica pode ligar ao substrato GTP (Figura 28).

Figura 28. Desnaturação térmica de XAC2382₂₁₉HG₄₄₆ monitorada por dicroísmo circular a 220 nm com e sem GTP. Foi usado 5 μ M de proteína em tampão 10 mM Tris pH 8,0, 20 mM NaCl e 1 mM MgCl₂ e a temperatura foi aumentada na velocidade de 0,3°C/min.

4.5.A cepa nocaute XAC Δ 2382 afeta a motilidade *sliding* de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

O knockout não-polar do gene *xac2382* foi construído pelo ex-aluno de doutorado do laboratório, Maxuel Andrade. A cepa XAC Δ 2382 apresenta um aumento de motilidade do tipo *sliding* (deslizamento na superfície do meio ^{151; 152}) em meio SB 0,5% quando comparado com a cepa selvagem (Figura 29). As características morfológicas de XAC Δ 2382 são idênticas a da cepa selvagem, como a produção de goma xantana, produção do pigmento amarelo xanthomonadina, e agregação, tanto em placas de meio sólido quanto em meio líquido (Tese do aluno Maxuel Andrade ¹¹²).

Figura 29. Ensaio de motilidade *sliding* em meio SB ágar 0,5%. As cepas selvagem (*XACwt*) e *XACΔ2382* foram transformadas com o vetor vazio pBRA e usado o antibiótico espectinomicina na concentração 150 µg/mL. Fotos tiradas após 4 dias a 30°C.

A super-expressão de XAC2382 na cepa $\Delta XAC2382$ (*XACΔ2382* + pBra2382_{full-length}) utilizando o vetor pBra induzido por arabinose provocou uma grande mudança morfológica nas colônias de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Inicialmente, após a transformação (por eletroporação) e crescimento em placas de TYE-agar, as colônias surgiram rugosas e opacas, sem o brilho característico de cepa selvagem (Figura 30). Quando crescida em meio líquido, a cepa *XACΔ2382* + pBra2382_{full-length} se mostrou agregada, o que dificultou enormemente a leitura da densidade ótica a 600 nm para experimentos subsequentes (Figura 30). Fez-se necessário ressuspender o agregado bacteriano várias vezes, com o auxílio de uma pipeta até que diminuísse a agregação para realizar leituras de densidade ótica. Essas características observadas nessa cepa são fenótipos típicos do aumento dos níveis de c-di-GMP na célula, provocados ou por aumento da atividade de diguanilato ciclase ou diminuição da atividade de fosfodiesterase, como já é bem conhecido na literatura^{3; 153; 154}.

Figura 30. Aparência morfológica de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em placa de petri com meio LB ágar 1,5% (acima) e em meio líquido 2xTY (em baixo) após crescimento por 16 horas a 30°C. Comparação entre cepa selvagem contendo o vetor vazio pBRA e a cepa XACΔ2382 contendo o vetor pBRA e o gene *xac2382*.

Apesar do gene XAC2382_{full-length} estar sob controle de um promotor de arabinose no vetor de expressão pBRA, nota-se essas grandes mudanças morfológicas mesmo na ausência do indutor, o que pode ser explicado por um vazamento da expressão sofrida por este vetor. De fato, o promotor desse vetor é derivado do pBAD e há relatos de vazamento de expressão desse sistema em *Xanthomonas*¹⁵⁵. No caso de XAC2382, que é uma enzima, este fenótipo é enormemente amplificado, já que a proteína uma vez sintetizada regula o segundo mensageiro que promove os efeitos *downstream* na bactéria.

4.6. Complementação da cepa *XAC*Δ2382

Com o intuito de verificar o papel de cada um dos domínios de *XAC*2382 complementamos a cepa *XAC*Δ2382 com cinco diferentes construções que expressam fragmentos da proteína e observamos o efeito em ensaios de motilidade *sliding*. Para isso, realizamos novas construções em vetor pBRA contemplando os domínios completos. (Figura 31 A).

A super-expressão das construções contendo os domínios HAMP-GGDEF-EAL (*XAC*2382₁₉₈HGE₇₀₅) e HAMP-GGDEF (*XAC*2382₁₉₈HG₄₄₆) foram capazes de complementar o fenótipo do nocaute *XAC*Δ2382 em *Xac* da mesma forma que a proteína *tipo selvagem*. O domínio GGDEF sozinho ou GGDEF-EAL não foi capaz de reverter o fenótipo da cepa nocaute. Nenhum efeito foi observado na super-expressão do domínio EAL, a motilidade continuou aumentada como na cepa *XAC*Δ2382 + pBRA (vetor vazio) (Figura 31 B). Ou seja, nas condições testadas *XAC*2382 necessita, no mínimo, os domínios ₁₉₈HAMP-GGDEF₄₄₆ para exercer a mesma função que a proteína inteira.

Figura 31. Ensaio de motilidade em meio SB 0,5% testando XAC2382 em diferentes construções. A) Construções realizadas da proteína XAC2382 no plasmídeo pBRA. O domínio periplasmático está representado de azul claro, o domínio HAMP de azul escuro, GGDEF de verde e EAL de amarelo. A região entre os domínios está marcada em preto e as regiões de hélices transmembranares em vermelho. B) Ensaio em placa utilizando o meio SB 0,5 % ágar após 4 dias com 150 µg/µL de espectinomicina a 30°C. As cepas selvagem (XACwt) e knockout em *xac2382* (XACΔ2382) foram testadas utilizando o vetor vazio pBRA e contendo diferentes construções.

As cepas super-expressando as construções XAC2382₁₉₈HGE₇₀₅ e XAC2382₁₉₈HG₄₄₆, assim como a construção *full-length*, também agregaram em meio líquido e tiveram aparência

rugosa em placa de petri, reforçando a hipótese que, nestas cepas há níveis altos de c-di-GMP (Figura 32).

Figura 32. Aparência morfológica de *XACΔ2382* com o vetor pBRA contendo as construções das proteínas *XAC2382₁₉₈HGE₇₀₅* e *XAC2382₁₉₈HG₄₄₆* em placa de petri com meio LB ágar 1,5% e em meio líquido 2xTY após crescimento por 16 horas a 30°C. Os fenótipos de agregação e rugosidade aparecem assim como na cepa com a construção da proteína *full-length* (Figura 10).

4.7.Efeito de mutações pontuais em XAC2382

Para investigar melhor o funcionamento de cada um dos domínios de XAC2382 resolvemos complementar a cepa nocaute com mutantes de XAC2382_{full-length} em que somente um ou alguns aminoácidos conservados em cada domínio foram modificados (Figura 31 A). O raciocínio para o desenho de cada mutante é apresentado nos seguintes parágrafos.

Devido à baixa similaridade de sequência deste domínio com proteínas conhecidas nos restou a alternativa de adotar o programa PSI-BLAST para tentar encontrar proteínas relacionadas a esse domínio que já foram caracterizadas previamente. Encontramos CitA, uma

histidina quinase de *Klebsiella pneumoniae* que também possui um domínio periplasmático *PAS-like* e com 33% de identidade com a região periplasmática de XAC2382. Foi mostrado que uma arginina e uma histidina ($_{133}\text{RLYH}_{136}$) dessa porção de CitA participam do reconhecimento de citrato no periplasma, o que desencadeia a ativação da proteína levando a bactéria a fermentar este ácido tricarboxílico^{156; 157; 158; 159}.

A Figura 33 mostra um alinhamento das sequências de alguns dos homólogos do domínio periplasmático de XAC2382 encontrados os bancos de dados. Esta família de homólogos possui um motivo, $_{108}\text{RXXH}_{111}$ (numeração correspondente das proteínas XAC2382) que se manteve conservado mesmo em proteínas com identidade de aproximadamente 40% (Figura 33). Para investigar se essa assinatura/motivo poderia ter alguma importância na ativação de XAC2382, mudamos esses dois resíduos para alaninas.

Figura 33. Alinhamento da porção periplasmática de XAC2382 com homólogos buscados por BLAST. As setas pretas indicam os resíduos de arginina e histidina que foram mutados para alanina. As setas em rosa indicam a arginina e histidina da proteína CitA, que são importantes para sentir sinais periplasmáticos.

Da mesma forma, escolhemos regiões conservadas e, portanto, possivelmente importantes para a transdução de sinal mediada por domínios HAMP. Os domínios HAMP em geral são formados por duas alfa-hélices e possuem uma repetição de 7 resíduos (*heptad repeat*) com as

suas posições classicamente chamadas de *abcdefg* onde as posições *a* e *d* são de resíduos hidrofóbicos que ditam a natureza de interação entre alfas-hélices e formam uma estrutura do tipo *coiled-coil*, favorecendo uma interação hidrofóbica *knob-into-holes* ¹⁶⁰. O dímero de domínio HAMP é mantido por esse tipo de interação que ocorre entre as quatro alfa-hélices (Figura 34 A) ^{160; 161; 162; 163}. Através de um alinhamento de 230 sequências *seed* de domínios HAMP retirados do Server Pfam ³⁴ criamos um *logo* utilizando a ferramenta *Skyline* para verificar a conservação dos resíduos em cada posição ¹⁶⁴. *Logo* é uma representação gráfica do padrão de conservação de uma série de sequências em que são expressas letras de diferentes tamanhos que denotam a distribuição de aminoácidos em cada posição, sendo que quanto maior a letra, maior a ocorrência daquele resíduo. Verificamos que a posição 259 ocupada por uma fenilalanina em XAC2382, era bem conservada, e quando a fenilalanina não estava presente outro resíduo de caráter hidrofóbico ocupava esta mesma posição, que corresponde à posição *a* da repetição *heptad abcdefg*. (Figura 34 B). Paralelamente, executamos uma modelagem tridimensional da estrutura do domínio HAMP de XAC2382 empregando o programa I-Tasser ¹⁶⁵ e verificamos que essa fenilalanina poderia estar situada na interface entre duas hélices, mantendo o domínio estruturado (Figura 34 C).

Assim, uma mutação sítio dirigida no domínio HAMP foi realizada no resíduo F259 que foi mutado para um ácido glutâmico. A escolha de mudar um resíduo hidrofóbico para um ácido glutâmico foi feita com a finalidade de que a inserção de um resíduo carregado negativamente pudesse romper essa interação hidrofóbica, importante para estruturação *coiled coil*. Essa fenilalanina se mostrou bem conservada em domínios HAMP mesmo de organismos distantes que possuem proteínas com 30% de identidade com o domínio HAMP de XAC2382.

Figura 34. Indicação da mutação realizada no domínio HAMP. A) Modelo de interação *coiled coil* de um dímero de domínios HAMP com a interação hidrofóbica mantida pelos aminoácidos *a* e *d*, do *heptad repeat abcdefg*. Retirado de Hulko et. al.¹⁶³. B) *Logo* criado a partir de alinhamento de 230 sequências de domínios HAMP. A seta preta indica o resíduo mutado, uma posição preenchida por aminoácidos hidrofóbicos na posição *a* do *heptad repeat abcdefg*. C) Modelo do domínio HAMP de XAC2382 (resíduos 233-268) indicando a fenilalanina mutada, presente na interface entre duas alfa-hélices.

Por fim, para eliminar a atividade diguanilato ciclase de XAC2382, mutamos os resíduos GGD para AAA no motivo GGDEF (Figura 35).

A Figura 35 B mostra que as mutações pontuais introduzidas nos domínios HAMP e GGDEF tornaram a proteína incapaz de reverter o fenótipo do nocaute. A mutação produzida no domínio GGDEF abole a atividade de diguanilato ciclase, sendo abolidos também todos aqueles fenótipos decorrentes de aumento de concentração de c-di-GMP na célula, como agregação e rugosidade (Figura 36). Estas observações nos indicam que a reversão do fenótipo verificada nas

construções full-length, XAC2382₁₉₈HGE₇₀₅ e XAC2382₁₉₈ HG₄₄₆ é decorrente da atividade de diguanilato ciclase.

Figura 35. Motilidade das mutações realizadas em XAC2382. A) Figura de XAC2382 mostrando as três mutações nos três diferentes domínios, periplasmático, HAMP e GGDEF. B) Ensaio de motilidade em meio SB 0,5% ágar das cepas selvagem (XACwt) e knockout em *xac2382* (XACΔ2382) com o vetor pBRA vazio e contendo construções mutantes, após 4 dias a 30°C.

Figura 36. Aparência morfológica de *XACΔ2382* super-expressando *XAC2382* com a mutação no domínio HAMP (pBRAXac2382_{F259E}) e com mutação no domínio GGDEF (pBRAXac2382_{360AAA362}) em placa de petri com meio LB ágar 1,5% e em meio líquido 2xTY após crescimento por 16 horas a 30°C. Os fenótipos de agregação e rugosidade não aparecem nestas cepas, ao contrário da expressão da proteína selvagem.

O resultado da super-expressão de *XAC2382* com a mutação produzida no domínio HAMP reforça a ideia de que resíduos hidrofóbicos, como a fenilalanina 259, são importantes para manter a estrutura *coiled coil* estável, seja entre hélices da mesma proteína ou entre hélices do dímero mostrando que isto parece essencial para o correto posicionamento do domínio GGDEF para que ocorra a atividade de diguanilato ciclase.

Já a mutação realizada no domínio periplasmático não mudou o fenótipo observado na complementação da cepa nocaute pela proteína selvagem. Outros resíduos ou fatores podem ser importantes para a ativação ou desativação da proteína e devem ser investigados posteriormente.

4.8. Ensaio de motilidade do tipo *twitching*

Verificamos também a motilidade do tipo *twitching*, que é dependente de pilus tipo IV, no nocaute em *xac2382*. Para isto, com a ajuda de German Dunger, pós-doutor do nosso laboratório, inoculamos bactérias no fundo de placas de petri com meio SB 1 % ágar ⁶⁸. Observamos um aumento da motilidade da cepa *XACΔ2382* quando comparada à cepa selvagem. A cepa nocaute super expressando a proteína completa (*XAC2382_{full-length}*), e os domínios HAMP-GGDEF (*XAC2382_{198HG446}*) e HAMP-GGDEF-EAL (*XAC2382_{198HGE705}*) parentemente reverteram o fenótipo, reduzindo a motilidade *twitching* até níveis bem menores do que observado para a cepa selvagem (Figura 37).

A

B

Figura 37. Ensaio de motilidade do tipo twitching. A) Placa representativa das motilidades da cepa selvagem (*XACwt*), nocaute em *xac2382* (*XACΔ2382*) e após 4 dias de ensaio a 30°C. B) Motilidade relativa das cepas medida a partir do diâmetro da movimentação, através de quatro experimentos independentes. As motilidades *twitching* das cepas complementadas foram tão pequenas que não puderam ser detectadas.

4.9. Ensaio de duplo híbrido em levedura

O fragmento $_{219}\text{HGE}_{705}$ de XAC2382 foi clonado em vetor pOBD (isca) para avaliar a interação com outras proteínas de *X. citri* empregando uma biblioteca de fragmentos randômicos genômicos clonados no vetor pOAD (presa) ¹¹⁵. A Tabela 14 mostra as interações observadas, o número de vezes que a interação foi observada, seguida (em parênteses) pelo número do resíduo da proteína em que a interação começa. Comumente em ensaios de duplo híbrido algumas presas são capazes de ativar a expressão do gene repórter, neste caso (*HIS3* e *ADE2*) mesmo sem haver interação com a isca, ou interagem promiscuamente com várias iscas diferentes. Tais proteínas foram determinadas por ex-integrantes do nosso grupo através de ensaios somente com a presa ou co-transformadas com a presa e o vetor pOBD correspondente à isca vazio ^{115; 166}. Em nosso resultado, estas proteínas foram consideradas como falso-positivos e estão sinalizadas na tabela.

O fragmento $_{219}\text{HGE}_{705}$ de 2382 mostrou-se interagir com a proteína CobU, que é uma enzima bifuncional e possui atividade de kinase e de *guanylyltransferase* indispensável para a formação de cobalamina, a vitamina B12. XAC2382 interagiu duas vezes com esta proteína, a partir de fragmentos diferentes. Mais estudos precisam ser feitos para confirmar esta interação, bem como para determinar se é um efeito específico de XAC2382 ou geral para outras diguanilatos ciclase e fosfodiesterases.

Além disso, foi realizado duplo híbrido do fragmento do domínio periplasmático de XAC2382₃₇PERI₁₉₂, (resultados não mostrados) sendo identificadas na interação duas proteínas hipotéticas, XAC3202 (domínio GIY-YIG) e XAC3305 (domínio Rieske). Ambas as proteínas são preditas de serem citoplasmáticas: a primeira possui um domínio conhecidamente envolvido no reparo de DNA e a segunda na cadeia transportadora de elétrons bacteriana. Por estarem

localizadas em compartimento celulares diferentes, não parecerem interações verdadeiras. Por isso, descartamos maiores investidas nessas proteínas.

Tabela 14. Presas sequenciadas no ensaio de duplo híbrido utilizando XAC₂₁₉HGE₇₀₅ como isca.

Interações verdadeiras	Número de interações (res N ⁰)
XAC3187 (CobU)	2 (-14) (-9)
Falsos-positivos	
XAC3463 (TolC)	14
XAC0031 (YahK)	2
Xaca0039 (PthA)	7
XAC3515 (Celulose sintase)	1

* Coluna da esquerda: Proteína identificada; Coluna da direita: Número de interações observadas e resíduo que começa a interação.

4.10. Efeito do nocaute em *xac2382* na virulência

A virulência da cepa *XACΔ2382* também foi avaliada. Em ensaios anteriores e publicados na tese de Maxuel Andrade, nenhum efeito foi verificado na virulência do nocaute em *xac2382* quando comparada com a cepa selvagem de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*¹¹². Esse experimento consistia em injetar bactérias dentro do mesoderma das folhas de laranja com o auxílio de uma seringa e esperar por uma semana. Ou seja, as bactérias eram inoculadas artificialmente na planta através de furos produzidos pela agulha. Perguntamos-nos se XAC2382, por ser uma proteína que tem controle sobre a motilidade, terá um papel na entrada da bactéria na planta, de forma ativa, pelos seus estômatos.

Assim, com o uso de uma haste flexível de algodão inoculamos bactérias selvagens e mutantes em *xac2382* na superfície da folha e esperamos 30 dias para observar os sintomas do cancro cítrico. Foi observado menos focos de cancro cítrico nas folhas do knockout do que na

cepa selvagem (Figura 38). Mais ensaios precisam ser realizados com o objetivo de quantificar as bactérias infectantes e com a cepa nocaute com a complementação do gene.

Figura 38. Ensaio de virulência em folhas de laranja pêra. *Xanthomonas citri* subsp. *citri* cepas selvagem (*XACwt*) e nocaute em *xac2382* (*XACΔ2382*) na D.O_{600nm} de 1,0 foram aplicadas na superfície de folhas de duas diferentes plantas jovens de laranja pêra e fotografadas após 30 dias. Aumento 6 X.

4.11. Contexto genômico de XAC2382 e a proteína XAC2383.

Não é uma atividade trivial buscar proteínas homólogas a XAC2382 no banco de dados porque os domínios HAMP, GGDEF e EAL são encontrados em múltiplas cópias nos genomas se tornando uma arquitetura comum em diferentes proteínas de sinalização. Assim, ao realizar uma busca por homólogos (empregando *blastp*¹⁶⁷) são retornados resultados de proteínas que possuem os domínios HAMP-GGDEF-EAL (que corresponde por 70% da proteína), mas que possuem uma porção periplasmática diferente. Também são retornadas nos resultados proteínas com os domínios GGDEF-EAL que não possuem regiões transmembranares sendo, portanto, ao contrário de XAC2382, citoplasmáticas. Apesar destas proteínas também serem diguanilato

ciclases e fosfodiesterases de c-di-GMP, elas estão inseridas em distintos contextos da sinalização, pois a presença de domínios acessórios pode ser fundamental para regular a atividade dessas proteínas em momentos específicos ou para efetuar uma diferente função. O mesmo acontece com o domínio HAMP que é onipresente nas espécies bacterianas e está presente em proteínas com domínios histidina quinases, MCP (*methyl-accepting chemotaxis protein*) e diguanilato ciclases. Este fenômeno é conhecido como *domain shuffling*, os domínios agem como uma entidade única ou semi-independente e são embaralhados entre outros genes ⁸². Dessa forma, é preciso analisar cuidadosamente a proteína e hipóteses sobre função podem ser deduzidas por meio da análise do cluster gênico em que está inserida.

No genoma de Xac, o gene *xac2382* está ao lado de *xac2383*. De fato, o códon terminador de *xac2383* sobrepõe-se ao códon iniciador de *xac2382* (Figura 39). XAC2383 é uma proteína anotada como periplasmática e pertence à superfamília de *periplasmic binding proteins* (PBPs). PBPs frequentemente atuam como receptores de substratos que serão transportados por um transportador do tipo ABC (*ATP binding cassette*).

Figura 39. Região gênica em que *xac2382* e *xac2383* se encontram. A sobreposição do códon iniciador de *xac2382* (ATG) e o códon terminador de *xac2383* (TGA) está marcada em vermelho.

Transportadores do tipo ABC utilizam a energia do ATP para transportar uma variedade de substâncias através da membrana de organismos vivos pertencentes a todos os reinos da vida ^{168; 169}. Em procariotos são classificados como importadores e exportadores. Os importadores exercem a importante função de transportar nutrientes do periplasma para dentro da célula, podendo ser íons orgânicos e inorgânicos, aminoácidos, vitaminas, peptídeos, metais, oligossacarídeos, entre outros ^{170; 171; 172}. Os exportadores estão envolvidos no transporte de moléculas de dentro para fora da célula, como por exemplo, toxinas e fatores de virulência ¹⁷³. O transportador do tipo ABC importador é composto de dois domínios transmembranares (TMD), dois domínios que se ligam ao ATP (NBD) e a proteína periplasmática que se liga ao substrato ¹⁷⁴ (Figura 40). XAC2383 possui 19% de identidade com PhnD, a proteína periplasmática que reconhece fosfonatos para serem transportados (importados) em *Escherichia coli*, em especial o 2-aminoethylphosphonate, um dos fosfonatos mais comuns encontrado na natureza ^{175; 176}.

Figura 40. Esquema do modo de transporte dos transportadores do tipo ABC do tipo importadores. Em verde, a *periplasmic binding protein*, similar a XAC2383. Em roxo o domínio transmembrana (TMD), em amarelo o domínio que se liga à nucleotídeo (NBD) e os círculos vermelhos representando as moléculas de ATP. Adaptado de Hollenstein et. al ¹⁷⁴.

Fosfonatos são compostos organofosforados que possuem grupos $R-PO(OH)_2$ ou $R-PO(OR)_2$, em que R é um grupo alquil (Figura 41). Eles são encontrados naturalmente no solo, em oceanos e organismos vivos sendo um nutriente muito importante para bactérias quando enfrentam situações de pouco fosfato livre ou ambientes em que naturalmente há pouco fosfato^{177; 178}. Em *E. coli* foi mostrado que essas bactérias conseguem crescer em meio mínimo sem fosfato e na presença de fosfonatos, e ao nocautear o transportador do tipo ABC para fosfonato esse crescimento não ocorre mais¹⁷⁹. Os genes que codificam para os componentes dos transportadores do tipo ABC normalmente estão no mesmo operon. Chama atenção que o gene *xac2383* fuja à regra, pois é situado próximo a uma proteína GGDEF-EAL de membrana e não um transportador do tipo ABC.

Figura 41. Fórmula geral para um fosfonato. O grupo R é um grupo alquil, sendo que R₁ e R₂ também podem ser um hidrogênio.

Voltando à região periplasmática (resíduos 32-194) de XAC2382, empregando o programa PSI-BLAST¹⁸⁰, encontramos mais de 500 proteínas de diferentes organismos que compartilham esse domínio, incluindo não só proteínas com a arquitetura Domínio Periplasmático-HAMP-GGDEF-EAL, mas também com a arquitetura Domínio Periplasmático-HAMP-HK, onde HK representa um domínio histidina quinase. Alguns organismos como *Vibrio parahaemolyticus* chegam a ter proteínas com as duas arquiteturas. Curiosamente, ao analisar a região genômica em que estes genes estão inseridos, quase sempre encontramos ao lado um gene que codifica uma proteína da família das *periplasmic binding proteins* predita de reconhecer fosfonatos ou fosfatos, da qual pertence XAC2383 (Figura 42).

Figura 42. Exemplos de clusters gênicos contendo genes vizinhos que codificam para *phosphonate-binding-protein* e proteínas com domínios GGDEF-EAL ou histidina kinase (similar ao par *xac2382-xac2383*).

Essa análise faz-nos levantar duas hipóteses: i) Esta região periplasmática ainda não anotada, presente em XAC2382 e em outras diguanilato ciclases e histidinas kinases, interage com a *periplasmic binding protein* que, por sua vez deve ter deixado de participar no transporte ativo de substâncias para exercer um papel na sinalização da bactéria; ou ii) evolutivamente foi mantida em bactérias a porção sensora desse sistema localizado no periplasma, enquanto o componente (citossólico) de *output* mudou: histidinas kinases em alguns organismos e moduladores dos níveis de c-di-GMP em outros (como é o caso de XAC2382). Nesse contexto funcional, XAC2382 se assemelha mais a histidinas quinases com domínio periplasmático deste tipo do que às outras proteínas HAMP-GGDEF-EAL ou GGDEF-EAL encontradas nos genomas.

4.12. XAC2383 interage com o domínio periplasmático de XAC2382

A sequência de DNA que codifica para a porção periplasmática de XAC2382 (XAC2382₃₇PERI₁₉₂) foi clonada no vetor de expressão pET28a (com *his-tag* e marcador de resistência contra kanamicina) enquanto XAC2383 sem a região correspondente ao peptídeo sinal (res 31-309) foi clonado no vetor de expressão pET3a (*sem his-tag*, resistência contra ampicilina). Os plasmídeos foram co-transformados na cepa de *E. coli* BL21(DE3) e o lisado aplicado a uma coluna *Hi-Trap* carregada com níquel. Dois picos foram eluídos após o gradiente de imidazol, um com a presença da proteína somente XAC2382 e outra com o complexo XAC2382+XAC2383 conforme revelado por SDS-PAGE (Figuras 43A e 43B). O complexo foi eluído com uma concentração de aproximadamente 400 mM de imidazol, enquanto XAC2382 sozinha foi eluída com aproximadamente 220 mM. A interação entre XAC2382 e XAC2383 pode ter deixado a cauda de histidina mais exposta favorecendo a interação da proteína com a coluna. Após esse passo, as frações que possuíam ambas as proteínas foram aplicadas em uma coluna de filtração em gel Superdex 200 e novamente o pico correspondente a ambas as frações foi coletado e concentrado (Figura 43C).

A

B

C

Figura 43. Purificação do complexo XAC2382₃₇PERI₁₉₂ + 2383. A) Cromatograma da purificação por afinidade em coluna carregada com níquel. O traço vermelho representa o pico chamado de P0 eluído logo no início do gradiente com a presença de proteínas que se ligaram inespecificamente na coluna. Em verde as frações correspondentes ao pico das frações de XAC2382, chamado de P1. Em amarelo o pico correspondente ao complexo XAC2382₃₇PERI₁₉₂ + XAC2383, chamado de P2. B) Gel SDS-PAGE 12% da purificação por afinidade. C) Gel SDS-PAGE 12% do complexo após ser eluído da coluna de exclusão molecular S200.

Subsequentes cromatografias de gel filtração analítica S200 mostraram que o complexo foi eluído com uma massa aparente de 65 kDa o que sinaliza uma proporção XAC2382:XAC2383 de 2:1. XAC2383 e XAC2382₃₇PERI₁₉₂ quando aplicadas separadamente na coluna de gel filtração analítica foram, ambas, eluídas com a massa aparente de um monômero (Tabela 15).

Tabela 15. Gel filtração analítica em coluna Superdex 200 de XAC2382₃₇PERI₁₉₂, XAC2383 e XAC2382₃₇PERI₁₉₂ + XAC2383.

Proteína	Massa (kDa)	Massa (kDa) gel filtração	Estado Oligomérico
XAC2382 ₃₇ PERI ₁₉₂	19	13,08	Monômero
XAC2383	31	26,9	Monômero
XAC2382 ₃₇ PERI ₁₉₂ + XAC2383	50 kDa (1:1) ou 69 kDa (2:1)	64,86	Provavelmente 2:1 XAC2382 ₃₇ PERI ₁₉₂ :XAC2383

Tentativas de cristalização do complexo foram efetuadas e foram obtidos cristais na condição número 38 do kit crystal screen 2 da Hampton Research, que consiste em 0,1 M HEPES sódio pH 7,5 e 1,4 M citrato de sódio tribásico. Os cristais de aproximadamente 70 μ M x 40 μ M foram expostos a radiação de raios X o que resultou em imagens com reflexões presentes em até 4 Å de resolução (Figura 44). Houve, no entanto dificuldade de indexar as reflexões, a coleta, portanto, não foi continuada. Refinamentos da condição cristalográfica precisam ser iniciados para a obtenção de melhores cristais para difração. Dessa forma, confirmaremos se os cristais são realmente do complexo para tentar resolver a estrutura. Em breve também enviaremos estes cristais para linhas de raios X mais intensas, na esperança que possamos obter um conjunto de dados completo e de maior resolução.

Figura 44. Cristalização e difração de cristais formados após screening de XAC2382₃₇PERI₁₉₂ + XAC2383. A) Cristais formados após screening usando kits de cristalização da Hampton Research. Cada unidade da régua é equivalente a 8 μM . B) Imagem de um padrão de difração coletado após 8 minutos de exposição e uma oscilação de 1° no difratômetro com anodo rotatório Rigaku MicroMax-007HR. O círculo vermelho indica o anel de resolução de 4 Å.

4.13. Expressão, purificação e cristalização de XAC2383

O gene codificando os resíduos 31 a 309 de XAC2383 foi clonado no plasmídeo pET3a, expresso e purificado em coluna de troca iônica SP-Sepharose. A proteína foi eluída com aproximadamente 300 mM de NaCl e na presença de alguns contaminantes (Fig. 45A e 45B).

Surpreendentemente, nós observamos na parede e no fundo dos tubos coletores de frações, inúmeros cristais que inicialmente achávamos que se tratava de precipitado protéico. Levamos esses cristais para uma lupa na qual pudemos identificar que realmente eram cristais que poderiam ser levados para uma linha de raios X para difração. Assim, XAC2383, mesmo na presença de contaminantes, cristalizou no próprio tampão de purificação (Figura 45C).

Figura 45. Purificação e cristalização de XAC2383. A) Perfil cromatográfico de XAC2383 em coluna SP-Sepharose em leitura a 280 nm. B) Eletroforese SDS-PAGE da purificação de XAC2383. Canaletas 1 a 6: Frações que não ligaram à coluna (*flow-through*), frações de lavagem e picos anteriores a XAC2383. Canaletas 7 a 11: Pico correspondente a XAC2383. Canaleta 12: Cristais coletados por centrifugação e diluídos em tampão de amostra. Canaletas 13 e 14: Sobrenadante da centrifugação realizada para coleta de cristais. C) Tubo de fração com cristais de XAC2383 formados e imagem de um cristal com aumento 6 X.

4.14. Cristalização e dados preliminares da difração por raios X.

Inicialmente, cristais de XAC2383 difrataram até 2,2 Å na linha de raios X do difratômetro com anodo rotatório Rigaku MicroMax-007HR, situado na Central Analítica do IQ-USP. O cristal é ortorrômbico e pertence ao grupo espacial $P2_12_12_1$ e com célula unitária de

dimensões de $a=66,63 \text{ \AA}$, $b=67,62 \text{ \AA}$, e $c=114,49 \text{ \AA}$. O coeficiente de Mathews indicou haver duas moléculas de XAC2383 na unidade assimétrica.

Tentamos sem sucesso determinar as fases iniciais por substituição molecular utilizando o programa PHASER¹²⁴ empregando a estrutura de PhnD de *E.coli* como modelo (PDBID:3P7I; que possui 19% de identidade com XAC2383). Posteriormente utilizamos metais pesado para tentar resolver a estrutura por substituição isomorfa múltipla (MIR). Substituição isomorfa é a substituição de um elemento por outro em uma rede cristalina sem afetar a estrutura do cristal. A técnica consiste em adicionar ao cristal soluções contendo átomos pesados (por alguns minutos a horas) antes do experimento de difração do cristal. Através da interpretação do mapa de Patterson de conjuntos de dados com e sem metais pesados e de cristais com as mesmas dimensões da célula unitária, podemos identificar a posição destes átomos, e a partir daí estimar as fases para todo o cristal. Estas fases estimadas iniciais são utilizadas para construir um mapa de densidade eletrônica no qual é construído o primeiro modelo molecular da proteína¹⁸¹. No caso de XAC2383, testamos os reagentes K_2PtCl_4 , $AuCl_3$, $Hg(CN)_2$, HgI_2 entre outros e não obtivemos sucesso neste procedimento, ora por desestabilizar os cristais ora por alterar as dimensões da célula unitária.

Decidimos então expressar a proteína com selênio-metionina e utilizar as técnicas de faseamento *Single Wavelength Anomalous Dispersion* (SAD) ou *Multiwavelength Anomalous Dispersion* (MAD). Diferente do MIR, essas técnicas não necessitam de mais de um cristal, contudo, faz-se necessário utilizar uma radiação de luz síncrotron e coletar o conjunto em comprimentos de onda que promovem uma dispersão anômala do átomo escolhido¹⁸¹. Somente alguns átomos são capazes de espalhar raios X de forma anômala nos comprimentos de onda disponíveis nos síncrotrons, e o selênio é um deles.

Coletamos os dados de um conjunto SAD no LNLS em Campinas e conseguimos resolver o problema das fases utilizando somente um comprimento de onda, 0,979 Å, que corresponde ao pico máximo de sinal anômalo conferido pelo selênio. XAC2383 possui 11 metioninas que foram substituídas por selênio-metionina, assim sendo suficientes para gerar a dispersão anômala adequada para determinar as fases sem o uso de comprimentos de ondas adicionais (Figura 46). O programa Autosol¹²⁸ do pacote Phenix¹²⁹ foi usado para gerar um modelo tridimensional o qual por sua vez utilizamos para realizar substituição molecular de um conjunto de dados nativo que possuía melhor resolução (1,9 Å) (Tabelas 16, 17 e 18).

A

B

Figura 46. Coleta de dados de XAC2383. A) Padrão de difração de cristal de XAC2383 incorporada com Selênio-Metionina obtida na linha MX2 no LNLS. B) Espectro de absorção teórico de raios X por selênio. A estrela vermelha no gráfico indica a região correspondente ao pico de espalhamento anômalo usado na coleta.

Tabela 16. Dados coletados na linha de raios X MX2 no LNLS para o cristal de XAC2383 com selênio-metionina incorporada.

Cristal	Se-Met
Grupo espacial	P 21 21 21
Dimensões da célula unitária:	
a, b, c (Å)	67,051; 67,461; 114,05
α, β, γ (°)	90 90 90
Resolução (Å)	40,00-2,12 (2,20-2,12)
$R_{\text{merge}}^{\dagger}$	0,109 (0,439)
$I/\sigma I$	8,74 (2,3)
Completeza (%)	96,9 (95,9)
Multiplicidade	3,5 (2,6)

* Os dados para a camada de maior resolução são mostrados em parênteses.

$\dagger R_{\text{merge}} = \sum h \sum i |I_i(h) - \langle I(h) \rangle| / \sum h \sum i I_i(h)$ onde $I_i(h)$ é i th e $\langle I(h) \rangle$ é a intensidade média da reflexão h .

Tabela 17. Dados estatísticos das coletas de cristais de XAC2383.

Cristal	Cloreto	Fosfato	Pirofosfato	ATP	GTP
Grupo espacial	P 21 21 21	P 21 21 21	P 21 21 21	P 21 21 21	P 21 21 21
Dimensões da célula unitária:					
a, b, c (Å)	66,54; 66,86; 113,03	66,88; 67,09; 113,49	66,96; 66,79; 113,42	66,36; 67,11; 113,70	66,789; 67,049; 113,74
α, β, γ (°)	90 90 90	90 90 90	90 90 90	90 90 90	90 90 90
Resolução (Å)	29,89-1,9 (1,968 -1,9)	43,75-2,09 (2,164-2,09)	43,69-2,2 (2,278-2,2)	43,62-2,48 (2,6-2,48)	47,36-2,25 (2,35-2,25)
$R_{\text{merge}}^{\dagger}$	0,068 (0,436)	0,053 (0,23)	0,073 (0,309)	0,098 (0,499)	0,07 (0,445)
$I/\sigma I$	11,74 (1,90)	14,54 (5,23)	8,73 (2,71)	5,77 (2,69)	7,41 (2,48)
Completeza (%)	96,41 (96,49)	99,11 (97,01)	98,51 (96,54)	99,89 (98,85)	99,61 (97,77)
Multiplicidade	3,6 (3,2)	4,5 (4,3)	4,7 (4,5)	6,8 (6,7)	5,3 (5,2)

* Os dados para a camada de maior resolução são mostrados em parênteses.

$\dagger R_{\text{merge}} = \sum h \sum i |I_i(h) - \langle I(h) \rangle| / \sum h \sum i I_i(h)$ onde $I_i(h)$ é i th e $\langle I(h) \rangle$ é a intensidade média da reflexão h .

Tabela 18. Tabela de estatísticas do refinamento das estruturas.

	Cloreto	Fosfato	Pirofosfato	ATP	GTP
Resolution (Å)	29,89-1,9	43,75-2,09	43,69-2,2	43,62 -2,48	47,36-2,25
Nº reflections	39032 (3874)	30669 (2951)	26130 (2511)	18718 (3050)	30817 (2983)
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}^{\dagger}$	0,1795/0,2319	0,1889/0,2374	0,1769/ 0,2368	0,1997/0,2575	0,1876/0,2603
Nº. atoms					
Proteína	4406	4406	4423	4406	4390
Ligante/Íon	4	12	18	62	64
Água	292	69	147	85	160
Ramachandran favorável (%)	99	98	98	97	98
Ramachandran outliers (%)	0	0	0	0	0
Ligand/ion	Cloreto	Fosfato	Pirofosfato	ATP	GTP
<i>B factor</i> médio	23,70	26,90	30,30	40,40	33,50
Proteína	23,40	26,90	30,10	40,10	32,50
Ligantes	24,10	27,20	38,00	63,90	97,30
Água	28,50	24,00	34,20	37,60	35,90
<i>R.m.s deviations</i>					
Comprimento da ligação (Å)	0,018	0,016	0,014	0,013	0,015
Ângulo da ligação (°)	1,91	1,78	1,67	1,76	1,82

*Dados para a última camada de resolução estão entre parênteses.

$\dagger R_{\text{work}} = \sum |F_o - F_c| / \sum F_o$. Para o cálculo do R_{free} 5% dos dados foram excluídos.

4.15. XAC2383 possui uma topologia típica de *Periplasmic Binding Proteins* (PBPs).

A estrutura de XAC2383 revela que a proteína possui dois lobos separados por uma fenda central e conectados por duas regiões de *coils*. Estes dois lobos são bem similares estruturalmente e ambos são compostos de um cerne de folha-beta mistas com fitas paralelas e anti-paralelas. Este cerne de estrutura beta é envolvido por 5 alfa-hélices em cada um dos lobos havendo uma alfa-hélice adicional na porção C-terminal da proteína que se localiza entre os dois domínios (Figuras 47, 48, 49 e 50). Essa topologia é típica de proteínas pertencentes ao Clan PBP (*periplasmic binding proteins*) e durante o processo evolutivo muitos desses genes se fundiram com genes de proteínas integrais de membranas gerando sensores periplasmáticos em bactérias gram-negativas e extracelulares em gram-positivas e eucariotos¹⁸².

Há duas moléculas na unidade assimétrica do cristal que se contatam através de uma superfície de 800 Å². Este valor é considerado pequeno demais para suportar a dimerização em solução (consistente com os ensaios de gel filtração analíticos descritos acima).

Figura 47. Modelo em *cartoon* de XAC2383 gerado pelo programa Chimera¹⁸³. No modelo é possível observar dois lobos conectados por duas regiões de *coil* (alaranjado) e uma fenda no centro, entre os dois lobos.

Figura 48. Modelo em *cartoon* de XAC2383 que evidencia 4 diferentes faces após rotação de 180° em dois eixos.

Figura 49. Modelo em *cartoon* de XAC2383 que destaca as estruturas secundárias presentes em XAC2383. Alfa-hélices, fitas-beta e loops são coloridos verde, vermelho e amarelo, respectivamente.

Figura 50. Diagrama da topologia de XAC2383. É possível notar os dois subdomínios com 5 alfa-hélices cada e duas folhas-betas com fitas paralelas e anti-paralelas.

Ao realizar uma busca pelo Dali Server¹⁸⁴ (http://ekhidna.biocenter.helsinki.fi/dali_server/), para procurar topologias semelhantes no banco de dados do *Protein Data Bank*, encontramos outras proteínas com a mesma topologia das PBPs (Figura 51). Estruturalmente, a que mais se assemelha a XAC2383 é a PhnD de *Escherichia coli* que possui 19% de identidade e um RMSD (Root-Mean-Square Deviation) atômica de 3,4Å (Figura 52 A). PhnD possui uma alfa-hélice adicional no C-terminal e está em uma conformação

mais fechada havendo uma diferença de aproximadamente 8 Å na abertura da fenda (distância entre os dois *loops* $\beta 6$ - $\alpha 5$ e $\beta 1$ - $\alpha 1$) (XAC2383 12,55 Å e PhnD 4,01 Å). A topologia de estruturas secundárias das duas proteínas se sobrepõe quase que completamente (Figura 52 B).

Também foram apontadas semelhanças com as transferrinas eucarióticas, que são proteínas responsáveis por transportar ou sequestrar íons de ferro do meio extracelular. Apesar de possuírem apenas 13% de identidade as duas estruturas possuem um RMSD de 3,5 Å.

No:	Chain	Z	rmsd	lali	nres	%id	PDB	Description
1:	3quj-B	24.9	3.4	253	304	19	PDB	MOLECULE: PHND, SUBUNIT OF ALKYLPHOSPHONATE ABC TRANSPORTER
2:	3p7i-A	24.7	3.4	253	300	19	PDB	MOLECULE: PHND, SUBUNIT OF ALKYLPHOSPHONATE ABC TRANSPORTER
3:	3qk6-A	24.7	3.5	253	304	19	PDB	MOLECULE: PHND, SUBUNIT OF ALKYLPHOSPHONATE ABC TRANSPORTER
4:	3n5l-A	24.6	3.4	255	306	18	PDB	MOLECULE: BINDING PROTEIN COMPONENT OF ABC PHOSPHONATE TRAN
5:	3quj-A	24.6	3.5	253	301	19	PDB	MOLECULE: PHND, SUBUNIT OF ALKYLPHOSPHONATE ABC TRANSPORTER
6:	3quj-D	24.6	3.4	250	287	19	PDB	MOLECULE: PHND, SUBUNIT OF ALKYLPHOSPHONATE ABC TRANSPORTER
7:	3quj-C	24.5	3.5	252	284	19	PDB	MOLECULE: PHND, SUBUNIT OF ALKYLPHOSPHONATE ABC TRANSPORTER
8:	3qk6-B	24.4	3.6	255	308	18	PDB	MOLECULE: PHND, SUBUNIT OF ALKYLPHOSPHONATE ABC TRANSPORTER
9:	3n5l-B	24.4	3.5	256	302	19	PDB	MOLECULE: BINDING PROTEIN COMPONENT OF ABC PHOSPHONATE TRAN
10:	3s4u-A	18.8	5.8	249	302	19	PDB	MOLECULE: PHND, SUBUNIT OF ALKYLPHOSPHONATE ABC TRANSPORTER
11:	3usd-A	18.8	3.5	247	335	13	PDB	MOLECULE: LACTOTRANSFERRIN;
12:	2nwj-A	18.7	3.5	248	341	13	PDB	MOLECULE: LACTOTRANSFERRIN;
13:	3ib0-A	18.6	3.5	247	341	13	PDB	MOLECULE: LACTOTRANSFERRIN;
14:	3hwv-A	18.6	3.5	247	341	13	PDB	MOLECULE: LACTOTRANSFERRIN;
15:	3vdf-A	18.6	3.5	248	335	13	PDB	MOLECULE: LACTOTRANSFERRIN;
16:	3v5a-A	18.6	3.5	246	335	13	PDB	MOLECULE: LACTOTRANSFERRIN;
17:	4grk-A	18.6	3.5	247	335	13	PDB	MOLECULE: LACTOTRANSFERRIN;
18:	4dig-A	18.6	3.5	247	335	13	PDB	MOLECULE: LACTOTRANSFERRIN;
19:	2px1-A	18.6	3.5	248	341	13	PDB	MOLECULE: LACTOTRANSFERRIN;
20:	3v83-D	18.5	3.6	248	675	14	PDB	MOLECULE: SEROTRANSFERRIN;

Figura 51. Resultado da busca pelo Dali Server¹⁸⁴. As 20 estruturas com maior cobertura e menor RMSD no banco de dados do pdb usando as coordenadas atômicas de XAC2383 como *input*. *Chain*: Identificação da cadeia do modelo depositado no pdb. *Z score*: Medida da confiança da do resultado da busca. Um *Z score* maior que 10 indica ligação evolutiva entre as proteínas. RMSD (root mean square deviation): Medida de distância média da posição entre os átomos da cadeia principal da proteína e XAC2383. *Lali*: Número de posições alinhadas nos dois modelos. *Nres*: Número de resíduos na estrutura. *%id*: Identidade entre as duas proteínas.

A

B

Figura 52. Comparação das estruturas de XAC2383 e PhnD de *Escherichia coli*. A) Sobreposição das estruturas tridimensionais de XAC2383 (azul) e PhnD (amarelo) (PDB ID: 3P7I). Nota-se que aparentemente a estrutura de PhnD está em uma conformação mais fechada que XAC2383, havendo um menor espaço entre os dois lobos. B) Comparação entre as estruturas secundárias de XAC2383 (azul) e PhnD (amarelo). Há uma grande semelhança entre a sequência de estruturas secundárias ao longo da cadeia polipeptídica das duas proteínas, as maiores diferenças ficam no tamanho de algumas fitas-beta e alfas-hélices e na presença de uma alfa-hélice adicional no C-terminal de PhnD.

4.16. XAC2383 foi cristalizada com um íon de cloreto ligado em sua fenda central

Curiosamente, ao analisar a região da fenda entre os dois lobos de XAC2383 encontramos uma densidade eletrônica correspondente a um átomo e com distâncias de coordenação muito longas para ser de oxigênio ou de um metal, acima de 3,2 Å (Figura 53) ¹⁸¹. Essas distâncias são compatíveis a de um íon cloreto e o número de 4 coordenações é o mais comum para este íon encontrado no banco de dados do PDB). Além disso, duas dessas coordenações são feitas pelos NHs do *backbone*, o que é característico do íon cloreto ¹⁸⁵. O cloreto fica localizado no fundo da fenda central da proteína, e ao sobrepor os modelos de XAC2383 com os homólogos PhnD e transferrina, este íon se localiza na mesma posição em que se encontra o fosfonato e o ferro nessas proteínas ^{176; 186}. A presença deste íon de cloro é explicada facilmente após considerar o procedimento de purificação e cristalização. A XAC2383 foi purificada através da coluna de troca iônica SP-Sepharose e foi eluída utilizando um gradiente de NaCl em concentrações acima de 300 mM.

A

B

Figura 53. Estrutura de XAC2383 ligada a um íon cloreto. A) Mapa de densidade eletrônica 2Fo-Fc mostrando a densidade do íon cloreto e três das quatro coordenações sofridas por ele. B) Estrutura de superfície de XAC2383 mostrando o cloreto (verde) situado na fenda da proteína. A proteína está colorida de acordo com o seu potencial de cargas, quanto mais azul mais eletropositivo, quanto mais vermelho mais eletronegativo.

4.17. XAC2383 possui uma fenda central carregada positivamente

A interface entre os dois lobos gera uma fenda central onde encontramos densidade eletrônica de um íon de cloro. Esta fenda é revestida por muitos resíduos carregados positivamente o que pode ter facilitado a entrada do íon cloreto para o local onde ele é encontrado. Quando representamos a superfície de XAC2383, fica bem claro observar que a fenda se destaca como uma região altamente positiva que poderia acomodar além do íon cloreto, moléculas maiores. Esta característica da fenda pode indicar a natureza de possíveis ligantes da proteína, como ligantes polares e carregados negativamente (Figura 54). Diferentemente de XAC2383, a fenda central de PhnD de *E. coli* possui uma superfície eletrostática com características mais eletronegativas que positivas. Isso explica porque a PhnD liga ao 2-aminoetilfosfonato, uma molécula que possui uma porção amino e precisa de resíduos carregados negativamente para que a ligação ocorra (Figura 55).

Figura 54. Modelos de superfície de XAC2383. A) Modelo que indica a distribuição de cargas em duas faces da molécula rotacionadas 180° uma em relação à outra. B) Cavidade carregada positivamente formada entre os lobos (seta amarela). Vermelho indica regiões com resíduos carregados negativamente, branco neutro e em azul resíduos carregados positivamente.

Figura 55. Modelo de superfície com cargas de PhnD de *Escherichia coli* (PDB ID: 3S4U). Nota-se que diferentemente de XAC2383 a cavidade existente entre os lobos não é carregada positivamente.

4.18. *Screening* de ligantes através da técnica de *soaking*.

Devido ao fato de que PhnD de *E.coli* é a proteína caracterizada com maior identidade com XAC2383 (19%) e que ela se liga a fosfato e fosfonatos^{175; 176}, testamos algumas destas moléculas para tentar identificar possíveis ligantes de XAC2383.

Através da técnica de *soaking*, que consiste em colocar os cristais de proteína dentro de soluções contendo os ligantes, fizemos um *screening* e difratamos os cristais em busca de novas nuvens eletrônicas que correspondem à presença de ligantes dentro da fenda de XAC2383^{130; 181}. Todos os procedimentos de *soaking* foram feitos no próprio tampão em que a proteína se encontrava, com a adição do ligante a ser testado. Dessa forma, se o íon cloreto cedesse lugar ao ligante, isso implicaria que XAC2383 teria uma afinidade maior pelo ligante do que pelo cloreto visto que a concentração do ligante era de 2 mM, enquanto que a do cloreto era 300 mM.

Inicialmente testamos dois dos fosfonatos mais simples e que são encontrados naturalmente, o 2-aminoetilfosfonato e o ácido fosfonoacético, mas nenhum deles foi capaz de se ligar à proteína o que foi verificado pela persistência da densidade eletrônica de somente um íon do cloro. A razão da escolha desses fosfonatos foi de que o primeiro (2-aminoetilfosfonato) é um dos fosfonatos mais abundantes e o que se liga com maior afinidade à proteína PhnD, e o segundo (ácido fosfonoacético) possui características eletronegativas, o que poderia facilitar a sua inserção na fenda de XAC2383. Esperávamos que, se XAC2383 fosse uma proteína que sentisse fosfonatos, iria se ligar a essas duas moléculas, mesmo não sendo seus ligantes naturais, de maior afinidade, assim como ocorre com PhnD que é capaz de se ligar a mais de 10 fosfonatos distintos com diferentes afinidades¹⁷⁵.

O próximo passo foi testar fosfatos e compostos que possuem fosfato no seu arcabouço, como o íon fosfato e pirofosfato, trifosfato e até nucleotídeos mono, di e trifosfatos (Tabelas 17 e

18). Identificamos que XAC2383 foi capaz de se ligar a fosfato, pirofosfato, e nucleosídeos trifosfatos (ATP e GTP) e todas essas interações ocorria basicamente entre o fosfato (gama fosfato nos nucleotídeos) e um motivo $_{152}\text{STS}_{154}$ de XAC2383. (Figura 56). Sabemos que nucleotídeos fosfato não atravessam membranas citoplasmáticas e aparentemente não existem níveis detectáveis de nucleotídeos fosfatos no periplasma, logo essa ligação não deve ser real ¹⁸⁷.

Testamos também outras moléculas que não se ligaram à XAC2383: nucleotídeos monofosfato, difosfatos, hexafosfato, e fitato, este último uma molécula contendo 6 fosfatos que é utilizada para armazenamento de fósforo em plantas ¹⁸⁸. O citrato tampouco se ligou à fenda, o testamos por ser uma molécula eletronegativa de tamanho compatível para ser acomodada na fenda positiva de XAC2383 e muito abundante em plantas cítricas. A Tabela 19 resume os ligantes testados através desse *screening*.

Tabela 19. Ligantes usados no *screening* por soaking.

Ligante	Detectado no mapa de densidade eletrônica (2Fo-Fc)
Íon fosfato	Sim
Pirofosfato	Sim
Nucleotídeos trifosfato (ATP e GTP)	Sim
Nucleotídeos difosfato (ADP)	Não
Nucleotídeos monofosfatos (AMP)	Não
Hexafosfato	Não
Ácido fosfonoacético	Não
2-aminoetilfosfonato	Não
Citrato	Não
Fitato	Não

Figura 56. Mapa de densidade eletrônica 2Fo-Fc na região da fenda de XAC2383 com os diversos ligantes. A) Fosfato. B) Pirofosfato. C) ATP. D) GTP. Somente foi observada densidade eletrônica para o trifosfato do GTP. Isso pode ser explicado por uma flexibilidade da porção nucleosídica.

4.19. Caracterização da cepa nocaute em *xac2383*.

A cepa nocaute de *xac2383* foi construído de forma não-polar conforme descrito no tópico Materiais e Métodos. A motilidade tipo *sliding* de *XAC*Δ2383 em meio SB 0,5% ágar foi diminuída quando comparada com a cepa selvagem. Este fenótipo é exatamente o oposto daquele observado para o nocaute *XAC*Δ2382 (Figura 29). Além da motilidade, nenhuma outra característica morfológica das colônias de *XAC*Δ2383 foi alterada (Figura 57). A transformação da cepa *knockout* com o vetor contendo a construção pBRA2383_{full-length} (foi utilizada a construção *full-length* contendo o peptídeo sinal existente para a localização periplasmática para o correto endereçamento da proteína) aumentou a motilidade *sliding* em comparação à cepa selvagem, chegando a ficar com tamanho equivalente à cepa nocaute *XAC*Δ2382 dos ensaios anteriores (Figura 29). Assim, observamos efeitos opostos na motilidade *sliding* para os nocautes de *xac2382* e *xac2383*.

Figura 57. Ensaio de motilidade sliding em meio SB 0,5% ágar com 0,2% de arabinose das cepas selvagem e *XAC*Δ2383. A cepa *XAC*wt foi transformada com o vetor pBRA vazio e a cepa *XAC*Δ2383 com o vetor pBRA vazio e com o vetor contendo o gene *xac2383*.

Esse resultado nos mostra que XAC2383 também é uma proteína que controla a motilidade de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. A cepa nocaute provoca uma diminuição da motilidade da bactéria possivelmente por efeito de maior atividade do domínio GGDEF de XAC2382 enquanto a super-expressão de XAC2383 tem o efeito oposto, possivelmente exercendo um efeito inibitório na atividade de diguanilato ciclase, ou até mesmo aumentando a atividade de fosfodiesterase do domínio EAL de XAC2382. Esse fenótipo observado na super-expressão de XAC2383 é comparável ao fenótipo observado no nocaute de XAC2382, com um grande aumento na motilidade (Figura 29). O ligante, ainda desconhecido, que modula este processo pode estar presente no meio de cultura SB, visto que o ensaio é realizado em meio rico.

4.20. XAC2383 com mutação no sítio de ligação deixa de afetar a motilidade

Através da estrutura cristalográfica identificamos o motivo $_{152}\text{STS}_{154}$ (Figura 38) que se situa no centro da fenda de XAC2383 e é responsável por se ligar ao fosfato. De posse desta informação, mutamos esse motivo para três alaninas e avaliamos o fenótipo de super-expressão desta proteína no nocaute em *Xac2383*. Diferentemente da super-expressão da proteína selvagem, a super-expressão da proteína mutante $\text{XAC2383}_{\text{STS152-154AAA}}$ não foi capaz de provocar o aumento da motilidade de *X. citri* (Figura 59).

Figura 58. Motivo $_{152}STS_{154}$ no centro da fenda de XAC2383 com uma molécula de fosfato ligada.

Figura 59. Ensaio de motilidade *sliding* em meio SB 0,5% com 0,02% de arabinose das cepas $XAC\Delta 2383$ com vetor vazio e super-expressando XAC2383 selvagem e com mutação sítio dirigida no motivo de ligação aos ligantes ($XAC2383_{STS152-154AAA}$). Imagens fotografadas após 4 dias a 30°C.

4.21. A mutação STS152-154AAA criada em XAC2383 parece afetar a interação com o domínio periplasmático de XAC2382

Para verificar se a mutação criada em $_{152}\text{STS}_{154}$ afetaria a interação entre XAC2383 e XAC2382₃₇PERI₁₉₂ clonamos esse mutante em vetor de expressão pET3a e testamos sua co-expressão com a construção em pET28a XAC2382₃₇PERI₁₉₂ com cauda de histidina e aplicamos em coluna de níquel exatamente nos mesmos moldes experimentais do ensaio da Figura 23. Observamos que a mutação no motivo $_{152}\text{STS}_{154}$ para $_{152}\text{AAA}_{154}$ não é suficiente para abolir completamente a interação entre as duas proteínas, embora pareça reduzir a afinidade visto que pouca proteína XAC2383 foi eluída juntamente com XAC2382₃₇PERI₁₉₂, sendo a maioria eluindo na fração não ligado (Figura 60). Mais ensaios necessitam ser feitos para avaliar a interação da proteína mutante XAC2383_{152AAA154} e XAC2382₃₇PERI₁₉₂.

Figura 60. Eletroforese SDS 12% da purificação em coluna de níquel da co-expressão XAC2382₃₇PERI₁₉₂ contendo cauda de histidina e XAC2383_{STS152-154AAA} sem cauda de histidina. Aparentemente a mutação no motivo $_{152}\text{STS}_{154}$ para $_{152}\text{AAA}_{154}$ diminuiu a interação XAC2382₃₇PERI₁₉₂ com XAC2383_{152AAA154} mas não foi suficiente para abolir a interação completamente. Canaletas: 1: Sobrenadante da co-expressão XAC2382₁₅₂PERI₁₅₄; 2: fração correspondente ao pellet; 3: Fração que não se ligou à coluna (Flow-through); 4: Fração de lavagem (Wash); 5 a 14: Frações eluídas da coluna após aplicação de gradiente de imidazol.

4.22. Contribuição de XAC2382 e XAC2383 na formação de biofilme

Biofilme é uma estrutura formada por um conjunto de microorganismos que se agregam uns aos outros em uma superfície em meio à exopolissacarídeos secretados. Sabendo-se que as enzimas que controlam níveis gerais de c-di-GMP afetam a motilidade de forma inversa ao biofilme também avaliamos a contribuição destas proteínas para este fenótipo (Figura 7) ⁴⁹.

Neste ensaio deixamos as bactérias a uma densidade ótica de 1,0 a 600nm em 2mL de meio 2xTY a 30°C em repouso absoluto. Após dois dias, com o auxílio de uma pipeta de transferência e com cuidado para não ressuspender o biofilme formado na parede do tubo, retiramos o meio de cultura e adicionamos 2 mL de solução cristal violeta 0,2%. Após 20 minutos os tubos foram lavados cuidadosamente com água e fotos foram tiradas dos tubos. O biofilme formado em tubos de ensaio de vidro após 2 dias pela cepa XACΔ2382 efetivamente foi menor que a cepa selvagem, em meio rico 2xTY (Figura 61). Neste ensaio o cristal violeta cora o biofilme formado pelas bactérias e se adere à parede do tubo. Quanto mais violeta o tubo, mais biofilme formado. Essa diminuição na formação de biofilme vai de acordo com os resultados de motilidade, tratando-se de uma enzima que regula os níveis de c-di-GMP. Dessa forma, este ensaio de formação de biofilme indica que assim como o ensaio em meio semi sólido, em meio líquido nas condições testadas a bactéria XACΔ2382 comporta-se como se houvesse uma diminuição nos níveis de c-di-GMP.

Figura 61. Ensaio de formação de biofilme. Cepas selvagens (*XACwt* + pBRA) e knockout (*XACΔ2382* + pBRA) após dois dias em repouso a 30°. Coloração com Cristal Violeta 0,2 %.

Como este ensaio requer no mínimo um volume de 2 mL de cultura de bactéria, e, portanto o mesmo volume de cristal violeta (Materiais e Métodos), a quantificação ficou comprometida, já que pequenas variações do corante cristal violeta eram capazes de provocar erros significativos na leitura no espectrofotômetro. Partimos então para fazer ensaios semelhantes em placa de ELISA utilizando um volume de 250 μ L de cultura bacteriana. O fato de a coloração e a leitura serem feitas no mesmo poço do ensaio, sem a necessidade de transferir a solução para uma cubeta de espectrofotômetro, nos permitiu quantificar a ocorrência de biofilme nas cepas *XACΔ2382* e demais super-expressões (Figura 62). O nocaute em *xac2382* diminuiu a formação de biofilme em mais de 50%. Assim como no ensaio de motilidade, as super-expressões das construções *full-length* HAMP-GGGDEF foram capazes de retornar o fenótipo igual à da cepa selvagem. A construção com mutação no domínio GGDEF de *XAC2382*, não retornou o fenótipo da cepa selvagem, indicando que a atividade de diguanilato ciclase é importante para o aumento do biofilme.

De forma diferente do ensaio de motilidade, o nocaute em *xac2383*, bem como sua super-expressão não afetaram a formação de biofilme.

Figura 62. Ensaio de formação de biofilme em placa de ELISA. Bactérias a uma D.O_{600nm} de 1,0 foram deixadas em repouso a 30°C por dois dias em um volume de 150μL em placa de ELISA de 96 wells. Após este período o meio foi retirado com uma micropipeta, os wells foram lavado com água e foram adicionados 150 μL de cristal violeta 0,2%. Após uma segunda lavagem com água foi adicionado 150 μL de etanol 70% e as placas foram submetidas à leitura a 590 nm.

4.23. XAC0495, uma proteína GGDEF-EAL degenerada

XAC0495 possui os domínios RR (regulador de resposta), GGDEF e EAL (Figura 16). Após expressão da XAC0495 na forma recombinante em *E. coli* ela foi encontrada na fração solúvel. A proteína foi então purificada por afinidade em coluna de níquel e por gel filtração S75 (Figura 63). Assim como XAC2398 (FimX), essa proteína possui ambos os domínios de diguanilato ciclase e fosfodiesterase degenerados, não catalisando a reação de síntese e degradação (Tabelas 11 e 12).

Figura 63. Gel SDS-PAGE 15% das etapas de purificação de XAC0495. Canaletas: 1: Amostra não induzida; 2: Fração sobrenadante do lisado induzido; 3: Fração pellet do lisado induzido; 4: Fração de XAC0495 purificada após coluna de níquel e gel filtração S75; 5: Padrão de massa molecular.

XAC0495 possui um domínio regulador de resposta REC no seu amino terminal. Estes domínios frequentemente fazem parte de sistemas de dois componentes de sinalização em parceria com uma proteína histidina quinase cognato. Nestas vias de sinalização, um grupo fosfato é transferido da histidina quinase para a cadeia lateral de um aspartato no domínio REC. No caso de XAC0495, o resíduo Asp₁₁₆ é o mais provável candidato para receber a fosforilação

enquanto a sua histidina quinase cognato provavelmente é a proteína XAC0494, que é inserida na membrana por dois trechos (resíduos 10-28 39-57) (Figura 64).

Figura 64. Arquitetura da proteína GGDEF-EAL XAC0495 e sua provável histidina quinase cognata XAC0494.

4.24. XAC0495 se comporta como um monômero em solução

A massa aparente de XAC0495 após eluição em um ensaio de gel filtração analítica é de 87,7 kDa (Figura 65). Esta massa é intermediária entre a de um monômero (65,4 kDa) e um dímero (130,8 kDa), podendo significar a existência de um equilíbrio entre as duas formas, ou a um monômero alongado. Como era de se esperar pela ausência de resíduos importantes para a atividade catalítica (Tabelas 11 e 12). Ensaio de atividade de diguanilato ciclase e de fosfodiesterase em c-di-GMP foram realizados e nenhuma atividade foi detectada (dados não mostrados).

Figura 65. Calibração da gel filtração analítica Superdex 200. XAC0495 é eluída com uma massa aparente de 87,7 kDa. Os padrões utilizados para a calibração foram: citocromo c (12,4 kDa), anidrase carbônica 29 (kDa), albumina (66 kDa), álcool desidrogenase 150 (kDa) e β -amilase 200 (kDa). O polímero Blue Dextran (2000 kDa) foi usado para medir o volume morto da coluna (V_0).

Diversos trabalhos utilizam o reagente fluoreto de berílio (BeF_3^-) para simular fosforilações em domínios reguladores de resposta, devido à instabilidade dessa fosforilação nos resíduos de aspartato. O fluoreto de berílio é utilizado porque possui a mesma geometria tetraédrica e o mesmo potencial eletrostático que o íon fosfato, sendo assim capaz de se ligar no mesmo sítio^{36; 189; 190}. Após incubar XAC0495 com 1 mM de BeF_3^- realizamos ensaio de gel filtração analítica em coluna S200 e a proteína foi eluída próxima do volume de exclusão da coluna o que indica uma formação de altas massas moleculares (Figura 66). É possível que o BeF_3^- esteja provocando uma agregação de XAC0495 devido ao efeito de simulação de fosforilação. Novos experimentos precisam ser realizados para resolver esta questão.

Paralelamente, foram feitos ensaios de gel filtração analítica com XAC0495 adicionando os nucleotídeos c-di-GMP e GTP. Nenhuma diferença no tempo de retenção foi observada entre essas condições indicando que não há alteração de estado oligomérico após adição dos nucleotídeos (Figura 67).

Figura 66. Gel filtração analítica de XAC0495 em coluna S200 de 23 mL. Linha magenta: Absorbância 220 nm de XAC0495 antes de tratamento com BeF_3^- . **Linha azul:** XAC0495 tratada com 1 mM de BeF_3^- . Tampão 50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 1mM MgCl_2 .

Figura 67. Gel filtração analítica de XAC0495 em coluna S200 200 mL. **Linha vermelha:** Absorbância a 220 nm de XAC0495 apo. **Linha azul:** Absorbância a 220 nm de XAC0495 pré incubada 200 μ M de c-di-GMP. **Linha magenta:** Absorbância a 220 nm de XAC0495 pré incubada com 1mM de GTP.

Através de ensaios de espalhamento de luz a baixo ângulo (SAXS) realizado e analisado em conjunto com o aluno de doutorado do nosso laboratório Gabriel Oka, observamos que XAC0495 é mesmo um monômero em solução e possui um formato alongado como observado pelo envelope gerado através do programa DAMMIF¹¹⁹ (Figura 68). Estes dados de SAXS explicam o resultado observado no experimento de gel filtração analítica, no qual é eluída com uma massa entre a de um monômero e a de um dímero. Assim, pode-se descartar a existência de um equilíbrio entre a forma monomérica e dimérica nas condições observadas. FimX de *P. aeruginosa*, uma GGDEF-EAL também degenerada e que possui uma arquitetura semelhante à XAC0495, também possui uma forma alongada e apesar de ser um dímero em solução, é eluída na gel filtração com uma massa aparente de um tetrâmero⁶⁵. As curvas de SAXS de XAC0495 quando adicionados GTP ou c-di-GMP não sofreram grandes alterações o que indica que não são

observadas diferenças estruturais tais como conformação, flexibilidade e estado de oligomerização entre as três condições analisadas (Figura 68) (Tabela 20).

Figura 68. A) Função de distribuição de distâncias de Xac0495 APO. B) Modelo de Xac0495. Em cor gelo está o envelope molecular obtido pelo programa DAMMIF¹¹⁹ a partir da $p(R)$ ¹¹⁸, interno ao envelope está superposto uma representação em fitas de Xac0495 a partir do programa de modelagem molecular SAXSTER¹²¹. As cores do modelo de fitas do N para o C terminal, verde, amarelo e azul são respectivamente os domínios REC (1-201), GGDEF (202-360) e EAL (361-596).

Figura 69. Curvas de SAXS de Xac 0495. A) Curvas de espalhamento de SAXS de Xac0495 na presença de c-di-GMP (vermelho), GTP (azul) na forma apo (verde). B) Curva de Gunier Plot.

Tabela 20. Parametros fisicos de Xac0495 obtidos a partir das analises das curvas de SAXS.

Curva	Rg real (A)	Distancia maxima (A)	Volume de Porod A ³
APO	42.71	140	115831
GTP	43.02	145	107534
c-di-GMP	41.53	135	114615

*O Raio de Giro real e a distância máxima são estimados a partir da p(r) obtida pelo programa Gnom. O volume considerado foi o obtido pela lei de Porod.

Ensaio de desnaturação térmica monitorada por dicroísmo circular, mostraram que XAC0495 sofre uma significativa transição de estrutura secundária em alta temperatura, aproximadamente 81,5 °C. A temperatura de desnaturação não é afetada quando adiciona-se GTP ou c-di-GMP. Houve um aumento de aproximadamente 5 °C na temperatura de desnaturação ao adicionar BeF_3^- , possivelmente por alterar o estado oligomérico da proteína, tornando-a mais estável (Figura 70).

Figura 70. Ensaio de desnaturação térmica de XAC0495 monitorado por dicroísmo circular. O tampão usado no experimento foi 10mM Tris pH 8, 10mM NaCl, 1mM MgCl₂. Proteína na concentração de 10 µM foi utilizada e o comprimento de onda de 215 nm.

O gene *xac0495* está situado no mesmo cluster de *xac0495* que está anotado como sendo uma proteína contendo um domínio transmembrana, um domínio de *histidina kinase*, um domínio de ATPase *histidina kinase-like*, um domínio CheY e um domínio *histidina fosfotransferência* (*Hpt*). A proximidade destes dois genes indica que eles podem formar um sistema de dois componentes e sendo assim, condições específicas sentidas pela histidina quinase XAC0494 possam modular fosforilação de XAC0495 fazendo-a interagir com alvos específicos ainda desconhecidos.

O *nocaute* polar de *xac0495* foi construído com o vetor suicida pNPTS por Maxuel Andrade, ex aluno de doutorado em nosso laboratório¹¹². Este mutante tem sua motilidade em meio SB ágar 0,5% aumentada (Figura 71). Esse efeito provavelmente se deve via interações de

XAC0495 com proteínas que regulam a motilidade bacteriana, assim como FimX interage e participa da regulação do pilus tipo IV ⁶⁶.

Figura 71. Ensaio de motilidade em meio SB ágar 0,5%. O nocaute em *xac0495* (as duas colônias na parte de baixo da placa) possui uma motilidade aumentada em relação ao selvagem (colônia acima). Retirado da tese de doutorado de Maxuel Andrade¹¹².

5. DISCUSSÃO

5.1. Predição de atividade das proteínas GGDEF-EAL de *Xac*

Entre as 11 proteínas GGDEF-EAL de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, 8 possivelmente possuem o domínio de diguanilato ciclase inativo, ou por possuírem substituições no motivo GGDEF que acabaram por abolir a atividade de WspR, ou por possuírem mutações em resíduos que coordenam metais ou se ligam à base em PleD. O sítio inibitório RXXD é encontrado em 4 destas proteínas, sendo somente 1 delas provavelmente uma diguanilato ciclase ativa. Assim como em domínios GGDEFs ativos, o sítio I nestas proteínas poderia ter a função de impedir a dimerização destes domínios ao ligar c-di-GMP, mas ao contrário de regular a atividade enzimática, acabaria por controlar outras funções, como por exemplo, a interação proteína-proteína.

Em relação ao domínio EAL, o contrário é observado. Das 11 proteínas, 9 provavelmente são ativas, porque possuem todos os resíduos responsáveis pela ligação ao metal e à base, além da presença da lisina que funcionaria como base geral. Essas proteínas classificadas como ativas, no máximo chegam a ter uma ou duas substituições no loop 6, o que não deve ser suficiente para a perda de atividade. As duas que provavelmente são inativas (XAC0495 e XAC2398), faltam resíduos de coordenação do metal e possuem várias substituições no loop 6 que é responsável para a dimerização do domínio. Trabalhos anteriores da ex-aluna do laboratório Cristiane Guzzo confirmam a predição de que XAC2398, conhecida como FimX, possui um domínio EAL inativo e regula a motilidade de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* através de interação proteína-proteína, e não de sua atividade enzimática ^{66; 67}.

Desta forma, a maioria das proteínas com GGDEF-EAL de Xac envolvidas na produção e degradação de c-di-GMP (6 proteínas), possuem os domínios de diguanilato ciclase degenerados, ao mesmo tempo que possuem os domínios de fosfodiesterases conservados. Duas das proteínas possuem ambos os domínios degenerados, e três delas possuem ambos os domínios conservados. Nenhuma das proteínas de Xac possui o domínio diguanilato ciclase conservado ao mesmo tempo em que possui o de fosfodiesterase degenerado (Tabela 21).

Tabela 21. Tabela com resumo da predição das atividades de diguanilato ciclase e fosfodiesterase das proteínas de Xac contendo ambos os domínios GGDEF e EAL.

Proteínas	Domínio GGDEF	Domínio EAL
3 (XAC1993; XAC2382; XAC2812)	+	+
0	+	-
6 (XAC1795; XAC1887; XAC1938; XAC1992; XAC2152; XAC2711)	-	+
2 (XAC0495; XAC2398)	-	-

* Os domínios quando conservados e degenerados foram representados pelos símbolos + e -, respectivamente.

Em um trabalho em que foram analisados mais de 11000 GGDEF-EALs presentes em mais de 800 genomas foi mostrado que existem dois grandes grupos destas proteínas: i) Ambos os domínios GGDEF e EAL são conservados, e neste caso existem domínios acessórios que controlam a atividade de um ou outro domínio. ii) O domínio EAL é conservado enquanto o GGDEF é degenerado, este último passando a exercer outra função que não a de catalizar a produção de c-di-GMP ⁷⁶. *Xanthomonas citri* subsp. *citri* com a maioria das proteínas possuindo o domínio de fosfodiesterase conservado e o de diguanilato ciclase degenerado, além de outras

três com conservação em ambos os domínios, aparentemente segue essa mesma tendência das GGDEF-EALs depositadas em banco de dados de sequências.

5.2. Atividade *in vivo* de XAC2382

Não foi possível detectar atividade de diguanilato ciclase e nem de fosfodiesterase de c-di-GMP nas construções solúveis de XAC2382 purificadas, possivelmente porque a proteína estava no estado monomérico, incompatível com as atividades de síntese e degradação de c-di-GMP. Para a construção XAC2382₂₄₉HG₄₄₆ foram realizados ensaios de desnaturação térmica monitorado por dicroísmo circular e a proteína sequer é capaz de se ligar ao substrato GTP.

O conjunto de resultados de atividade de diguanilato ciclase em *E.coli* e da complementação de XAC2382 em *Xanthomonas citri* subsp. *citri* indicam que *in vivo* as construções *full-length*, e todas contendo os domínios HAMP-GGDEF e HAMP-GGDEF-EAL estão produzindo c-di-GMP nas células como observado pela coloração vermelha em células de *E.coli* e pelos fenótipos característicos de alta do segundo mensageiro em Xac, tais como diminuição da motilidade, agregação e rugosidade. Os resultados também indicam que para exercer a atividade de diguanilato ciclase, o domínio GGDEF precisa do domínio HAMP, provavelmente para ajudar na dimerização e aproximação dos domínios necessária para a catálise. A construção sem o domínio HAMP não reverteu o fenótipo provavelmente porque o domínio GGDEF sozinho não realiza uma correta aproximação de outro GGDEF para que ocorra a reação. Em todas as condições testadas a atividade de diguanilato ciclase é sobressalente à de fosfodiesterase. O domínio EAL deve precisar de algum sinal que pode ser sentido pelo domínio periplasmático, transmitido pelo HAMP e GGDEF para ficar ativa.

A mutação gerada no sítio ativo do domínio GGDEF abole os fenótipos de agregação, rugosidade e diminuição da motilidade e corrobora a hipótese de que estes fenótipos são causados pela produção de c-di-GMP. A mutação gerada com o intuito de afetar a formação da estrutura de *coiled coil* do domínio HAMP também afetou a atividade de diguanilato ciclase mostrando mais uma vez a importância deste domínio para a função de XAC2382 em controlar a motilidade.

5.3. Envolvimento de XAC2382 na virulência de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Evidentemente, XAC2382 não é uma proteína essencial para a virulência, mas deve contribuir para a entrada da bactéria no tecido vegetal. Um ensaio similar a este já havia sido realizado em nosso laboratório por Maxuel Andrade¹¹² mas na ocasião as bactérias foram injetadas com uma agulha dentro da folha. Por XAC2382 ser uma proteína que regula a motilidade de Xac, é possível que esta proteína seja importante para um ajuste fino da motilidade da bactéria na superfície da folha, tendo a cepa selvagem uma vantagem sobre a nocaute na entrada da bactéria através dos estômatos foliares.

O envolvimento de outras proteínas contendo domínios GGDEFs já foi descrito em *Xanthomonas campestris*, nenhuma delas sendo essencial. O duplo knockout em XC_0249 e XC_0420 diminuiu significativamente a virulência de *X. campestris*, enquanto os nocautes simples reduziram pouco²⁰. Os genes homólogos em *Xanthomonas citri* subsp. *citri* são Xac0258 e Xac0424, que assim como Xac2382 codificam para diguanilatos ciclases ativas.

5.4. Interação XAC2382-XAC2383

A interação entre o domínio periplasmático de XAC2382 e XAC2383 parece ocorrer na proporção de 2:1. Para LapD, a GGDEF-EAL de *Pseudomonas fluorescens* que possui uma arquitetura mais semelhante a XAC2382, a interação de seu domínio periplasmático ocorre com uma protease periplasmática também na proporção de 2:1 (Figura 72). Apesar da porção periplasmática de XAC2382 não possuir identidade de sequência com a porção equivalente de LapD, ambas possuem relações evolutivas com os domínios PAS, provavelmente conservando a topologia típica destas proteínas. É muito provável que a porção periplasmática de XAC2382 possua a estrutura semelhante de acordo com a predição de estrutura secundária (Figura 25). Esperamos conseguir melhores dados de difração por raios X dos cristais provenientes da purificação do complexo XAC2382₃₇PERI₁₉₂ para tentar resolver a estrutura.

Figura 72. Complexo LapD-LapG de *Pseudomonas fluorescens* na proporção de 2:1. No lado esquerdo há as duas subunidades do domínio periplasmático de LapD (cadeia A e cadeia B). No lado direito há a estrutura do LapG em que os lobos N- e C-terminal são coloridos de azul e cinza respectivamente. Retirado de Chatterjee et. al ¹⁹¹.

O motivo $_{152}\text{STS}_{154}$ situado no centro da fenda da estrutura de XAC2383 e responsável por fazer a ligação com o fosfato dos ligantes testados parece ser importante para a ligação à XAC2382₃₇PERI₁₉₂ visto que a mutação deste motivo afetou a formação do complexo, embora não tenha abolido completamente tal interação. Dados na literatura indicam que as *periplasmic binding proteins* sofrem uma grande mudança conformacional ao se ligarem às seus ligantes, passando a sair de uma conformação mais aberta e flexível, para uma mais fechada ¹⁹². É possível que a ligação de moléculas ao centro da fenda de XAC2383 gere uma mudança conformacional que pode modular a ligação ao domínio periplasmático de XAC2382.

5.5. Estrutura cristalográfica de XAC2383

É possível que XAC2383 cristalizou espontaneamente nos tubos coletores de fração logo após sair da coluna devido ao gradiente de NaCl aplicado para eluir a proteína da coluna. O íon cloteto em altas concentrações (>300 mM) se ligou ao centro da fenda proteica e pode ter estabilizado uma conformação mais rígida, propensa a cristalizar. De fato se conhece que essas proteínas com a topologia PBP (*periplasmic binding protein*) sofrem uma grande mudança conformacional ao interagir com ligantes ¹⁹³.

Diferentemente das proteínas PhnD pertencentes aos transportadores do tipo ABC, XAC2383 parece não se ligar aos fosfonatos testados. Mais experimentos tais como fluorimetria e dicroísmo circular precisam ser feitos para confirmar essa não-ligação às essas moléculas. Em *Mycobacterium smegmatis* foi encontrada uma dessas proteínas responsável por se ligar e transportar moléculas de fosfato ao invés de fosfonatos e essa diferença de especificidade não pôde ser identificada através da sequência primária ¹⁹⁴. As ligações de fosfato inorgânico, pirofosfato e nucleotídeos trifosfatos evidenciadas nos mapas de densidade eletrônico podem indicar a natureza do ligante de XAC2383, que deve possuir no mínimo um arcabouço fosfato, que parece ser a base da ligação ao fundo da fenda da proteína. É um grande desafio identificar ligantes putativos a moléculas sensoras. Nos últimos 15 anos muitos avanços foram feitos, mas ainda é necessário mais investigações principalmente através de experimentos *high-throughput* utilizando uma extensa biblioteca de ligantes e diferentes tipos destes domínios ¹⁹⁵. Para se ter uma ideia da variedade de moléculas sentidas, proteínas envolvidas na percepção de sinal que compartilham com XAC2383 a topologia PBP (*periplasmic binding proteins*), podem sentir desde moléculas envolvidos em quorum sensing (*Autoinducer-2*) ¹⁹⁶ a poliaminas ¹⁹⁷ e molibdato

5.6. Um modelo do para XAC2382-XAC2383 no controle da motilidade de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

O aumento de motilidade do tipo *sliding* observado no nocaute em *xac2382* relaciona a função deste gene com a motilidade bacteriana. Pelo fato de XAC2382 ser uma enzima que possui domínios conhecidamente reguladores da síntese e degradação de c-di-GMP e sabendo que os níveis intracelulares deste segundo mensageiro controlam fenótipos relacionados ao estilo de vida bacteriano, entre eles a motilidade, podemos traçar um modelo de funcionamento desta proteína. Nas condições testadas temos evidências de que XAC2382 está com o domínio GGDEF ativo, constatado através dos fenótipos provocados pela super-expressão desta enzima e abolidos com mutações que afetariam a dimerização do domínio HAMP e a atividade de diguanilato ciclase. XAC2382 parece não precisar de nenhum sinal externo para ativar a produção de c-di-GMP via seu domínio de diguanilato ciclase, já que as construções contendo o domínio HAMP-GGDEF sem a porção periplasmática, tem o mesmo efeito que a super-expressão da proteína *full-length* nas condições testadas.

O nocaute criado em *xac2383* revelou um fenótipo oposto ao do nocaute de *xac2382*, enquanto o segundo teve a motilidade aumentada, o primeiro teve a motilidade diminuída em relação ao selvagem. Ao super-expressar a proteína XAC2383, a motilidade de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* é aumentada de forma comparável ao nocaute em *xac2382*. Levando em consideração a interação provada entre XAC2383 e o domínio periplasmático de XAC2382 é razoável imaginar um mecanismo de regulação da motilidade via interação XAC2382-XAC2383 em que XAC2383 ao se ligar ao domínio periplasmático de XAC2382 diminuiria a atividade do domínio de diguanilato ciclase, GGDEF. A interação XAC2382-XAC2383 parece ocorrer na proporção de 2:1 (duas moléculas de XAC2382 e uma de XAC2383), assim XAC2383 deve

modificar a atividade do domínio GGDEF por um mecanismo diferente do de romper a dimerização de XAC2382, tais como mudanças conformacionais transmitidas através da membrana pelo domínio HAMP. Pelo contrário, o domínio periplasmático isolado teve uma massa aparente correspondente à de um monômero, parecendo dimerizar somente em contato com XAC2383. Mais ensaios precisam ser realizados para acessar como realmente funciona esta interação, tais como *cross-linking* mediado por glutaraldeído. O motivo $_{152}\text{STS}_{154}$ envolvido com a ligação do arcabouço de fosfato também se mostrou importante para a motilidade, visto que a super-expressão da proteína mutante XAC2383 $_{\text{STS152-54AAA}}$ não foi capaz de provocar o aumento de motilidade. Se o motivo $_{152}\text{STS}_{154}$ é importante para XAC2383 interagir com seu ligante natural, e sendo esta proteína um sensor periplasmático, o mutante XAC2383 $_{\text{STS152-54AAA}}$ perde sua função, logo é compreensível que a super-expressão deste mutante na cepa nocaute em *xac2383* não tenha nenhum efeito. Pode-se inferir também que o ligante natural sentido por XAC2383 possivelmente está presente no meio de cultura utilizado nos ensaios e que ele é importante para a interação XAC2382-XAC2383, visto que caso não estivesse presente a super-expressão da proteína selvagem ocasionaria o mesmo fenótipo da proteína mutante XAC2383 $_{\text{STS152-54AAA}}$, incapaz de se ligar ao ligante.

Com base no conjunto destes dados, um modelo pode ser proposto representando diferentes cenários.

- i) Em situações da complementação de XAC2382, imagina-se que há na célula de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* muito mais moléculas de XAC2382 do que moléculas de XAC2383. Assim sendo, o excesso das moléculas de XAC2382 funcionam como se estivessem desligadas de XAC2383, situação fenotípica compatível com alta produção de c-di-GMP (Figura 73).

Figura 73. Situação de super-expressão de XAC2382 em *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Este cenário resultará numa diminuição da motilidade causada por uma alta produção de c-di-GMP (círculos roxos) e ausência de interação XAC2382-XAC2383.

- ii) Em situações da complemetação de XAC2383 temos um cenário em que possuímos muito mais moléculas de XAC2383 que moléculas de XAC2382. Nesta situação todas as moléculas (dímeros) de XAC2382 estão com XAC2383 ligadas aos seus domínios periplasmáticos, mesmo com o ligante que pode modular a interação estando em pequena quantidade no meio do ensaio. Neste caso, XAC2383 diminuiria a atividade de diguanilato ciclase de XAC2382 e/ou ativaria o domínio de fosfodiesterase EAL (Figura 74).

Figura 74. Situação de super-expressão de XAC2383 em *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Este cenário implica uma constante interação entre XAC2382-XAC2383 o que pode gerar menores níveis de c-di-GMP (círculos roxos) que pode ser explicado por um aumento na motilidade observada. O ligante natural de XAC2383 (estrela amarela) pode estar presente no meio de cultura.

- iii) A complementação da proteína mutante XAC2383_{STS152-54AAA} deixa de provocar o fenótipo de aumento da motilidade. Devido à mutação no motivo conservado _{152STS154} que provavelmente participa da ligação ao ligante natural, é possível que XAC2383 deixe de interagir com XAC2382 por não estar na conformação adequada (Figura 75).

Figura 75. Situação de super-expressão de XAC2383_{152AAA154} incapaz de se ligar ao ligante natural. Neste cenário *Xanthomonas citri* subsp. *citri* não tem sua motilidade aumentada possivelmente pela menor interação entre XAC2382-XAC2383.

Os fenótipos opostos observados nos nocautes de XAC2382 e XAC2383 sinalizam para a existência de uma constante regulação XAC2382-XAC2383 na produção de c-di-GMP e consequente modulação da motilidade. XAC2383 parece ser importante em determinados momentos para frear a produção de c-di-GMP visto que sua ausência confere uma menor motilidade de Xac. Já a ausência da proteína XAC2382 provoca uma drástica mudança na motilidade bacteriana, que pode ser descrita como uma diminuição nos níveis de c-di-GMP em comparação com a cepa selvagem.

5.7.XAC0495 é um monômero alongado em solução

XAC0495 mostrou-se comportar como um monômero alongado em solução incapaz de se ligar aos nucleotídeos GTP e c-di-GMP nas condições testadas. Maiores caracterizações bioquímicas são necessárias em especial às que relacionam a interação e fosforilação com sua

putativa histidina quinase cognata XAC0494. Otimizações de ensaios de simulação de fosforilação, bem como ensaios de duplo híbrido irão ajudar a elucidar como ocorre a ativação e possíveis novos parceiros efetores de XAC0495, e sua relação com a regulação da motilidade.

Já foram reportados estudos funcionais envolvendo *xac0494* e *xac0495*, em um trabalho publicado por Li et.al¹⁹⁹. Através da produção de mutantes geradas por *transposons*, foi identificado que a mutação em *xac0494* afeta a produção de biofilme por diminuir a produção de exopolissacarídeos. XAC0494 foi nomeada por esses pesquisadores da Flórida de rbfS (regulation of biofilm formation sensor) e XAC0495 de rbfR (regulation of biofilm formation regulator). Além do biofilme, estes pesquisadores observaram que a motilidade em meio NB 0,7% estavam diminuídas no mutante em *xac0494*. Em nossos ensaios, o knockout em *xac0495* está com a motilidade em meio SB 0,5% aumentada (Figura 71). São observados dois fenótipos opostos para cada um dos mutantes em *xac0494* e *xac0495* nestes ensaios em que as condições experimentais são semelhantes. Esses resultados em conjunto indicam que nas condições testadas, XAC0494 inibe a ação de XAC0495 que por sua vez, esta última funciona para diminuir a motilidade de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. No entanto, os sinais que fazem ativar e desativar o sistema, assim como os alvos de XAC0495 ainda permanecem desconhecidos.

6. Conclusões

Xanthomonas citri subsp. *citri* possui 11 proteínas que contêm ambos os domínios GGDEF-EAL sendo que a maioria delas (6) provavelmente possui o domínio de síntese de c-di-GMP (GGDEF) inativo enquanto possui o domínio de degradação (EAL) ativo. Três possivelmente possuem ambos os domínios ativos enquanto duas dessas proteínas são preditas de possuírem o domínio EAL inativo.

XAC2382 é uma proteína inserida na membrana e que possui 4 domínios; um domínio periplasmático do tipo *PAS-like*, um domínio HAMP, um domínio GGDEF e um domínio EAL, estes dois últimos com os resíduos importantes para a catálise conservados. XAC2382 se mostrou importante para o controle da motilidade e do biofilme de *Xanthomonas*, como visto nos ensaios com a cepa nocaute neste gene. A complementação da cepa nocaute com fragmentos de XAC2382 mostrou que a proteína necessita de pelo menos os domínios HAMP-GGDEF para reverter o fenótipo e que a atividade de diguanilato ciclase é importante para este efeito.

O domínio periplasmático de XAC2382 também é encontrado em histidinas quinases e ele interage com XAC2383, uma proteína codificada por um gene presente no mesmo cluster de *xac2382*. XAC2383 também está envolvida na motilidade de *Xanthomonas*, evidenciado pelo fenótipo de redução da motilidade da cepa nocaute Δ XAC2383, fenótipo inverso ao de XAC2382. XAC2383 pertence à família das *periplasmic binding proteins* e sua estrutura tridimensional possui a típica topologia desta família. XAC2383 possui dois lobos compostos majoritariamente de fitas- β separados uma cavidade central carregada positivamente capaz de se ligar ao íon cloreto, a fosfato, pirofosfato, ATP e GTP. O motivo $_{152}\text{STS}_{154}$ envolvido na interação com os ligantes mencionados parece importante para a regulação da motilidade, visto que o mutante de

¹⁵²STS₁₅₄ para ¹⁵²AAA₁₅₄ não possui o efeito de aumento da motilidade observado para a proteína selvagem na complementação do nocaute em *xac2383*.

XAC0495 é uma proteína REC-GGDEF-EAL que regula a motilidade de *Xac* e que possui ambos os domínios degenerados, faltando os resíduos importantes para a atividade. XAC0495 se comporta como um monômero em solução e possui um formato alongado, como verificado por experimentos de SAXS.

7. Referências

- ¹ PESAVENTO, C.; HENGGE, R. Bacterial nucleotide-based second messengers. **Curr Opin Microbiol**, v. 12, n. 2, p. 170-6, Apr 2009. ISSN 1879-0364. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19318291> >.
- ² KANAZAWA, T. et al. Biochemical and physiological characterization of a BLUF protein-EAL protein complex involved in blue light-dependent degradation of cyclic diguanylate in the purple bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. **Biochemistry**, v. 49, n. 50, p. 10647-55, Dec 2010. ISSN 1520-4995. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21082778> >.
- ³ ANDRADE, M. O. et al. 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*. **Molecular Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 537-551, Oct 2006. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000240834000019 >.
- ⁴ AGIRREZABALA, X. et al. The ribosome triggers the stringent response by RelA via a highly distorted tRNA. **EMBO Rep**, v. 14, n. 9, p. 811-6, Sep 2013. ISSN 1469-3178. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23877429> >.
- ⁵ SAWAI, H. et al. Molecular oxygen regulates the enzymatic activity of a heme-containing diguanylate cyclase (HemDGC) for the synthesis of cyclic di-GMP. **Biochim Biophys Acta**, v. 1804, n. 1, p. 166-72, Jan 2010. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19818878> >.
- ⁶ HOGEMA, B. M. et al. Inducer exclusion in *Escherichia coli* by non-PTS substrates: the role of the PEP to pyruvate ratio in determining the phosphorylation state of enzyme IIAGlc. **Mol Microbiol**, v. 30, n. 3, p. 487-98, Nov 1998. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9822815> >.
- ⁷ DOMINGUEZ, D. C. Calcium signalling in bacteria. **Mol Microbiol**, v. 54, n. 2, p. 291-7, Oct 2004. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15469503> >.
- ⁸ MCDONOUGH, K. A.; RODRIGUEZ, A. The myriad roles of cyclic AMP in microbial pathogens: from signal to sword. **Nat Rev Microbiol**, v. 10, n. 1, p. 27-38, Jan 2012. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22080930> >.
- ⁹ GOMELSKY, M. cAMP, c-di-GMP, c-di-AMP and now cGMP: bacteria use them all! **Mol Microbiol**, v. 79, n. 3, p. 562-5, Feb 2011. ISSN 1365-2958. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21255104> >.

- ¹⁰ DALEBROUX, Z. D.; SWANSON, M. S. ppGpp: magic beyond RNA polymerase. **Nat Rev Microbiol**, v. 10, n. 3, p. 203-12, Mar 2012. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22337166> >.
- ¹¹ RÖMLING, U.; GALPERIN, M. Y.; GOMELSKY, M. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 77, n. 1, p. 1-52, Mar 2013. ISSN 1098-5557. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23471616> >.
- ¹² WITTE, G. et al. Structural biochemistry of a bacterial checkpoint protein reveals diadenylate cyclase activity regulated by DNA recombination intermediates. **Mol Cell**, v. 30, n. 2, p. 167-78, Apr 2008. ISSN 1097-4164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18439896> >.
- ¹³ DAVIES, B. W. et al. Coordinated regulation of accessory genetic elements produces cyclic di-nucleotides for *V. cholerae* virulence. **Cell**, v. 149, n. 2, p. 358-70, Apr 2012. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22500802> >.
- ¹⁴ BOTSFORD, J. L.; DREXLER, M. The cyclic 3',5'-adenosine monophosphate receptor protein and regulation of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate synthesis in *Escherichia coli*. **Mol Gen Genet**, v. 165, n. 1, p. 47-56, Sep 1978. ISSN 0026-8925. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/213702> >.
- ¹⁵ GÖRKE, B.; STÜLKE, J. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. **Nat Rev Microbiol**, v. 6, n. 8, p. 613-24, Aug 2008. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18628769> >.
- ¹⁶ BOTSFORD, J. L.; HARMAN, J. G. Cyclic AMP in prokaryotes. **Microbiol Rev**, v. 56, n. 1, p. 100-22, Mar 1992. ISSN 0146-0749. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1315922> >.
- ¹⁷ LINDER, J. U. cGMP production in bacteria. **Mol Cell Biochem**, v. 334, n. 1-2, p. 215-9, Jan 2010. ISSN 1573-4919. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19943185> >.
- ¹⁸ RAUCH, A. et al. Crystal structure of the guanylyl cyclase Cya2. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 41, p. 15720-5, Oct 2008. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18840690> >.
- ¹⁹ MARDEN, J. N. et al. Cyclic GMP controls *Rhodospirillum centenum* cyst development. **Mol Microbiol**, v. 79, n. 3, p. 600-15, Feb 2011. ISSN 1365-2958. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21214648> >.
- ²⁰ AN, S. Q. et al. A cyclic GMP-dependent signalling pathway regulates bacterial phytopathogenesis. **EMBO J**, v. 32, n. 18, p. 2430-8, Sep 2013. ISSN 1460-2075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23881098> >.

- 21 MAGNUSSON, L. U.; FAREWELL, A.; NYSTRÖM, T. ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. **Trends Microbiol**, v. 13, n. 5, p. 236-42, May 2005. ISSN 0966-842X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15866041> >.
- 22 PAUL, B. J. et al. DksA: a critical component of the transcription initiation machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP. **Cell**, v. 118, n. 3, p. 311-22, Aug 2004. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15294157> >.
- 23 ZUO, Y.; WANG, Y.; STEITZ, T. A. The mechanism of *E. coli* RNA polymerase regulation by ppGpp is suggested by the structure of their complex. **Mol Cell**, v. 50, n. 3, p. 430-6, May 2013. ISSN 1097-4164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23623685> >.
- 24 ATKINSON, G. C.; TENSON, T.; HAURYLIUK, V. The RelA/SpoT homolog (RSH) superfamily: distribution and functional evolution of ppGpp synthetases and hydrolases across the tree of life. **PLoS One**, v. 6, n. 8, p. e23479, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21858139> >.
- 25 RÖMLING, U. Great times for small molecules: c-di-AMP, a second messenger candidate in Bacteria and Archaea. **Sci Signal**, v. 1, n. 33, p. pe39, 2008. ISSN 1937-9145. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18714086> >.
- 26 OPPENHEIMER-SHAANAN, Y. et al. c-di-AMP reports DNA integrity during sporulation in *Bacillus subtilis*. **EMBO Rep**, v. 12, n. 6, p. 594-601, Jun 2011. ISSN 1469-3178. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21566650> >.
- 27 ROSS, P. et al. REGULATION OF CELLULOSE SYNTHESIS IN ACETOBACTER-XYLINUM BY CYCLIC DIGUANYLIC ACID. **Nature**, v. 325, n. 6101, p. 279-281, Jan 15 1987. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1987F616900068 >.
- 28 AUSMEES, N. et al. Genetic data indicate that proteins containing the GGDEF domain possess diguanylate cyclase activity. **FEMS Microbiol Lett**, v. 204, n. 1, p. 163-7, Oct 2001. ISSN 0378-1097. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11682196> >.
- 29 GALPERIN, M. Y.; NIKOLSKAYA, A. N.; KOONIN, E. V. Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. **FEMS Microbiol Lett**, v. 203, n. 1, p. 11-21, Sep 2001. ISSN 0378-1097. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11557134> >.
- 30 KIRILLINA, O. et al. HmsP, a putative phosphodiesterase, and HmsT, a putative diguanylate cyclase, control Hms-dependent biofilm formation in *Yersinia pestis*. **Mol Microbiol**, v. 54, n. 1, p. 75-88, Oct 2004. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15458406> >.

- 31 PEI, J. M.; GRISHIN, N. V. GGDEF domain is homologous to adenylyl cyclase. **Proteins-Structure Function and Genetics**, v. 42, n. 2, p. 210-216, Feb 1 2001. ISSN 0887-3585. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000166193200008 >.
- 32 CHAN, C. et al. Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 49, p. 17084-17089, Dec 7 2004. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000225740100021 >.
- 33 MALONE, J. G. et al. The structure-function relationship of WspR, a *Pseudomonas fluorescens* response regulator with a GGDEF output domain. **Microbiology**, v. 153, n. Pt 4, p. 980-94, Apr 2007. ISSN 1350-0872. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17379708> >.
- 34 FINN, R. D. et al. Pfam: the protein families database. **Nucleic Acids Res**, v. 42, n. Database issue, p. D222-30, Jan 2014. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24288371> >.
- 35 PAUL, R. et al. Activation of the diguanylate cyclase PleD by phosphorylation-mediated dimerization. **J Biol Chem**, v. 282, n. 40, p. 29170-7, Oct 2007. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17640875> >.
- 36 WASSMANN, P. et al. Structure of BeF3⁻-modified response regulator PleD: implications for diguanylate cyclase activation, catalysis, and feedback inhibition. **Structure**, v. 15, n. 8, p. 915-27, Aug 2007. ISSN 0969-2126. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17697997> >.
- 37 OLIVEIRA, M. C. et al. Cooperative substrate binding by a diguanylate cyclase. **J Mol Biol**, v. 427, n. 2, p. 415-32, Jan 2015. ISSN 1089-8638. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25463434> >.
- 38 CHRISTEN, M. et al. Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. **J Biol Chem**, v. 280, n. 35, p. 30829-37, Sep 2005. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15994307> >.
- 39 BARENDT, T. R. et al. Structure and mechanism of a bacterial light-regulated cyclic nucleotide phosphodiesterase. **Nature**, v. 459, n. 7249, p. 1015-8, Jun 2009. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19536266> >.
- 40 TCHIGVINTSEV, A. et al. Structural insight into the mechanism of c-di-GMP hydrolysis by EAL domain phosphodiesterases. **J Mol Biol**, v. 402, n. 3, p. 524-38, Sep 2010. ISSN 1089-8638. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20691189> >.

- 41 SUNDRIYAL, A. et al. Inherent regulation of EAL domain-catalyzed hydrolysis of second messenger cyclic di-GMP. **J Biol Chem**, v. 289, n. 10, p. 6978-90, Mar 2014. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24451384> >.
- 42 TARUTINA, M.; RYJENKOV, D. A.; GOMELSKY, M. An unorthodox bacteriophytochrome from *Rhodobacter sphaeroides* involved in turnover of the second messenger c-di-GMP. **J Biol Chem**, v. 281, n. 46, p. 34751-8, Nov 2006. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16968704> >.
- 43 RAO, F. et al. The functional role of a conserved loop in EAL domain-based cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase. **J Bacteriol**, v. 191, n. 15, p. 4722-31, Aug 2009. ISSN 1098-5530. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19376848> >.
- 44 CHEN, M. W. et al. Structural insights into the regulatory mechanism of the response regulator RocR from *Pseudomonas aeruginosa* in cyclic Di-GMP signaling. **J Bacteriol**, v. 194, n. 18, p. 4837-46, Sep 2012. ISSN 1098-5530. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22753070> >.
- 45 ROSS P, A. Y., WEINHOUSE C, MICHAELI D, WEINBERGER-OHANA P, MAYER R, BENZIMAN M. Control of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*. A unique guanyl oligonucleotide is the immediate activator of the cellulose synthase. **Carbohydr. Res.**, v. 1, n. 149, p. 101-117, 1986.
- 46 SCHMIDT, A. J.; RYJENKOV, D. A.; GOMELSKY, M. The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: enzymatically active and inactive EAL domains. **J Bacteriol**, v. 187, n. 14, p. 4774-81, Jul 2005. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15995192> >.
- 47 RYAN, R. P. et al. 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**, v. 103, n. 17, p. 6712-7, Apr 2006. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16611728> >.
- 48 BELLINI, D. et al. Crystal structure of an HD-GYP domain cyclic-di-GMP phosphodiesterase reveals an enzyme with a novel trinuclear catalytic iron centre. **Mol Microbiol**, v. 91, n. 1, p. 26-38, Jan 2014. ISSN 1365-2958. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24176013> >.
- 49 SIMM, R. et al. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. **Mol Microbiol**, v. 53, n. 4, p. 1123-34, Aug 2004. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15306016> >.
- 50 D'ARGENIO, D. A.; MILLER, S. I. Cyclic di-GMP as a bacterial second messenger. **Microbiology**, v. 150, n. Pt 8, p. 2497-502, Aug 2004. ISSN 1350-0872. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15289546> >.

- 51 CHEN, Z. H.; SCHAAP, P. The prokaryote messenger c-di-GMP triggers stalk cell differentiation in Dictyostelium. **Nature**, v. 488, n. 7413, p. 680-3, Aug 2012. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22864416> >.
- 52 PAUL, R. et al. Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. **Genes Dev**, v. 18, n. 6, p. 715-27, Mar 2004. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15075296> >.
- 53 CHIN, K. H. et al. 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**, v. 396, n. 3, p. 646-62, Feb 2010. ISSN 1089-8638. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20004667> >.
- 54 TAMAYO, R. et al. Role of cyclic Di-GMP during el tor biotype Vibrio cholerae infection: characterization of the in vivo-induced cyclic Di-GMP phosphodiesterase CdpA. **Infect Immun**, v. 76, n. 4, p. 1617-27, Apr 2008. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18227161> >.
- 55 NICASTRO, G. G. et al. Cyclic-di-GMP levels affect Pseudomonas aeruginosa fitness in the presence of imipenem. **Environ Microbiol**, v. 16, n. 5, p. 1321-33, May 2014. ISSN 1462-2920. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25118352> >.
- 56 MOSCOSO, J. A. et al. The Pseudomonas aeruginosa sensor RetS switches type III and type VI secretion via c-di-GMP signalling. **Environ Microbiol**, v. 13, n. 12, p. 3128-38, Dec 2011. ISSN 1462-2920. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21955777> >.
- 57 AMIKAM, D.; GALPERIN, M. Y. PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. **Bioinformatics**, v. 22, n. 1, p. 3-6, Jan 2006. ISSN 1367-4803. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16249258> >.
- 58 ALM, R. A. et al. Identification of a novel gene, pilZ, essential for type 4 fimbrial biogenesis in Pseudomonas aeruginosa. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 1, p. 46-53, Jan 1996. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996TM78900007 >.
- 59 PAUL, K. et al. The c-di-GMP binding protein YcgR controls flagellar motor direction and speed to affect chemotaxis by a "backstop brake" mechanism. **Mol Cell**, v. 38, n. 1, p. 128-39, Apr 2010. ISSN 1097-4164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20346719> >.
- 60 CHRISTEN, M. et al. 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**, v. 104, n. 10, p. 4112-7, Mar 2007. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17360486> >.

- 61 MASSIE, J. P. et al. Quantification of high-specificity cyclic diguanylate signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 31, p. 12746-51, Jul 2012. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22802636> >.
- 62 HICKMAN, J. W.; HARWOOD, C. S. Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. **Mol Microbiol**, v. 69, n. 2, p. 376-89, Jul 2008. ISSN 1365-2958. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18485075> >.
- 63 WANG, H. et al. The LuxR-type regulator VpsT negatively controls the transcription of rpoS, encoding the general stress response regulator, in *Vibrio cholerae* biofilms. **J Bacteriol**, v. 196, n. 5, p. 1020-30, Mar 2014. ISSN 1098-5530. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24363348> >.
- 64 KRASTEVA, P. V. et al. *Vibrio cholerae* VpsT regulates matrix production and motility by directly sensing cyclic di-GMP. **Science**, v. 327, n. 5967, p. 866-8, Feb 2010. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20150502> >.
- 65 NAVARRO, M. V. et al. Structural analysis of the GGDEF-EAL domain-containing c-di-GMP receptor FimX. **Structure**, v. 17, n. 8, p. 1104-16, Aug 2009. ISSN 1878-4186. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19679088> >.
- 66 GUZZO, C. R. et al. PILZ protein structure and interactions with PILB and the FIMX EAL domain: implications for control of type IV pilus biogenesis. **J Mol Biol**, v. 393, n. 4, p. 848-66, Nov 2009. ISSN 1089-8638. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19646999> >.
- 67 _____. Structure of the PilZ-FimXEAL-c-di-GMP Complex Responsible for the Regulation of Bacterial Type IV Pilus Biogenesis. **J Mol Biol**, v. 425, n. 12, p. 2174-97, Jun 2013. ISSN 1089-8638. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23507310> >.
- 68 DUNGER, G. et al. *Xanthomonas citri* subsp. *citri* type IV Pilus is required for twitching motility, biofilm development, and adherence. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 27, n. 10, p. 1132-47, Oct 2014. ISSN 0894-0282. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25180689> >.
- 69 OZAKI, S. et al. Activation and polar sequestration of PopA, a c-di-GMP effector protein involved in *Caulobacter crescentus* cell cycle control. **Mol Microbiol**, v. 94, n. 3, p. 580-94, Nov 2014. ISSN 1365-2958. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25171231> >.
- 70 LEE, V. T. et al. A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. **Mol Microbiol**, v. 65, n. 6, p. 1474-84, Sep 2007. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17824927> >.

- 71 LI, Z. et al. Structures of the PelD cyclic diguanylate effector involved in pellicle formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **J Biol Chem**, v. 287, n. 36, p. 30191-204, Aug 2012. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22810222> >.
- 72 AN, S. Q. et al. Novel cyclic di-GMP effectors of the YajQ protein family control bacterial virulence. **PLoS Pathog**, v. 10, n. 10, p. e1004429, Oct 2014. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25329577> >.
- 73 WINKLER, W. C. Riboswitches and the role of noncoding RNAs in bacterial metabolic control. **Curr Opin Chem Biol**, v. 9, n. 6, p. 594-602, Dec 2005. ISSN 1367-5931. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16226486> >.
- 74 SUDARSAN, N. et al. Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP. **Science**, v. 321, n. 5887, p. 411-413, Jul 18 2008. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000257713900052 >.
- 75 KULSHINA, N.; BAIRD, N. J.; FERRÉ-D'AMARÉ, A. R. Recognition of the bacterial second messenger cyclic diguanylate by its cognate riboswitch. **Nat Struct Mol Biol**, v. 16, n. 12, p. 1212-7, Dec 2009. ISSN 1545-9985. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19898478> >.
- 76 SESHASAYEE, A. S. N.; FRASER, G. M.; LUSCOMBE, N. M. Comparative genomics of cyclic-di-GMP signalling in bacteria: post-translational regulation and catalytic activity. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 18, p. 5970-5981, Oct 2010. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000283116600009 >.
- 77 GALPERIN, M. Y. A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: bacterial IQ, extroverts and introverts. **BMC Microbiol**, v. 5, p. 35, 2005. ISSN 1471-2180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15955239> >.
- 78 PONTING, C. P.; ARAVIND, L. PAS: a multifunctional domain family comes to light. **Curr Biol**, v. 7, n. 11, p. R674-7, Nov 1997. ISSN 0960-9822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9382818> >.
- 79 TUCKERMAN, J. R. et al. An oxygen-sensing diguanylate cyclase and phosphodiesterase couple for c-di-GMP control. **Biochemistry**, v. 48, n. 41, p. 9764-74, Oct 2009. ISSN 1520-4995. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19764732> >.
- 80 HO, Y. S.; BURDEN, L. M.; HURLEY, J. H. Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor. **EMBO J**, v. 19, n. 20, p. 5288-99, Oct 2000. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11032796> >.

- 81 SAVAKIS, P. et al. Light-induced alteration of c-di-GMP level controls motility of *Synechocystis* sp. PCC 6803. **Mol Microbiol**, v. 85, n. 2, p. 239-51, Jul 2012. ISSN 1365-2958. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22625406> >.
- 82 PAO, G. M.; SAIER, M. H. Response regulators of bacterial signal transduction systems: selective domain shuffling during evolution. **J Mol Evol**, v. 40, n. 2, p. 136-54, Feb 1995. ISSN 0022-2844. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7699720> >.
- 83 ARAVIND, L.; PONTING, C. P. The cytoplasmic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signalling proteins. **FEMS Microbiol Lett**, v. 176, n. 1, p. 111-6, Jul 1999. ISSN 0378-1097. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10418137> >.
- 84 NAVARRO, M. V. et al. Structural basis for c-di-GMP-mediated inside-out signaling controlling periplasmic proteolysis. **PLoS Biol**, v. 9, n. 2, p. e1000588, 2011. ISSN 1545-7885. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21304926> >.
- 85 PHIPPEN, C. W. et al. Formation and dimerization of the phosphodiesterase active site of the *Pseudomonas aeruginosa* MorA, a bi-functional c-di-GMP regulator. **FEBS Lett**, v. 588, n. 24, p. 4631-6, Dec 2014. ISSN 1873-3468. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25447517> >.
- 86 VAN DEN MOOTER, M.; SWINGS, J. Numerical analysis of 295 phenotypic features of 266 *Xanthomonas* strains and related strains and an improved taxonomy of the genus. **Int J Syst Bacteriol**, v. 40, n. 4, p. 348-69, Oct 1990. ISSN 0020-7713. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2275852> >.
- 87 PARKINSON, N. et al. Phylogenetic structure of *Xanthomonas* determined by comparison of *gyrB* sequences. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 59, n. Pt 2, p. 264-74, Feb 2009. ISSN 1466-5026. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19196764> >.
- 88 RYAN, R. P. et al. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, n. 5, p. 344-55, May 2011. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21478901> >.
- 89 GRAHAM, J. H. et al. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. **Mol Plant Pathol**, v. 5, n. 1, p. 1-15, Jan 2004. ISSN 1364-3703. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20565577> >.
- 90 BRUNINGS, A. M.; GABRIEL, D. W. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. **Mol Plant Pathol**, v. 4, n. 3, p. 141-57, May 2003. ISSN 1364-3703. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20569374> >.
- 91 GOTTWALD, T. R. Citrus canker. The Plant Health Instructor., 2000.

- 92 YANG, T. C. et al. Flagellar biogenesis of *Xanthomonas campestris* requires the alternative sigma factors RpoN2 and FliA and is temporally regulated by FlhA, FlhB, and FlgM. **J Bacteriol**, v. 191, n. 7, p. 2266-75, Apr 2009. ISSN 1098-5530. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19136588> >.
- 93 ZHANG, H.; WANG, S. Rice versus *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*: a unique pathosystem. **Curr Opin Plant Biol**, Mar 2013. ISSN 1879-0356. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23466254> >.
- 94 VICENTE, J. G.; HOLUB, E. B. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. **Mol Plant Pathol**, v. 14, n. 1, p. 2-18, Jan 2013. ISSN 1364-3703. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23051837> >.
- 95 JONES, J. B. et al. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. **Syst Appl Microbiol**, v. 27, n. 6, p. 755-62, Nov 2004. ISSN 0723-2020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15612634> >.
- 96 STAPP, C. [*Xanthomonas malvacearum*, the causative organism of cotton bacteriosis. A compilation of recent literature]. **Zentralbl Bakteriell Parasitenkd Infektionskr Hyg**, v. 120, n. 5, p. 509-42, 1966. ISSN 0044-4057. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5340935> >.
- 97 VERNIÈRE, C. J.; GOTTWALD, T. R.; PRUVOST, O. Disease Development and Symptom Expression of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in Various Citrus Plant Tissues. **Phytopathology**, v. 93, n. 7, p. 832-43, Jul 2003. ISSN 0031-949X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18943164> >.
- 98 J.P. TORRES; MARINGONI, A. C.; JR., T. A. F. S. SURVIVAL OF XANTHOMONAS AXONOPODIS pv. PHASEOLI var. FUSCANS IN COMMON BEAN LEAFLETS ON SOIL. **Journal of Plant Pathology**, v. 91, n. 1, p. 4, 2009.
- 99 JUNIOR, W. C. J. et al. Injuries caused by citrus leafminer (*Phyllocnistis citrella*) exacerbate citrus canker (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) infection. **Fitopatol. bras.**, v. 31, n. 3, 2006.
- 100 FUNDECITRUS. Cancro cítrico. Disponível em: < <http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro/7> >.
- 101 NEVES, M. F. **O Retrato da citricultura brasileira**. 1. Ribeirão Preto: 2010. 137
- 102 SANCHES, A. L. R. et al. Análise econômica da prevenção e controle do cancro cítrico no estado de São Paulo. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 52, n. 3, 2014.
- 103 DA SILVA, A. C. et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, v. 417, n. 6887, p. 459-63, May 23 2002. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12024217> >.

- 104 ROSSIER, O. et al. The Xanthomonas Hrp type III system secretes proteins from plant and mammalian bacterial pathogens. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 16, p. 9368-73, Aug 1999. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10430949> >.
- 105 CAPPELLETTI, P. A. et al. Structure-function analysis of the HrpB2-HrcU interaction in the Xanthomonas citri type III secretion system. **PLoS One**, v. 6, n. 3, p. e17614, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21408079> >.
- 106 SOUZA, D. P. et al. A component of the Xanthomonadaceae type IV secretion system combines a VirB7 motif with a N0 domain found in outer membrane transport proteins. **PLoS Pathog**, v. 7, n. 5, p. e1002031, May 2011. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21589901> >.
- 107 RYAN, R. P. et al. Cyclic di-GMP signalling in the virulence and environmental adaptation of Xanthomonas campestris. **Mol Microbiol**, v. 63, n. 2, p. 429-42, Jan 2007. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17241199> >.
- 108 MCCARTHY, Y. et al. The role of PilZ domain proteins in the virulence of Xanthomonas campestris pv. campestris. **Mol Plant Pathol**, v. 9, n. 6, p. 819-24, Nov 2008. ISSN 1364-3703. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19019010> >.
- 109 GUZZO, C. R. et al. PILZ Protein Structure and Interactions with PILB and the FIMX EAL Domain: Implications for Control of Type IV Pilus Biogenesis. **Journal of Molecular Biology**, v. 393, n. 4, p. 848-866, Nov 2009. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000271528300006 >.
- 110 _____. Structure of the PilZ-FimXEAL-c-di-GMP Complex Responsible for the Regulation of Bacterial Type IV Pilus Biogenesis. **J Mol Biol**, Mar 2013. ISSN 1089-8638. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23507310> >.
- 111 DA SILVA, A. C. R. et al. Comparison of the genomes of two Xanthomonas pathogens with differing host specificities. **Nature**, v. 417, n. 6887, p. 459-463, May 2002. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000175730900043 >.
- 112 ANDRADE, M. D. O. **Estudo da sinalização celular envolvendo a via do quorum-sensing e os segundos mensageiros**. 2011. (Tese de Doutorado). Bioquímica, Universidade de São Paulo, Instituto de Química.
- 113 FINN, R. D.; CLEMENTS, J.; EDDY, S. R. HMMER web server: interactive sequence similarity searching. **Nucleic Acids Res**, v. 39, n. Web Server issue, p. W29-37, Jul 2011. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21593126> >.

- 114 WIXON, J.; KELL, D. The Kyoto encyclopedia of genes and genomes--KEGG. **Yeast**, v. 17, n. 1, p. 48-55, Apr 2000. ISSN 0749-503X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10928937> >.
- 115 ALEGRIA, M. C. et al. 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**, v. 186, n. 18, p. 6186-97, Sep 2004. ISSN 0021-9193. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15342589> >.
- 116 C, H. A. P. A. R. MFIT: Multiple Spectra Fitting Program. **Synchrotron Rad. News**, v. 2, p. 24-26, 1989.
- 117 PETOUKHOV, M. V. et al. New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis. **J Appl Crystallogr**, v. 45, n. Pt 2, p. 342-350, Apr 2012. ISSN 0021-8898. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25484842> >.
- 118 D.I., S. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. **J. Appl. Crystallogr.**, v. 25, p. 495-503, 1992.
- 119 FRANKE, D. A. S., D.I. DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering. **J. Appl. Cryst.**, v. 42, p. 342-346, 2009.
- 120 I., V. V. V. A. S. D. Uniqueness of ab-initio shape determination in small-angle scattering. **J. Appl. Cryst.**, v. 36, p. 860-864., 2003.
- 121 DOS REIS, M. A.; APARICIO, R.; ZHANG, Y. Improving protein template recognition by using small-angle x-ray scattering profiles. **Biophys J**, v. 101, n. 11, p. 2770-81, Dec 2011. ISSN 1542-0086. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22261066> >.
- 122 KOZIN, M. S., D. Automated matching of high- and low-resolution structural models. **J Appl Cryst.**, v. 34, p. 33-41, 2001.
- 123 COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, N. M. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 50, n. Pt 5, p. 760-3, Sep 1994. ISSN 0907-4449. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15299374> >.
- 124 MCCOY, A. J. et al. Phaser crystallographic software. **J Appl Crystallogr**, v. 40, n. Pt 4, p. 658-674, Aug 2007. ISSN 0021-8898. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19461840> >.
- 125 TAYLOR, G. The phase problem. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 59, n. Pt 11, p. 1881-90, Nov 2003. ISSN 0907-4449. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14573942> >.

- 126 CHEN, C. D. et al. Direct phase selection of initial phases from single-wavelength anomalous dispersion (SAD) for the improvement of electron density and ab initio structure determination. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 70, n. Pt 9, p. 2331-43, Sep 2014. ISSN 1399-0047. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25195747> >.
- 127 OTWINOWSKI, Z. A. M., W. Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode. **Methods in Enzymology**, v. Volume 276: Macromolecular Crystallography, part A, p. 307-326, 1997.
- 128 TERWILLIGER, T. C. et al. Decision-making in structure solution using Bayesian estimates of map quality: the PHENIX AutoSol wizard. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 65, n. Pt 6, p. 582-601, Jun 2009. ISSN 1399-0047. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19465773> >.
- 129 ZWART, P. H. et al. Automated structure solution with the PHENIX suite. **Methods Mol Biol**, v. 426, p. 419-35, 2008. ISSN 1064-3745. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18542881> >.
- 130 EDMUNDSON, A. B.; ELY, K. R.; HERRON, J. N. A search for site-filling ligands in the Mcg Bence-Jones dimer: crystal binding studies of fluorescent compounds. **Mol Immunol**, v. 21, n. 7, p. 561-76, Jul 1984. ISSN 0161-5890. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6431268> >.
- 131 LEBEDEV, A. A. et al. JLigand: a graphical tool for the CCP4 template-restraint library. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 68, n. Pt 4, p. 431-40, Apr 2012. ISSN 1399-0047. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22505263> >.
- 132 EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 60, n. Pt 12 Pt 1, p. 2126-32, Dec 2004. ISSN 0907-4449. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15572765> >.
- 133 LASKOWSKI R A, M. M. W., MOSS D S, THORNTON J M. PROCHECK - a program to check the stereochemical quality of protein structures. **J. App. Cryst**, v. 26, p. 283-291, 1993.
- 134 MALONE, J. G. et al. The structure-function relationship of WspR, a *Pseudomonas fluorescens* response regulator with a GGDEF output domain. **Microbiology-Sgm**, v. 153, p. 980-994, Apr 2007. ISSN 1350-0872. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000245959200007 >.
- 135 EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Res**, v. 32, n. 5, p. 1792-7, 2004. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15034147> >.

- 136 RAO, F. et al. Catalytic mechanism of cyclic Di-GMP-specific phosphodiesterase: a study of the EAL domain-containing RocR from *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 10, p. 3622-3631, May 2008. ISSN 0021-9193. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000255622500023 >.
- 137 WAN, X. et al. Globins synthesize the second messenger bis-(3'-5')-cyclic diguanosine monophosphate in bacteria. **J Mol Biol**, v. 388, n. 2, p. 262-70, May 2009. ISSN 1089-8638. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19285985> >.
- 138 HICKMAN, J. W.; TIFREA, D. F.; HARWOOD, C. S. A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 40, p. 14422-7, Oct 2005. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16186483> >.
- 139 KROGH, A. et al. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. **J Mol Biol**, v. 305, n. 3, p. 567-80, Jan 2001. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11152613> >.
- 140 BUCHAN, D. W. et al. Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. **Nucleic Acids Res**, v. 41, n. Web Server issue, p. W349-57, Jul 2013. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23748958> >.
- 141 HEFTI, M. H. et al. The PAS fold. A redefinition of the PAS domain based upon structural prediction. **Eur J Biochem**, v. 271, n. 6, p. 1198-208, Mar 2004. ISSN 0014-2956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15009198> >.
- 142 POKKULURI, P. R. et al. Structures and solution properties of two novel periplasmic sensor domains with c-type heme from chemotaxis proteins of *Geobacter sulfurreducens*: implications for signal transduction. **J Mol Biol**, v. 377, n. 5, p. 1498-517, Apr 2008. ISSN 1089-8638. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18329666> >.
- 143 _____. Analysis of periplasmic sensor domains from *Anaeromyxobacter dehalogenans* 2CP-C: structure of one sensor domain from a histidine kinase and another from a chemotaxis protein. **Microbiologyopen**, v. 2, n. 5, p. 766-77, Oct 2013. ISSN 2045-8827. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23897711> >.
- 144 CHEUNG, J. et al. Crystal structure of a functional dimer of the PhoQ sensor domain. **J Biol Chem**, v. 283, n. 20, p. 13762-70, May 2008. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18348979> >.
- 145 AIROLA, M. V. et al. Architecture of the soluble receptor Aer2 indicates an in-line mechanism for PAS and HAMP domain signaling. **J Mol Biol**, v. 425, n. 5, p. 886-901, Mar 2013. ISSN 1089-8638. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23274111> >.
- 146 LAI, R. Z.; PARKINSON, J. S. Functional suppression of HAMP domain signaling defects in the *E. coli* serine chemoreceptor. **J Mol Biol**, v. 426, n. 21, p. 3642-55, Oct

2014. ISSN 1089-8638. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25134756> >.
- 147 WEBER, H. et al. Cyclic-di-GMP-mediated signalling within the sigma network of Escherichia coli. **Mol Microbiol**, v. 62, n. 4, p. 1014-34, Nov 2006. ISSN 0950-382X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17010156> >.
- 148 ZOGAJ, X. et al. The multicellular morphotypes of Salmonella typhimurium and Escherichia coli produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. **Mol Microbiol**, v. 39, n. 6, p. 1452-63, Mar 2001. ISSN 0950-382X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11260463> >.
- 149 OLIVEIRA, M. C. et al. Cooperative Substrate Binding by a Diguanylate Cyclase. **J Mol Biol**, Nov 2014. ISSN 1089-8638. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25463434> >.
- 150 CHRISTEN, M. et al. Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 35, p. 30829-30837, Sep 2005. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000231487800023 >.
- 151 MATHEW, R. et al. Deletion of the rpoZ gene, encoding the omega subunit of RNA polymerase, results in pleiotropic surface-related phenotypes in Mycobacterium smegmatis. **Microbiology**, v. 152, n. Pt 6, p. 1741-50, Jun 2006. ISSN 1350-0872. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16735737> >.
- 152 MURRAY, T. S.; KAZMIERCZAK, B. I. Pseudomonas aeruginosa exhibits sliding motility in the absence of type IV pili and flagella. **J Bacteriol**, v. 190, n. 8, p. 2700-8, Apr 2008. ISSN 1098-5530. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18065549> >.
- 153 PURCELL, E. B. et al. Cyclic diguanylate inversely regulates motility and aggregation in Clostridium difficile. **J Bacteriol**, v. 194, n. 13, p. 3307-16, Jul 2012. ISSN 1098-5530. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22522894> >.
- 154 KUMAGAI, Y. et al. Cyclic dimeric GMP signaling regulates intracellular aggregation, sessility, and growth of Ehrlichia chaffeensis. **Infect Immun**, v. 79, n. 10, p. 3905-12, Oct 2011. ISSN 1098-5522. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21788390> >.
- 155 SUKCHAWALIT, R. et al. Construction and characterization of regulated L-arabinose-inducible broad host range expression vectors in Xanthomonas. **FEMS Microbiol Lett**, v. 181, n. 2, p. 217-23, Dec 1999. ISSN 0378-1097. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10585541> >.
- 156 GERHARZ, T. et al. Identification of basic amino acid residues important for citrate binding by the periplasmic receptor domain of the sensor kinase CitA. **Biochemistry**, v.

- 42, n. 19, p. 5917-24, May 2003. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12741850> >.
- 157 SEVVANA, M. et al. A ligand-induced switch in the periplasmic domain of sensor histidine kinase CitA. **J Mol Biol**, v. 377, n. 2, p. 512-23, Mar 2008. ISSN 1089-8638. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18258261> >.
- 158 REINELT, S. et al. The structure of the periplasmic ligand-binding domain of the sensor kinase CitA reveals the first extracellular PAS domain. **J Biol Chem**, v. 278, n. 40, p. 39189-96, Oct 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12867417> >.
- 159 KASPAR, S. et al. The periplasmic domain of the histidine autokinase CitA functions as a highly specific citrate receptor. **Mol Microbiol**, v. 33, n. 4, p. 858-72, Aug 1999. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10447894> >.
- 160 LUPAS, A. Coiled coils: new structures and new functions. **Trends Biochem Sci**, v. 21, n. 10, p. 375-82, Oct 1996. ISSN 0968-0004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8918191> >.
- 161 ELLIOTT, K. T. et al. Conserved residues in the HAMP domain define a new family of proposed bipartite energy taxis receptors. **J Bacteriol**, v. 191, n. 1, p. 375-87, Jan 2009. ISSN 1098-5530. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18952801> >.
- 162 FERRIS, H. U. et al. The mechanisms of HAMP-mediated signaling in transmembrane receptors. **Structure**, v. 19, n. 3, p. 378-85, Mar 2011. ISSN 1878-4186. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21397188> >.
- 163 HULKO, M. et al. The HAMP domain structure implies helix rotation in transmembrane signaling. **Cell**, v. 126, n. 5, p. 929-40, Sep 2006. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16959572> >.
- 164 WHEELER, T. J.; CLEMENTS, J.; FINN, R. D. Skylign: a tool for creating informative, interactive logos representing sequence alignments and profile hidden Markov models. **BMC Bioinformatics**, v. 15, p. 7, 2014. ISSN 1471-2105. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24410852> >.
- 165 YANG, J. et al. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. **Nat Methods**, v. 12, n. 1, p. 7-8, Dec 2014. ISSN 1548-7105. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25549265> >.
- 166 DOCENA, C. **Identificação das interações envolvendo proteínas relacionadas aos Sistemas de Dois-componentes e aos Sistemas Secretórios do Tipo III e IV do fitopatígeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*** 2006. (Doutorado). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP.

- 167 CAMACHO, C. et al. BLAST+: architecture and applications. **BMC Bioinformatics**, v. 10, p. 421, 2009. ISSN 1471-2105. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20003500> >.
- 168 HIGGINS, C. F. ABC transporters: physiology, structure and mechanism--an overview. **Res Microbiol**, v. 152, n. 3-4, p. 205-10, 2001 Apr-May 2001. ISSN 0923-2508. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11421269> >.
- 169 DAVIDSON, A. L. et al. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 72, n. 2, p. 317-64, table of contents, Jun 2008. ISSN 1098-5557. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18535149> >.
- 170 KADABA, N. S. et al. The high-affinity E. coli methionine ABC transporter: structure and allosteric regulation. **Science**, v. 321, n. 5886, p. 250-3, Jul 2008. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18621668> >.
- 171 OLOO, E. O.; TIELEMAN, D. P. Conformational transitions induced by the binding of MgATP to the vitamin B12 ATP-binding cassette (ABC) transporter BtuCD. **J Biol Chem**, v. 279, n. 43, p. 45013-9, Oct 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15308647> >.
- 172 POHL, A.; DEVAUX, P. F.; HERRMANN, A. Function of prokaryotic and eukaryotic ABC proteins in lipid transport. **Biochim Biophys Acta**, v. 1733, n. 1, p. 29-52, Mar 2005. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15749056> >.
- 173 REES, D. C.; JOHNSON, E.; LEWINSON, O. ABC transporters: the power to change. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 10, n. 3, p. 218-27, Mar 2009. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19234479> >.
- 174 HOLLENSTEIN, K.; FREI, D. C.; LOCHER, K. P. Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein. **Nature**, v. 446, n. 7132, p. 213-6, Mar 2007. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17322901> >.
- 175 RIZK, S. S.; CUNEO, M. J.; HELLINGA, H. W. Identification of cognate ligands for the Escherichia coli phnD protein product and engineering of a reagentless fluorescent biosensor for phosphonates. **Protein Sci**, v. 15, n. 7, p. 1745-51, Jul 2006. ISSN 0961-8368. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16751609> >.
- 176 ALICEA, I. et al. Structure of the Escherichia coli phosphonate binding protein PhnD and rationally optimized phosphonate biosensors. **J Mol Biol**, v. 414, n. 3, p. 356-69, Dec 2011. ISSN 1089-8638. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22019591> >.

- 177 WHITE, A. K.; METCALF, W. W. Microbial metabolism of reduced phosphorus compounds. **Annu Rev Microbiol**, v. 61, p. 379-400, 2007. ISSN 0066-4227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18035609> >.
- 178 QUINN, J. P. et al. New ways to break an old bond: the bacterial carbon-phosphorus hydrolases and their role in biogeochemical phosphorus cycling. **Environ Microbiol**, v. 9, n. 10, p. 2392-400, Oct 2007. ISSN 1462-2912. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17803765> >.
- 179 METCALF, W. W.; WANNER, B. L. Evidence for a fourteen-gene, phnC to phnP locus for phosphonate metabolism in Escherichia coli. **Gene**, v. 129, n. 1, p. 27-32, Jul 1993. ISSN 0378-1119. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8335257> >.
- 180 ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**, v. 25, n. 17, p. 3389-402, Sep 1997. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9254694> >.
- 181 RUPP, B. **Biomolecular Crystallography: Principles, Practice, and Application to Structural Biology**. Garland Science, 2009.
- 182 FELDER, C. B. et al. The Venus flytrap of periplasmic binding proteins: an ancient protein module present in multiple drug receptors. **AAPS PharmSci**, v. 1, n. 2, p. E2, 1999. ISSN 1522-1059. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11741199> >.
- 183 PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. **J Comput Chem**, v. 25, n. 13, p. 1605-12, Oct 2004. ISSN 0192-8651. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15264254> >.
- 184 HOLM, L.; ROSENSTRÖM, P. Dali server: conservation mapping in 3D. **Nucleic Acids Res**, v. 38, n. Web Server issue, p. W545-9, Jul 2010. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20457744> >.
- 185 CARUGO, O. Buried chloride stereochemistry in the Protein Data Bank. **BMC Struct. Biol**, v. 14, n. 19, p. 7, 2014.
- 186 GUHA THAKURTA, P. et al. Structure of diferric hen serum transferrin at 2.8 Å resolution. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 59, n. Pt 10, p. 1773-81, Oct 2003. ISSN 0907-4449. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14501117> >.
- 187 WÜLFING, C.; PLÜCKTHUN, A. Protein folding in the periplasm of Escherichia coli. **Mol Microbiol**, v. 12, n. 5, p. 685-92, Jun 1994. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8052121> >.
- 188 RABOY, V. myo-Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate. **Phytochemistry**, v. 64, n. 6, p. 1033-43, Nov 2003. ISSN 0031-9422. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14568069> >.

- 189 LEE, S. Y. et al. Crystal structure of activated CheY. Comparison with other activated receiver domains. **J Biol Chem**, v. 276, n. 19, p. 16425-31, May 2001. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11279165> >.
- 190 CASINO, P.; RUBIO, V.; MARINA, A. Structural insight into partner specificity and phosphoryl transfer in two-component signal transduction. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 325-36, Oct 2009. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19800110> >.
- 191 CHATTERJEE, D. et al. Mechanistic insight into the conserved allosteric regulation of periplasmic proteolysis by the signaling molecule cyclic-di-GMP. **Elife**, v. 3, p. e03650, 2014. ISSN 2050-084X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25182848> >.
- 192 MILLET, O.; HUDSON, R. P.; KAY, L. E. The energetic cost of domain reorientation in maltose-binding protein as studied by NMR and fluorescence spectroscopy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 22, p. 12700-5, Oct 2003. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14530390> >.
- 193 TANG, C.; SCHWIETERS, C. D.; CLORE, G. M. Open-to-closed transition in apo maltose-binding protein observed by paramagnetic NMR. **Nature**, v. 449, n. 7165, p. 1078-82, Oct 2007. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17960247> >.
- 194 GEBHARD, S.; TRAN, S. L.; COOK, G. M. The Phn system of Mycobacterium smegmatis: a second high-affinity ABC-transporter for phosphate. **Microbiology**, v. 152, n. Pt 11, p. 3453-65, Nov 2006. ISSN 1350-0872. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17074913> >.
- 195 SPIRO, S. **Sensory Mechanisms in Bacteria: Molecular Aspects of Signal Recognition**. 1. Caister Academic Press, 2010. 287
- 196 NEIDITCH, M. B. et al. Regulation of LuxPQ receptor activity by the quorum-sensing signal autoinducer-2. **Mol Cell**, v. 18, n. 5, p. 507-18, May 2005. ISSN 1097-2765. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15916958> >.
- 197 COCKERELL, S. R. et al. Vibrio cholerae NspS, a homologue of ABC-type periplasmic solute binding proteins, facilitates transduction of polyamine signals independent of their transport. **Microbiology**, v. 160, n. Pt 5, p. 832-43, May 2014. ISSN 1465-2080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24530989> >.
- 198 SANTACRUZ, C. P. et al. Crystallization, data collection and phasing of the molybdate-binding protein of the phytopathogen Xanthomonas axonopodis pv. citri. **Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun**, v. 62, n. Pt 3, p. 289-91, Mar 2006. ISSN 1744-3091. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16511325> >.

- ¹⁹⁹ LI, J.; WANG, N. Genome-wide mutagenesis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* reveals novel genetic determinants and regulation mechanisms of biofilm formation. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e21804, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21750733> >.

ANEXO**Súmula Curricular**

Raphael Dias TeixeiraCurriculum Vitae

Dados pessoais

Nome Raphael Dias Teixeira
Nascimento 21/04/1985 - Belo Horizonte/MG - Brasil
CPF 075.187.616-02

Formação acadêmica/titulação

2009 Doutorado em Ciências Biológicas (Bioquímica).
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Estudos estruturais e funcionais de domínios GGDEF/EAL em vias de sinalização por c-diGMP em *Xanthomonas axonopodis* pv citri.
Orientador: Shaker Chuck Farah
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

2004 - 2008 Graduação em Ciências Biológicas.
Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brasil
Orientador: Carlos Edmundo Salas Bravo
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Formação complementar

2013 - 2013 Curso de curta duração em Structure And Dynamics of Proteins By NMR.
Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio De Janeiro, Brasil

2012 - 2012 Curso de curta duração em RapiData Protein Crystallography.
Brookhaven National Laboratory, BNL, Upton, Estados Unidos

2012 - 2012 Curso de curta duração em Modern Topics in Magnetic Resonance.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil

2011 - 2011 Curso de curta duração em Análise de Proteínas por Dicroísmo Circular e DLS.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil

2009 - 2009 Curso de curta duração em IV CeBiME/LNLS Structural Molecular Biology Worksh.
Laboratório Nacional de Luz Sincrotron, LNLS, Brasil

2007 - 2007 Curso de curta duração em Bioquímica dos Venenos Animais.
Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, SBBQ, São Paulo, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

2011 - 2011	Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Programa de Aperfeiçoamento de Ensino , Carga horária: 8, Regime: Parcial
2009 - Atual	Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Doutorando, Regime: Parcial

Atividades

03/2009 - Atual	Pesquisa e Desenvolvimento, Instituto de Química, Departamento de Bioquímica <i>Linhas de pesquisa:</i> <i>Estrutura de função de proteínas envolvidas na sinalização por c-di-GMP</i>
------------------------	--

2. Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Vínculo institucional

2004 - 2010	Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Iniciação científica , Carga horária: 25, Regime: Parcial
--------------------	--

Atividades

08/2004 - 01/2009	Pesquisa e Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica e Imunologia <i>Linhas de pesquisa:</i> <i>Caracterização de proteinases de Carica candamarcensis</i>
--------------------------	--

Linhas de pesquisa

1. Caracterização de proteinases de Carica candamarcensis
2. Estrutura de função de proteínas envolvidas na sinalização por c-di-GMP

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. OLIVEIRA, MAYCON C., **TEIXEIRA, RAPHAEL D.**, ANDRADE, MAXUEL O., PINHEIRO, GLAUCIA M.S., RAMOS, CARLOS H.I., FARAH, CHUCK S.

Cooperative substrate binding by a diguanylate cyclase. *Journal of Molecular Biology.* , v.427, p.415 - 432, 2014.

2. Gomes, Marco T. R., **TEIXEIRA, RAPHAEL D.**, Lopes, Miriam T. P., Nagem, Ronaldo A. P., Salas, Carlos E.

X-ray crystal structure of CMS1MS2: a high proteolytic activity cysteine proteinase from *Carica candamarcensis*. *Amino Acids (Wien. Print).* , v.43, p.2381 - 2391, 2012.

3. GOMES, M.T.R, **TEIXEIRA, R. D.**, RIBEIRO, H.A.L, TURCHETTI, A. P., JUNQUEIRA, C. F., LOPES, M. T. P., SALAS, C.E, NAGEM, R. A. P.

Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of CMS1MS2: a cysteine proteinase from *Carica candamarcensis* latex.. *Acta Crystallographica. Series F.* , v.64, p.492 - 494, 2008.

4. **TEIXEIRA, RAPHAEL D.**, RIBEIRO, HENRIQUE A.L., GOMES, MARCO-TÚLIO R., LOPES, MIRIAM T.P., Salas, Carlos E.

The proteolytic activities in latex from *Carica candamarcensis*. *Plant Physiology and Biochemistry (Paris).* , v.46, p.956 - 961, 2008.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. TEIXEIRA, R. D., ANDRADE, M. O., FARAH, C. S.

GGDEF-EAL Proteins From *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. In: Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2011, Foz do Iguaçu.

Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq). , 2011.

2. ANDRADE, M. O., TEIXEIRA, R. D., FARAH, C. S.

Factors involved in DSF-mediated signalization in *Xanthomonas* as targets to inhibition of bacterial growth may rise resistance to canker in citrus. In: Pan American Congress on Plants and Bioenergy., 2010, Águas de São Pedro.

Congress on Plants and Bioenergy. , 2010.

3. ANDRADE, M. O., TEIXEIRA, R. D., FARAH, C. S.

The Quorum-sensing system down regulates the diGMP cyclic activating the mobility, production of exopolysaccharide and virulence factors in *Xanthomonas axonopodis* pv citri. In: 56th National Congress of Genetics., 2010, Guarujá.

Genetics and Molecular Biology. , 2010.

4. TEIXEIRA, R. D., RIBEIRO, H.A.L, TURCHETTI, A. P., GOMES, M.T.R, GIUSTA, M., JUNQUEIRA, C. F., LOPES, M. T. P., NAGEM, R. A. P., SALAS, C.E

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE PROTEINASES MITOGÊNICAS E NÃO MITOGÊNICAS DE *CARICA CANDAMARCENSIS* In: XVII Semana de Iniciação Científica da UFMG, 2008, Belo Horizonte.

XVII Semana de Iniciação Científica da UFMG. , 2008.

5. GOMES, M.T.R, TEIXEIRA, R. D., RIBEIRO, H.A.L, TURCHETTI, A. P., JUNQUEIRA, C. F., GUIMARÃES, B. G., LOPES, M. T. P., SALAS, C.E, NAGEM, R. A. P.

PURIFICATION, CRYSTALLIZATION AND PREMINARY X-RAY ANALYSIS OF CMS1MS2: A CYSTEINE PROTEINASE FROM *CARICA CANDAMARCENSIS* LATEX. In: 18a Reunião Anual de Usuários do LNLS, 2008, Campinas SP.

18a Reunião Anual de Usuários do LNLS - Parte II Biologia Estrutural. , 2008. p.11 - 11

6. TEIXEIRA, R. D., RIBEIRO, H.A.L, GOMES, M.T.R, LOPES, M. T. P., SALAS, C.E

THE PRIMARY STRUCTURE OF MITOGENIC PROTEINASES FROM *CARICA CANDAMARCENSIS*. In:

XXXVII Annual Meeting of SBBq and XI Congress of PABMB., 2008, Águas de Lindóia.

XXXVII Annual Meeting of SBBq and XI Congress of PABMB.. , 2008.

7. TEIXEIRA, R. D., GOMES, M.T.R, RIBEIRO, H.A.L, SALAS, C.E, LOPES, M. T. P.
ESTRUTURA PRIMÁRIA DE CMS2MS2 E CMS2MS3, DUAS ENZIMAS MITOGÊNICAS DO LÁTEX DE CARICA CANDAMARCENSIS. In: XVI Semana de Iniciação Científica, UFMG., 2007, Belo Horizonte.

XVI Semana de iniciação científica, UFMG.. , 2007.

8. RIBEIRO, H.A.L, GOMES, M.T.R, TEIXEIRA, R. D., Felicori, LOPES, M. T. P., SALAS, C.E
KINETIC CHARACTERIZATION OF ENZYMES FROM LATEX OF CARICA CANDAMATRCENSIS In: XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) and 10th IUBMB Conference., 2007, Salvador, Bahia.

XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) and 10th IUBMB Conference.. , 2007.

9. TEIXEIRA, R. D., GOMES, M.T.R, RIBEIRO, H.A.L, SANTOS, A. M., LOPES, M. T. P., SALAS, C.E
PROTEOMIC STUDY OF CARICA CANDAMARCENSIS LATEX In: XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) and 10th IUBMB Conference., 2007, Salvador, Bahia.

XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology. , 2007.

10. RIBEIRO, H.A.L, TEIXEIRA, R. D., GOMES, M.T.R, LOPES, M. T. P., SALAS, C.E
CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS DO LATEX DE CARICA CANDAMARCENSIS ATRAVÉS DE ENSAIOS DE CINÉTICA E INIBIÇÃO. In: XV Semana de Iniciação Científica, UFMG., 2006, Belo Horizonte.

XV Semana de Iniciação Científica, UFMG.. , 2006.

11. TEIXEIRA, R. D., RIBEIRO, H.A.L, GOMES, M.T.R, BEMQUERER, M.P, LOPES, M. T. P., SALAS, C.E

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CISTEÍNO PROTEASES DO LÁTEX DE CARICA CANDAMARCENSIS. In: XV Semana de Iniciação Científica, UFMG., 2006, Belo Horizonte.

XV Semana de Iniciação Científica, UFMG.. , 2006.

12. GOMES, M.T.R, JUNQUEIRA, C. F., TEIXEIRA, R. D., LOPES, M. T. P., CAMARGOS, D., JULIANO, L., OLIVA, M. L. V., SALAS, C.E

THE CYSTEINE PROTEINASES FROM CARICACEAE AS SIGNALING MOLECULES FOR MAMMALIAN CELLS. In: 5th International Conference on Cysteine Proteinases and Their Inhibitors: From Structure to Regulation and Biology., 2006, Portoroz.

5th International Conference on Cysteine Proteinases and Their Inhibitors: From Structure to Regulation and Biology.. , 2006.

13. TEIXEIRA, R. D., RODRIGUES, K. C. L., GOMES, M.T.R, SALAS, C.E, SANCHES, E. F., LOPES, M. T. P.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DEBRIDADORA DE PROTEÍNAS DE CARICA CANDAMARCENSIS. In: XIV Semana de Iniciação Científica, UFMG., 2005, Belo H.

XIV Semana de Iniciação Científica, UFMG.. , 2005.

14. SALAS, C.E, GOMES, M.T.R, MELLO, V.J, RIBEIRO, H.A.L, BEMQUERER, M.P, TEIXEIRA, R. D., LOPES, M. T. P., RICHARDSON, M., JULIANO, L., AVILÉS, F.X.

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGICA DE DOS PROTEASAS MITOGENICAS DEL LATEX DE CARICA CANDAMARCENSIS. In: Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica, 2005, Morelia.

Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica. , 2005.

Produção técnica

Demais produções técnicas

1. TEIXEIRA, R. D.

VIII Curso de Inverno, 2013. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

2. TEIXEIRA, R. D., TORRES, B. B.

VI Curso de Verão em Bioquímica e Biologia Molecular, 2011. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)