UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

NAIARA UTIMURA TORRES

Estudo da ativação de biossíntese do polissacarídeo PEL na formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* PA14

São Carlos
2015

NAIARA UTIMURA TORRES

Estudo da ativação de biossíntese do polissacarídeo PEL na formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* PA14

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestra em Ciências.

Área de concentração:Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Marcos Vicente de Albuquerque Salles Navarro

Versão Corrigida
(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica revisada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Torres, Naiara Utimura
Estudo da ativação de biossíntese do polissacarídeo PEL na formação de biofilme de Pseudomonas aeruginosa PA14 / Naiara Utimura Torres; orientador Marcos Vicente de Albuquerque Salles Navarro - versão corrigida -- São Carlos, 2015.
93 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2015.

1. Biofilme. 2. C-di-GMP. 3. Pseudomonas. I. Navarro, Marcos Vicente de Albuquerque Salles, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio incondicional e por acreditarem no meu trabalho.

Ao meu orientador, Dr. Marcos Navarro, que muito me ensinou desde a iniciação científica, contribuindo para meu crescimento científico, intelectual e pessoal, e ao Instituto de Física de São Carlos, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

A todos do Laboratório de Biologia Estrutural de Secreção Bacteriana e ao Instituto Pasteur, pela oportunidade de realizar meu estágio de mestrado. Especialmente, gostaria de agradecer à Dra. Petya Krasteva e ao Dr. Rémi Fronzes, pela disposição em ajudar, amizade e por todos os ensinamentos que me passaram. *Merci beaucoup mes amis!*

A todo grupo da Professora Dra. Regina Baldini, assim como ao Instituto de Química, pelos ensinamentos, disponibilidade, colaborações e amizade.

Aos melhores companheiros de laboratório, Andrea, Bruno, Éverton, Flávio, Gabriel, Graziele, Helton, Jennifer, Juliana, Nathalya, Raphael e Sumária, deixo meus mais profundos agradecimentos pelos anos de convivência, ensinamentos, ajuda ilimitada, amizade, conversas, desabafos, bolos e guloseimas. Todos vocês são parte essencial desse trabalho, obrigada por tudo!

A todos do grupo de Biofísica Molecular Sérgio Mascarenhas, pelo enorme aprendizado, paciência e disposição em ajudar, bem como pela amizade, parceria e gordices.

Aos melhores amigos de faculdade, os “Moregais”, pelo apoio, parceria, confiança e devoção desses longos anos de amizade. A vocês, deixo meus sinceros agradecimentos por cada palavra amiga, conversa filosófica e sorriso acolhedor que me incentivaram durante essa jornada. Obrigada por serem minha segunda família!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Por fim, agradeço a todos os outros que colaboraram com esse trabalho com suas idéias, diferentes pontos de vista, conhecimento, incentivo, olhar amigo e sorriso sincero.

"*Il faut bien que je supporte deux ou trois chenilles*
si je veux connaître les papillons"
Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

TORRES, N. U. **Estudo da ativação de biossíntese do polissacarídeo PEL na formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* PA14**. 2015. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

Nos últimos anos, um estilo de vida celular vem ganhando destaque no mundo científico: o biofilme. O biofilme é uma comunidade celular em que as células permanecem aderidas a um substrato e envoltas em uma matriz de biopolímeros. Bactérias no estado de biofilme possuem algumas características alteradas, como o aumento da resistência a antibióticos e a facilidade de troca de genes de resistência, sendo um grande inconveniente na área médica e industrial. O patógeno humano *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria gram-negativa causadora de infecções associadas a pacientes que apresentam o sistema imune debilitado, sendo muito comum em casos de fibrose cística. Além disso, *P. aeruginosa* é um organismo modelo no estudo de formação de biofilme, podendo produzir três tipos distintos de exopolissacarídeos: alginato, PSL e PEL. Devido ao pouco conhecimento do polissacarídeo PEL, a cepa *P. aeruginosa* PA14 vem sendo amplamente estudada, uma vez que essa é a única cepa em que PEL é o principal polímero responsável pela estabilidade da matriz de polissacarídeos. No processo de produção e exportação de PEL, sete proteínas são necessárias: Pel(A-G). Segundo predições computacionais e comparações com outros tipos de complexos biossintéticos de exopolissacarídeos, um modelo de arranjo molecular das proteínas Pel foi proposto, embora algumas proteínas não possuam uma função bem determinada no processo de síntese de PEL. Nesse contexto, o trabalho buscou estudar as proteínas envolvidas na formação de PEL para a melhor elucidação do mecanismo de ativação, produção e exportação desse polissacarídeo, com destaque para a enzima glicosiltransferase PelF e a investigação de uma possível interação de PelF com a proteína reguladora de produção do polissacarídeo, PelD, e a transportadora de membrana interna, PelG. Foram realizados diversos testes de interação entre PelF, PelG e construções solúveis de PelD por cromatografia de exclusão molecular, *crosslinking* e *pull-down* que não apresentaram interações entre tais construções, indicando que frações de membrana de PelD ou outros parceiros de interação podem ser necessários para a formação do complexo de síntese e exportação de PEL da membrana interna. Adicionalmente, mutantes de PelD sítio-dirigidos foram construídos em *P. aeruginosa* PA14 e tiveram sua capacidade de formação de biofilme avaliadas para investigação do mecanismo de ativação de PelD. A diminuição da formação de biofilme de mutantes de algumas regiões

de PelD como a hélice S (resíduos 158-176), o *core* hidrofóbico ocupado pela hélice S e resíduos que estabilizam a ligação de c-di-GMP nos levou a propor um mecanismo de ativação desse importante regulador proteico de formação de biofilme em *P. aeruginosa* nunca descrito anteriormente.

Palavras-chave: Biofilme. C-di-GMP. *Pseudomonas*.

ABSTRACT

TORRES, N. U. **Study of the activation of PEL polysaccharide biosynthesis in biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14**. 2015. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

In the last years, a cellular lifestyle has been in the spotlight in the scientific world: the biofilm. Biofilm is a cellular community in which cells are attached to a substrate and surrounded by a biopolymeric matrix. Bacteria in a biofilm lifestyle has some altered characteristics, as a higher antibiotics tolerance and facility in resistance genes exchange, turning them into a big problem in medical and industrial fields. The human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* is a gram-negative bacterium which causes infections associated to patients with an impaired immune system, as frequently found in patients with cystic fibrosis. Moreover, *P. aeruginosa* is a model organism in biofilm formation studies, producing three distinct types of exopolysaccharides: alginate, PSL and PEL. Since there is few information about PEL polysaccharide, the strain PA14 has been broadly studied because this is the unique strain in which PEL is the main polymer that gives stability of the polysaccharide matrix. In the process of PEL production and exportation, seven proteins are required: Pel(A-G). Computational predictions and comparison with other similar exopolysaccharides biosynthetic complexes led to a model of molecular complex of Pel proteins, though some proteins do not have a clear role in the PEL synthesis process. In this context, the work aimed to study the proteins related to PEL synthesis for a better understanding of the mechanism of production and exportation of this polysaccharide, focusing on the glycosyltransferase PelF and the investigation of its possible interaction with PelD, the regulatory protein of the polysaccharide production, and PelG, the putative inner membrane transporter. Several interaction assays were performed with PelF, PelG and soluble constructs of PelD using size exclusion chromatography, crosslinking and pull-down. No interaction was detected, showing that membrane fractions of PelD or other interaction partners can be required to the inner membrane complex of synthesis and export of PEL. Additionally, site-directed mutants of PelD in *P. aeruginosa* PA14 were constructed to evaluate their biofilm formation ability and investigate PelD activation mechanism. Mutants in regions as S-helix (residues 158-176), hydrophobic core occupied by the S-helix and residues of c-di-GMP stabilization presented a decrease of biofilm formation compared to the wild type strain. Those results allowed us to

propose an activation mechanism of this important regulator of biofilm formation in *P. aeruginosa* never described before.

Keywords: Biofilm. C-di-GMP. *Pseudomonas*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estágios de formação de biofilme bacteriano representando etapas de adesão (1), formação de microcolônias (2), maturação (3) e desprendimento das células (4) 19

Figura 2 - Enzimas envolvidas na regulação dos níveis intracelulares de c-di-GMP. 20

Figura 3 - (A) Domínio GGDEF de PleD de *Caulobacter crescentus* (PDB: 1W25), mostrando uma molécula de c-di-GMP ligada ao sítio catalítico (GGEEF) e um dímero de c-di-GMP ligado ao sítio-I representado em esferas. (B) Interações do dímero de c-di-GMP com os resíduos do motivo RxxD do sítio-I. 21

Figura 4 - *Clusters* gênicos dos complexos produtores de celulose, PNAG, alginato, PSL e PEL. As CDSs das enzimas com domínio glicosiltransferase estão representadas em verde e as CDS de proteínas que se ligam a c-di-GMP estão representadas em alaranjado. 23

Figura 5 - (A) Complexo biossintético de celulose de *E. coli*, mostrando a enzima glicosiltransferase em verde e a proteína reguladora, BcsE, em alaranjado. (B) Estrutura molecular da celulose. 24

Figura 6 - Microscopias de biofilmes de *P. aeruginosa* formados a partir de matrizes de alginato, PSL e PEL. (A) Microscopia de força atômica do biofilme de *P. aeruginosa* FRD1, mostrando as células embebidas em alginato. (B) Microscopia confocal de varredura de *P. aeruginosa* PA01, ilustrando a matriz de biofilme composta por PSL e (C) Microscopia eletrônica de varredura do biofilme bacteriano de *P. aeruginosa* PA14, mostrando a rede de polissacarídeos PEL. 25

Figura 7 - (A) Complexo proteico de biossíntese do alginato de *P. aeruginosa*, com destaque para Alg8, a glicosiltransferase do complexo, e Alg44, a enzima reguladora de biossíntese com domínio PilZ. (B) Estrutura molecular do alginato.....26

Figura 8 - (A) Complexo biossintético de PSL de *P. aeruginosa*, com destaque para as glicosiltransferases em verde e (B) estrutura molecular do PSL.....27

Figura 9 - Modelo de complexo biossintético de PEL de *P. aeruginosa*, com destaque para a GT, PelF, em verde e a proteína reguladora, PelD, em alaranjado. 28

Figura 10 - (A) Alinhamento do domínio GAF das estruturas da porção citoplasmática de PelD (PDB: 4EUV e 4DNO) com destaque para o motivo de ligação a c-di-GMP RxxD. Interações dos resíduos de arginina e ácido aspártico do motivo RxxD com (B) uma molécula de c-di-GMP e (C) um dímero de c-di-GMP.....30

Figura 11- Organização de domínios de PelD e predição de *coiled-coil* realizada através do programa MARCOIL. Na figura, observa-se as duas construções de PelD utilizadas nesse trabalho, $PelD^{111-455}$ e $PelD^{176-455}$. $PelD^{111-455}$ contém toda a porção da hélice S e JM e $PelD^{176-455}$ contém uma porção da hélice S (indicada na estrutura, PDB: 4EUV) com pequena probabilidade de formação de *coiled-coil*.....32

Figura 12 - Mudança conformacional do domínio GGDEF de PelD dependente da ligação de c-di-GMP. Alinhamento dos domínios GAF de PelD sem c-di-GMP (cinza claro, PDB: 4ETX), com uma molécula de c-di-GMP (cinza escuro, PDB: 4ETZ) e ligada a um dímero do nucleotídeo (preto, PDB: 4DNO). A hélice S e o dímero de c-di-GMP estão representados em amarelo. 33

Figura 13 - (A) Estrutura cristalográfica de PelD$^{176-455}$ obtida por nosso grupo[56] com domínios GAF e GGDEF mostrados em azul e verde, respectivamente. Resíduos de arginina e ácido aspártico do motivo RxxD estão mostrados em bastão. (B) Alinhamento dos domínios GAF da estrutura cristalográfica resolvida por nosso grupo e 4ETZ, destacando o rearranjo conformacional gerado pela ausência da hélice S e o motivo RxxD em roxo. 33

Figura 14 - Mecanismo de ativação de LapD de *P. fluorescens*. A ligação do c-di-GMP ao domínio EAL desestabiliza a hélice S (azul) provocando seu rearranjo estrutural que é translocado ao domínio periplasmático. Essa mudança provoca o recrutamento da protease periplasmática LapG..... 35

Figura 15 - Mecanismo de ativação de PelD proposto por nosso grupo em 2012, mostrando que a ligação de c-di-GMP promove a ligação de PelF e translocação do polissacarídeo nascente por PelD. 36

Figura 16 - Predições computacionais de estruturas secundárias e domínios proteicos de PelF pelos programa Psipred e Pfam. As barras indicam a confiabilidade da predição, os cilindros indicam hélices alfa (H), as setas indicam fitas beta (E) e as linhas regiões de *loops* (C). As cores indicam os domínios DUF3492 (verde) e GT (alaranjado)..... 58

Figura 17 - Géis de agarose das amplificações de todas as construções periplasmáticas, citoplasmáticas e de membrana estudadas nesse trabalho. 60

Figura 18 - Teste de expressão das construções Pel do periplasma e citoplasma. O primeiro poço representa a cultura não induzida e o segundo poço a cultura induzida com 1 mM IPTG. A seta branca em PelA destaca a banda de sua expressão. 61

Figura 19 - (A) SDS-PAGE do teste de indução de PelF, onde a seta branca ressalta a concentração de 0,01 mM IPTG em que ocorre a saturação da expressão proteica. (B) *Western blot* do teste de indução de PelG com a seta branca indicando a condição de saturação de expressão proteica a 0,8 mM IPTG. 61

Figura 20 - (A) Gel SDS-PAGE com frações da purificação da primeira (esquerda) e segunda IMAC (direita) de PelF, mostrando a fração de proteína purificada após a clivagem com ULP1. (B) Cromatograma de SEC de PelF e gel SDS-PAGE indicando as frações de PelF eluídas. 62

Figura 21 - (A) Curva de calibração de Superdex 75 10/300GL construída com o auxílio de proteinas globulares de massa molecular conhecida. Pontos redondos indicam as posições referentes aos volumes de eluição de cada amostra. (B) Cromatogramas de SEC das construções periplasmáticas. 64

Figura 22 - (A) *Crosslinking* de PelA$^{47-948}$ e PelC$^{27-172}$, onde o primeiro poço indica a proteína controle e o segundo poço indica a proteina com o *crosslinker* EGS. (B) *Crosslinking* de PelF em concentrações proteicas crescentes, mostrando que o aumento da concentração proteica não leva à formação de novos estados oligoméricos. 65

Figura 23 - *Western blot* do teste de solubilidde de PelG em diversos detergentes. Em cada amostra, o primeiro poço representa a fração solúvel e o segundo poço representa a fração insolúvel após o processo de solubilização. O controle foi preparado sem a adição de detergentes. 66

Figura 24 - Teste de clivagem de ULP1 na presença de diferentes detergentes. O primeiro poço de cada detergente representa a fração não clivada e o segundo poço representa a fração incubada com ULP1. Apesar de PelG não ter sido totalmente clivada em todas as condições, é notável a melhor ação enzimática na presença de detergentes não-iônicos. 67

Figura 25 – (A) Primeira e segunda IMAC de PelG, respectivamente. Apesar de PelG possuir aproximadamente 51 kDa, a proteína migra como uma massa aparente menor no gel, indicando um enovelamento parcial mesmo na presença de fortes agentes desnaturantes, fato comum para proteínas de membrana. Além disso, o enovelamento parcial de PelG no gel também é favorecido pela amostra não sofrer tratamento térmico, uma vez que o aquecimento de PelG levava à formação de agregados que não penetravam o gel. (B) Cromatograma de SEC de PelG e gel SDS-PAGE indicando as frações eluídas de PelG. 68

Figura 26 - SEC em Superdex200 10/300 GL de PelG para verificar as melhores condições de expressão e purificação. Setas cinzas indicam diferentes estados oligoméricos de PelG. 69

Figura 27 - Dependência dos estados oligoméricos de PelG na presença de diferentes detergentes. Cromatogramas em linhas mais espessas indicam as condições capazes de estabilizar preferencialmente os estados intermediários e de menor massa molecular. Setas pretas indicam os três estados oligoméricos de PelG em solução. 70

Figura 28 - Microcristais de PelG crescidos em tampões (A) Tris-HCl pH 8,5 e (B) acetato de sódio pH 4,6. Barras de escala representam 10 µm. 70

Figura 29 - *Crosslinking* de PelG na presença e ausência de c-di-GMP, indicando que a formação de dímeros e trímeros de PelG independe de sua concentração protéica ou presença de c-di-GMP. 71

Figura 30 - *Crosslinking* de $PelA^{47-948}$ e $PelC^{27-172}$, mostrando que não ocorre a formação de um complexo proteico entre as duas proteinas 72

Figura 31 - *Crosslinking* de (A) $PelD^{176-455}$ e (B) $PelD^{111-455}$ na presença de concentrações crescentes de c-di-GMP. As massas reais calculadas de $PelD^{176-455}$ e $PelD^{111-455}$ são, respectivamente, 31 e 39 kDa. 73

Figura 32 - Testes de interação entre PelD $^{111-455}$ e PelF realizados por (A) SEC e (B) *crosslinking*. 74

Figura 33 - *Pull-down* de PelF, PelG e $PelD^{111-455}$, com PelG imobilizada na coluna TALON através do *tag* 6xHis-SUMO. Observa-se que a resina provavelmente estava contaminada com PelG, o que não comprometeu a análise já que a banda de eluição de PelG é muito mais pronunciada. Além disso, nota-se que $PelD^{111-455}$ se ligava inespecificamente na resina, mas sua banda de eluição não aumentava na presença de PelG, indicando que essas proteínas não interagiram. 74

Figura 34 - *Pull-down* de $PelD^{176-455}$ com setas pretas não-identificadas mostrando as bandas de proteínas co-eluídas com $PelD^{176-455}$ 75

Figura 35 - Formação de biofilme utilizando o corante cristal violeta em mutantes da biblioteca de tranposons de PA14. (A) Quantificação do biofilme das cepas

selecionadas após a triagem inicial e (B) biofilme corado dos mutantes de PelF e GalU comparados à cepa selvagem. 77

Figura 36 - Estruturas cristalográficas de $PelD^{154-455}$ (PDB: 4ETZ, suposto estado inativado de PelD) e $PelD^{176-455}$ (suposto estado ativado) resolvida por nosso grupo o domínio GAF representado em cinza claro e GGDEF em cinza escuro. Regiões coloridas representam as superficies em contato tanto com a hélice S quanto com o *core* hidrofóbico entre os domínios GAF e GGDEF. Resíduos de aminoácidos marcados indicam aqueles mutados nesse trabalho, como mostrado na tabela 9..... 78

Figura 37 - (A) PCR de colônia mostrando a segunda recombinação gênica de PA14*ΔpelD* com a amplificação positiva do fragmento de 1,5 kpb correspondente ao fragmento deletado. (B) Primeira recombinação da reconstituição de algumas das CDSs mutadas nesse trabalho. Observa-se fragmentos correspondentes ao vetor de reconstituição (3 kpb) e à cepa PA14Δ*pelD* (1,5 kpb), indicando a incorporação do plasmídeo no gDNA. 80

Figura 38 - Redução da formação de biofilme de PA14 *ΔpelD* corado com cristal violeta (canto direito superior) e unidade de adesão dos mutantes gerados, mostrando a importância dos contatos hidrofóbicos da hélice S e região interdomínios para a ativação do complexo Pel. 81

Figura 39 - Análise da influência de c-di-GMP na estabilidade térmica de $PelD^{176-455}$ realizada por DSC. A proteína mantém-se mais estável quando ligada à c-di-GMP, como mostrado na curva vermelha. A precipitação proteica inicia-se próximo a 53 °C, onde observa-se o início do pico exotérmico de precipitação..... 83

Figura 40 - Mecanismo de ativação de PelD proposto nesse trabalho. A ligação do dímero de c-di-GMP causa o deslocamento da hélice S provocando a formação de um *coiled-coil* fraco na região da hélice S exposta e a aproximação dos domínios citoplasmáticos, estabilizada por c-di-GMP. Essa mudança conformacional é translocada ao domínio transmembrânico pela hélice JM, ativando o complexo. Quando as concentrações celulares de c-di-GMP diminuem, o nucleotídeo se desliga de PelD, fazendo a proteína voltar ao seu estado inicial. 86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição das proteínas envolvidas na biossíntese de PEL baseada na predição de domínios proteicos. 29

Tabela 2 - Sequências de DNA clonadas nesse trabalho e seus respectivos *primers* de amplificação. Sequências em azul, verde e amarelo representam porções periplasmáticas, citoplasmáticas e de membrana, respectivamente. 42

Tabela 3 - Detergentes utilizados na otimização de extração e purificação de PelG. 46

Tabela 4 - Sequências iniciadoras utilizadas para amplificação das regiões *up* e *downstream* à CDS de PelD e para a amplificação dos plasmídeos mutantes. *Primers* 1 e 3 se anelam nas extremidades 5' das regiões *up* e *downstream*, respectivamente, enquanto os *primers* 3 e 4 se anelam na extremidade 3'. Além dos mutantes indicados, duplos mutantes de R367A com resíduos da hélice S e domínios GAF e GGDEF também foram construídos. 53

Tabela 5 - Construções clonadas nesse trabalho, mostrando o tamanho dos fragmentos de DNA clonados e as massas moleculares das respectivas construções proteicas expressas. As massas apresentadas correspondem apenas à construção clonada, desconsiderando os 16 kDa da proteína de fusão SUMO no caso das costruções em pET-SUMO. 59

Tabela 6 - Tabela de progressão de cada construção trabalhada. “ ✓” indica que a etapa foi realizada e “x” indica que, apesar dos esforços para concluí-las, as etapas não foram concluídas com sucesso. 63

Tabela 7 - Massas calculadas das construções periplasmáticas e de PelF comparadas às massas calculadas a partir da SEC. Construções de PelA e PelC aparentam estar em estado monoméricos em solução, enquanto que PelF possivelmente possui duas formas oligoméricas em solução: monomérica e dimérica. 64

Tabela 8 - 36 proteínas de *P. aeruginosa* PA14 selecionadas por PSI-BLAST e KEGG como possíveis parceiros de interação de PelF. 76

Tabela 9 - Mutantes de PelD em *P. aeruginosa* PA14 com seus respectivos fenótipos esperados e alterações estruturais promovidas. “*” indica a alteração provocada na forma ativada de PelD. 79

SUMÁRIO

1 Introdução 19
1.1 Biofilme bacteriano e c-di-GMP 19
1.2 Matriz extracelular e exopolissacarídeos 21
1.3 Matriz de exopolissacarídeos de *Pseudomonas aeruginosa* 24
1.4 Modelo de ativação de PelD 32
2 Objetivos 39
3 Metodologia 41
3.1 Obtenção de amostras proteicas 41
3.1.1 Clonagem 41
3.1.2 Testes de expressão e indução 43
3.1.3 Expressão heteróloga e purificação de construções solúveis 44
3.1.4 Otimização da purificação de PelG 45
3.1.5 Expressão heteróloga e purificação de PelG 46
3.1.6 Otimização de tampões 47
3.2 Ensaios cristalográficos 48
3.3 Estudos oligoméricos 49
3.3.1 Cromatografia de exclusão molecular 49
3.3.2 *Crosslinking* 49
3.3.3 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo 50
3.4 Estudos de interação 50
3.4.1 Cromatografia de exclusão molecular de PelF e porções citoplasmáticas de PelD 50
3.4.2 *Crosslinking* 51
3.4.3 Quantificação de biofilme dos mutantes da biblioteca de transposons de *P. aeruginosa* PA14. 51
3.4.4 *Pull-down* 52
3.5 Estudos do controle de PelD por c-di-GMP 52
3.5.1 Clonagem 52
3.5.2 Análise da formação de biofilme em mutantes de PelD 55
3.5.3 Calorimetria diferencial de varredura 55
4 Resultados e discussão 57
4.1 Obtenção e caracterização de amostras proteicas 57
4.1.1 Clonagem 57
4.1.2 Teste de expressão e indução 60
4.1.3 Produção e caracterização proteica 61

4.1.3.1 PelF e construções solúveis 62
4.1.3.2 PelG 66
4.2 Estudos de interação 71
4.2.1 Estudos de interação da porção periplasmática do complexo Pel 72
4.2.2 Estudos do recrutamento de PelF pelo complexo Pel de membrana interna 72
4.2.3 Busca por parceiros de interação fora do complexo biossintético de PEL 75
4.3 Estudo do controle de PelD por c-di-GMP 77
4.3.1 Construção de mutantes 79
4.3.2 Análise de formação de biofilme em mutantes de PelD 80
4.3.3 Calorimetria diferencial de varredura 83
5 Conclusões e perspectivas 85
REFERÊNCIAS 87

1 Introdução

1.1 Biofilme bacteriano e c-di-GMP

O biofilme é caracterizado como uma comunidade celular séssil aderida a um substrato e envolta em uma matriz composta por DNA, proteínas e, principalmente, exopolissacarídeos.[1-3] Biofilmes microbianos podem conter uma ou mais espécies de microrganismos, sendo a primeira muito frequente em infecções e implantes hospitalares.[1,4] Bactérias em estado de biofilme possuem maior resistência a antibióticos e maior facilidade de troca de genes de resistência devido à proximidade entre as células.[1,3,5] Além disso, tais bactérias possuem maior tolerância contra radiação ultravioleta, alteram sua capacidade de biodegradação e aumentam a produção de metabólitos secundários.[1,3,6] Dessa forma, biofilmes bacterianos causam grandes preocupações na área médica e industrial, sendo frequentemente encontrados em infecções crônicas e agudas, acumulação e entupimento de cateteres e corrosão de tubulações.[2]

A formação de biofilme ocorre em um processo de eventos ilustrados na figura 1. Primeiramente, células no estado livre se aderem em um substrato sólido por meio de proteínas adesinas, flagelos, pili ou fímbrias.[1,3,6-7] Posteriormente, as células aderidas se desenvolvem e se multiplicam, originando microcolônias que sintetizam exopolissacarídeos (EPS).[1,3,6-7] A maturação do biofilme ocorre quando a matriz de polissacarídeos atua como substrato para novos agentes colonizadores, que podem se ligar diretamente às microcolônias pioneiras ou formar coagregados.[1] Por fim, as células podem se desprender da matriz e voltar à forma livre, podendo assim colonizar um novo substrato.[1,6-7]

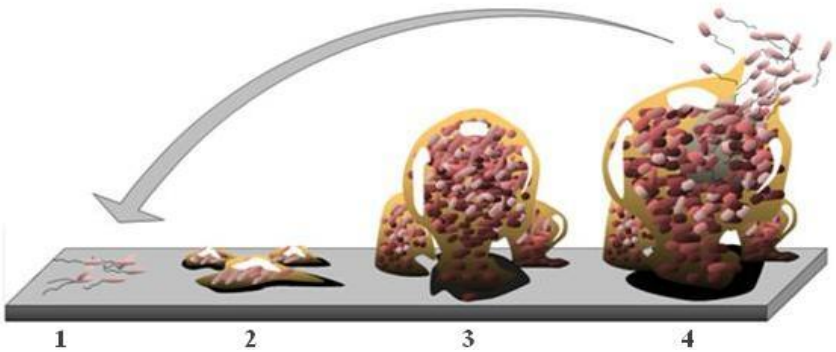

Figura 1 - Estágios de formação de biofilme bacteriano representando etapas de adesão (1), formação de microcolônias (2), maturação (3) e desprendimento das células (4).
Fonte: Adaptada de MONROE [6]

O principal mensageiro intracelular da formação do biofilme bacteriano é a (3'-5') guanosina monofosfato cíclica dimérica (c-di-GMP), um nucleotídeo que pode assumir forma dimérica em solução dependendo de sua concentração e da presença de metais divalentes.[8-11] Em geral, elevadas concentrações intracelulares de c-di-GMP induzem as células a passarem do estado planctônico para o estado de biofilme.[12-13] Sua concentração intracelular é regulada por enzimas diguanilato ciclases (DGC) contendo o domínio GGDEF ativo e fosfodiesterases (PDE) contendo o domínio EAL ou HD-GYP ativos (figura 2).[14-15] Tais domínios recebem os nomes baseados em seus motivos conservados, os quais apresentam alguns dos aminoácidos catalíticos essenciais para as suas atividades enzimáticas.[14-15]

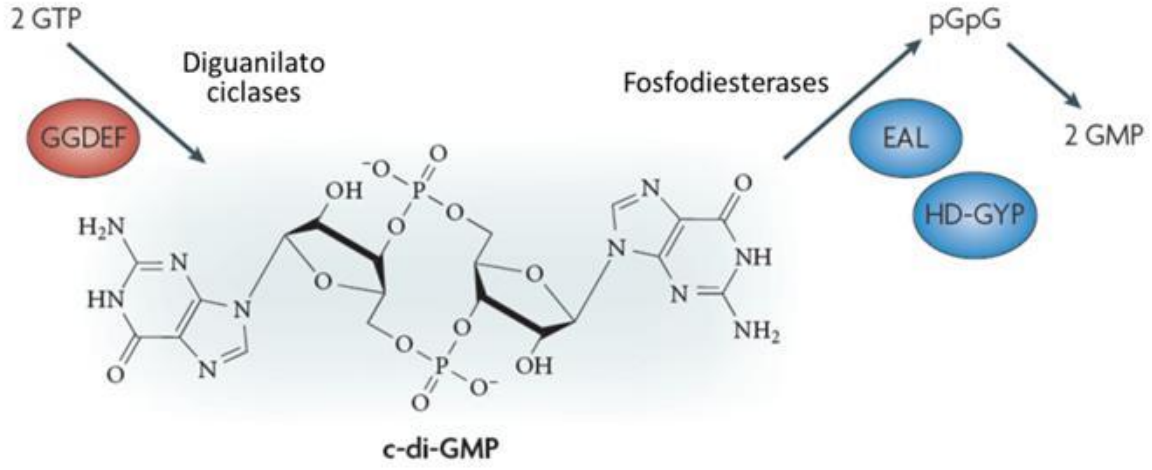

Figura 2 - Enzimas envolvidas na regulação dos níveis intracelulares de c-di-GMP.
Fonte: Adaptada de HENGGE [14]

As enzimas com domínio GGDEF sintetizam c-di-GMP a partir de duas moléculas de GTP.[14-15] Para serem enzimaticamente ativas, as enzimas com domínio GGDEF possuem forma dimérica e cada monômero se liga a uma molécula de GTP para juntos desempenharem a catálise.[12-13] Além disso, aproximadamente 50% das enzimas com domínio GGDEF possuem um sítio de ligação de c-di-GMP autoinibitório (sítio I) com o motivo RxxD.[13,15] Tal motivo foi primeiramente descrito observando-se a estrutura cristalográfica da DGC PleD de *Caulobacter crescentus* e localiza-se aproximadamente cinco resíduos antes do domínio GGDEF (figura 3).[15-16] Por sua vez, a degradação do c-di-GMP é realizada por PDEs que clivam a ligação fosfodiéster do dinucleotídeo gerando 5'fosfoguanilil-(3'-5')-guanosina (pGpG).[14-15] Posteriormente, proteínas com domínio HD-GYP podem ainda quebrar pGpG em duas moléculas de GMP.[17]

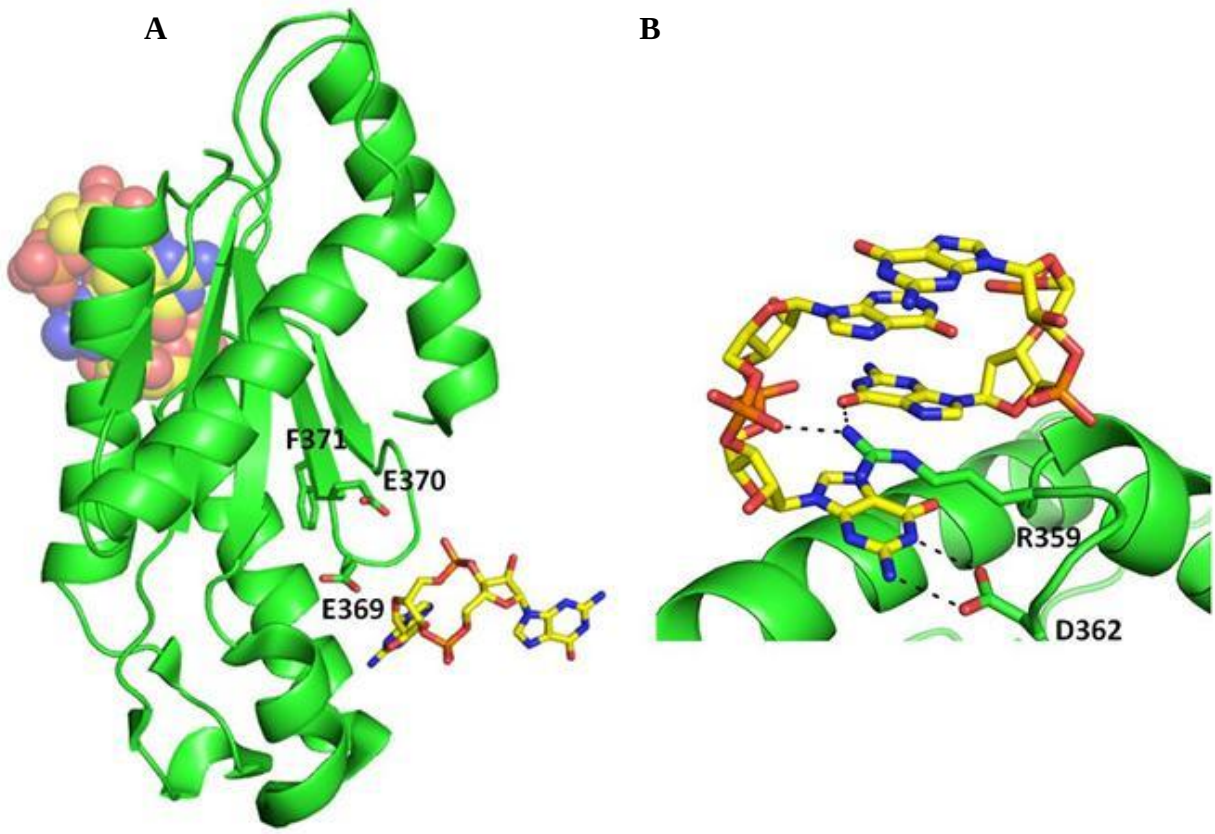

Figura 3 - (A) Domínio GGDEF de PleD de *Caulobacter crescentus* (PDB: 1W25), mostrando uma molécula de c-di-GMP ligada ao sítio catalítico (GGEEF) e um dímero de c-di-GMP ligado ao sítio-I representado em esferas. (B) Interações do dímero de c-di-GMP com os resíduos do motivo RxxD do sítio-I.
Fonte: Elaborada pela autora.

Muitos dos domínios descritos acima são comumente encontrados degenerados em enzimas, não exercendo função catalítica, mas atuando como sítio de ligação específico para c-di-GMP.[13,15] Além de domínios catalíticos degenerados, outras macromoléculas efetoras como *riboswitches*, fatores de transcrição e proteínas com domínio PilZ também são capazes de se ligar a c-di-GMP, atuando como moléculas sinalizadoras.[18-20] Domínios GGDEF podem também ser encontrados em tandem com domínios EAL ou HD-GYP em uma mesma proteína. Enzimas desse tipo podem ser bifuncionais ou exercerem unicamente a função de DGC ou de PDE por apresentarem um de seus domínios catalíticos degenerados.[14,21]

1.2 Matriz extracelular e exopolissacarídeos

Matrizes de biofilmes variam de acordo com o ambiente externo e cada microrganismo que a compõe. Na maior parte dos biofilmes, tal matriz pode ultrapassar 90%

da massa seca de todo o biofilme, com a massa celular representando menos de 10% da massa seca total.[22] Em geral, a matriz do biofilme é composta por EPSs, proteínas e DNA, contendo também, em menor escala, lipídeos, biosurfactantes e outras substâncias secretadas pelas células.[3,22] Proteínas podem atuar na estruturação do biofilme, formar barreiras de proteção contra agentes microbianos, digerir compostos para aquisição de nutrientes e atuar em diversas reações enzimáticas.[23] As moléculas de DNA possuem papel importante na estrutura e coesão de biofilmes, além de serem utilizadas na transferência horizontal de genes.[22] Já os EPSs atuam como fonte de nutrientes e são essenciais na estruturação do biofilme, formação de barreira protetora e retenção de água e outros componentes.[22]

EPSs são usualmente produzidos por complexos de proteínas transmembranas que sintetizam, modificam e translocam o polissacarídeo através da membrana da bactéria. As sequências de DNA codificantes (do inglês, CDSs) das proteínas presentes nesses complexos estão quase sempre dispostas em operons no DNA genômico (gDNA) da célula.[23] A figura 4 ilustra alguns dos operons de complexos biossintéticos de exopolissacarídeos mais estudados. Alguns operons de EPSs encontram-se distribuídos no gDNA formando mais de um *cluster* gênico, como os operons *bcs* de *Escherichia coli*, *alg* de *Pseudomonas aeruginosa* e *vps* de *Vibrio cholerae* que codificam proteínas de produção de celulose, alginato e polissacarídeo de *Vibrio* (VPS), respectivamente.[24-25] Além disso, muitas das CDSs de enzimas de produção dos precursores de exopolissacarídeos encontram-se fora de seus respectivos operons ou até mesmo em operons de outras vias metabólicas. Como exemplo, pode-se citar AlgC, uma fosfomanomutase envolvida na síntese de precursor do alginato, que localiza-se isolada do operon *alg*.[26] Por outro lado, complexos biossintéticos de celulose, 2,3-poli-β-1,6-N-acetilglicosamina (PNAG), PSL (do inglês, *polysaccharide synthesis locus*) e PEL (película) utilizam enzimas de outras vias biossintéticas para a produção de seus precursores. Para a síntese dos precursores de PSL, por exemplo, são recrutadas enzimas de duas vias metabólicas diferentes: AlgC e GalU, enzimas da via metabólica de UDP-glicose, e RmlC, epimerase da via de síntese de dTDP-raminose.[26]

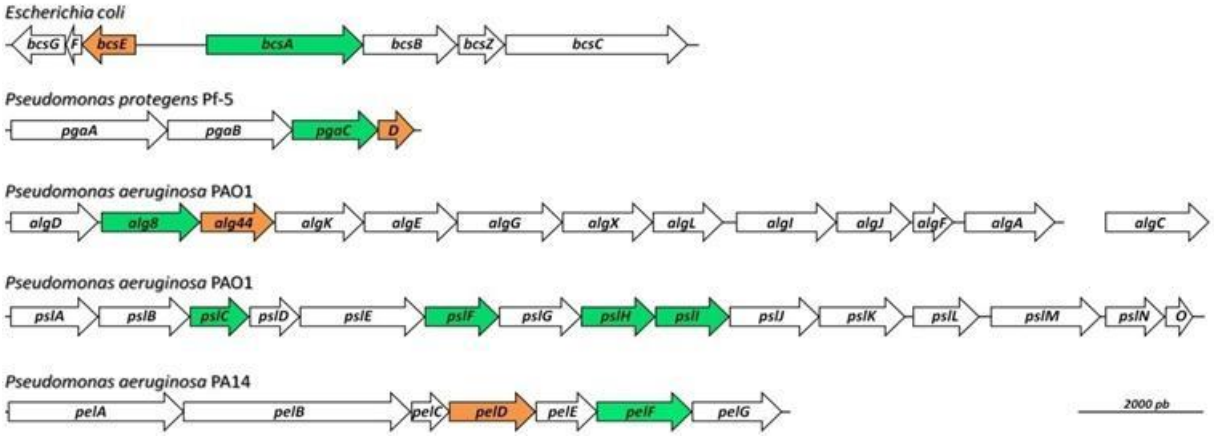

Figura 4 - *Clusters* gênicos dos complexos produtores de celulose, PNAG, alginato, PSL e PEL. As CDSs das enzimas com domínio glicosiltransferase estão representadas em verde e as CDS de proteínas que se ligam a c-di-GMP estão representadas em alaranjado.
Fonte: Elaborada pela autora.

Um dos complexos biossintéticos mais bem estudados até o momento é o complexo de síntese de celulose, um polímero linear formado pela ligação de moléculas de glicose. Celulose é o biopolímero mais abundante do planeta, sendo encontrado em bactérias (*Salmonella enteritidis*, *E coli*, *Thermosynechococcus vulcanus*, *Rhodobacter sphaeroides*, entre outras), algas e, principalmente, compondo a parede celular de plantas. A figura 5A ilustra o complexo de síntese de celulose de *E. coli*. BcsA é uma proteína de membrana interna que possui um domínio glicosiltransferase (GT) e um domínio PilZ citoplasmáticos.[27] BcsB é uma proteína periplasmática que forma um complexo com BcsA utilizando duas hélices anfipáticas localizadas em seu C-terminal.[27] BcsE contém um domínio GIL (*GGDEF I-site like*) capaz de se ligar a c-di-GMP.[28] Apesar de sua função não ser totalmente esclarecida, foi visto que a ligação de c-di-GMP à BcsE ativa a produção de celulose.[28] Dessa forma, o complexo de síntese de celulose é duplamente ativado pela ligação de c-di-GMP em BcsE e no domínio PilZ de BcsA.[27,29] No modelo de ativação de BcsA, um dímero de c-di-GMP se liga ao domínio PilZ causando o afastamento de um *loop* que provoca uma abertura para a entrada de UDP-glicose, o substrato de BcsA.[27,29] No periplasma, o polímero é translocado por BcsB e modificado pela hidrolase BcsZ.[25]

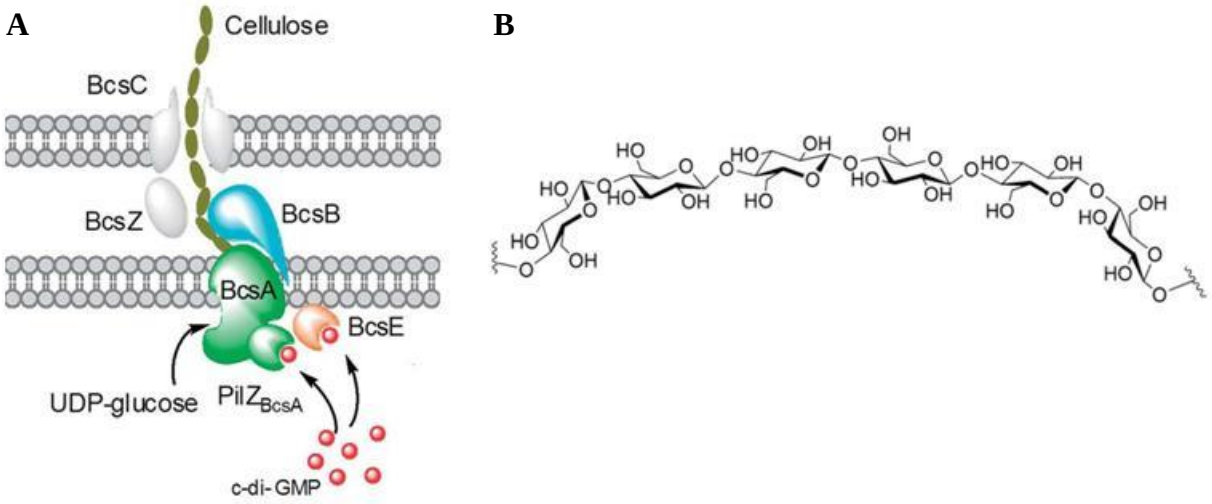

Figura 5 - (A) Complexo biossintético de celulose de *E. coli*, mostrando a enzima glicosiltransferase em verde e a proteína reguladora, BcsE, em alaranjado. (B) Estrutura molecular da celulose.
Fonte: Adaptada de LIANG [25]

1.3 Matriz de exopolissacarídeos de *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa é uma bactéria gram-negativa do tipo bastonete frequentemente associada a infecções em humanos, animais e plantas.[30] Apesar de classificada como um organismo aeróbico restrito, alguns autores a classificam como anaeróbico facultativo por sua capacidade de colonizar ambientes com restrições de oxigênio.[31-32] Em seu estado de vida livre, *P. aeruginosa* possui um único flagelo polar que auxilia em sua motilidade e adesão em certos substratos. Infecções causadas por *P. aeruginosa* afetam principalmente pessoas com sistema imune previamente debilitado, sendo muito comuns em pacientes com fibrose cística, doença genética caracterizada pelo acúmulo de muco no pulmão que favorece colonizações bacterianas.[26,33]

Essa bactéria é um organismo modelo no estudo de formação de biofilme e produz uma matriz de biofilme que pode ser sintetizada a partir de três EPS distintos: alginato, PSL e PEL (figura 6).[26,34] As sequências gênicas das proteínas envolvidas na síntese de PEL foram primeiramente descritas em 2004 por *Friedman* e *Kolter*, que mostraram que o operon *pel* era responsável por codificar o complexo proteico que produzia uma película de biofilme na interface ar-líquido do meio de cultura estático contendo *P. aeruginosa*.[33]

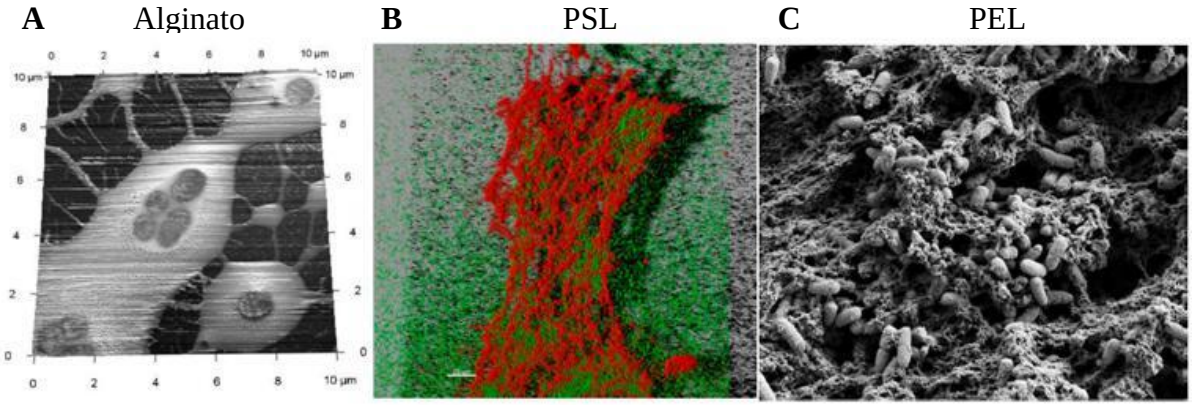

Figura 6 - Microscopias de biofilmes de *P. aeruginosa* formados a partir de matrizes de alginato, PSL e PEL. (A) Microscopia de força atômica do biofilme de *P. aeruginosa* FRD1, mostrando as células embebidas em alginato. (B) Microscopia confocal de varredura de *P. aeruginosa* PA01, ilustrando a matriz de biofilme composta por PSL e (C) Microscopia eletrônica de varredura do biofilme bacteriano de *P. aeruginosa* PA14, mostrando a rede de polissacarídeos PEL.
Fonte: Adaptada de FRIEDMAN; KOLTER [33]

Como já discutido anteriormente, cepas infectantes de *P. aeruginosa* produzem preferencialmente alginato, um polissacarídeo capsular que confere maior proteção à célula. [34] Cepas não infectantes produzem, em maior quantidade, EPS agregativos para a melhor manutenção estrutural do biofilme, como PSL e PEL. Uma vez que as várias cepas de *P. aeruginosa* apresentam variação na produção de polissacarídeos agregativos, estas foram divididas nas quatro classes listadas abaixo:[34-35]

- **Classe I:** PEL é o principal responsável pela estabilidade da matriz. O único representante dessa classe é PA14;
- **Classe II:** cepas que, apesar de serem capazes de produzir PEL, produzem majoritariamente PSL, como PAO1;
- **Classe III:** cepas que produzem baixas quantidades de PSL e PEL. Nessa classe, quando um dos polissacarídeos não é produzido, a estabilidade da matriz é pouco alterada;
- **Classe IV:** apresentam uma superprodução de PEL e PSL.

As duas cepas mais estudadas na via de formação de biofilme, PA14 e PAO1, enquadram-se nas classes I e II, respectivamente. PA14 é incapaz de produzir PSL devido a uma deleção natural de três CDSs de proteínas da via de biossíntese de PSL. Cepas da classe IV são as únicas que não apresentam diminuição da formação de biofilme quando genes *pel* e *psl* são deletedos separadamente.[35] Tais cepas conservam os dois *loci* de produção de EPSs agregativos intactos, sendo que a inativação de um deles não interfere na capacidade de formação de biofilme dessas cepas.[35] Isso confere uma redundância estrutural de EPS para as

bactérias da classe IV, minimizando os riscos e impactos de possíveis mutações em um desses operons, como ocorrido com PA14.[35]

Alginato é um polímero capsular, linear e essencial na formação de biofilme de *P. aeruginosa* de pacientes com fibrose cística. A produção de alginato inicia-se com as enzimas AlgA, AlgB, AlgC e AlgD que sintetizam GDP-manuronato, precursor do alginato, a partir de frutose-6-fosfato (figura 7).[26] Dentre as CDSs do complexo de formação de alginato, *algC* é a única sequência que se encontra fora do operon *algC*. Quatro proteínas estão presentes na membrana interna: AlgI, uma proteína sem função descrita, AlgJ, uma enzima hidrolase, Alg8, uma proteína com quatro domínios transmembrana e um domínio GT citoplasmático e Alg44, uma proteína com domínio N-terminal citoplamático PilZ seguido por uma hélice transmembrana e um domínio periplasmático.[26,36] Nesse complexo, a síntese do polímero é realizado por Alg8 que tem sua ativação regulada pela ligação de um dímero de c-di-GMP ao domínio PilZ de Alg44.[37-38] A deleção de *alg8* e *alg44* do gDNA de *P. aeruginosa*, bem como a não ligação de um dímero de c-di-GMP a Alg44, inativam a biossíntese de alginato.[36,38] No periplasma, o polímero é acetilado randomicamente por AlgI, AlgJ e AlgF e é epimerizado por AlgG.[25] O alginato é então levado à membrana externa por AlgK, uma proteína que possui repetições do tipo TPR, domínio encontrado na formação de complexos e *scaffolds*, para finalmente ser exportado por AlgE, uma porina com barril-β de 18 fitas que forma complexo proteico com AlgK.[39]

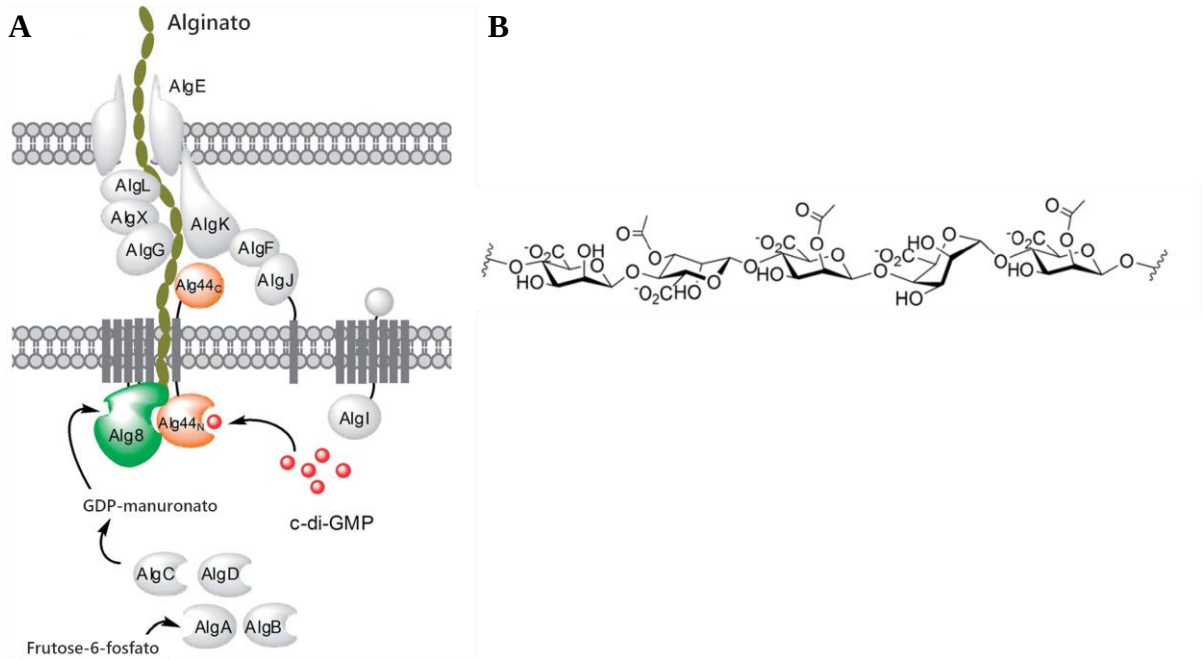

Figura 7 - (A) Complexo proteico de biossíntese do alginato de *P. aeruginosa*, com destaque para Alg8, a glicosiltransferase do complexo, e Alg44, a enzima reguladora de biossíntese com domínio PilZ. (B) Estrutura molecular do alginato.

Fonte: Adaptada de LIANG [25]

Primeiramente descritas em 2004, as CDSs das proteínas do complexo PSL encontram-se no operon nomeado *psl* de *P. aeruginosa*.[40] PSL é um heterossacarídeo sintetizado a partir de GDP-manose, UDP-glicose e dTDP-raminose (figura 8). A produção desses precursores envolve PslB e enzimas de outras vias biossintéticas, como AlgC, GalU e RmlC.[26] Diferentemente dos outros complexos biossintéticos citados, o complexo PSL possui cinco enzimas GTs (enzimas GTs recebem a mesma nomenclatura de seus domínios GTs), PslA, PslC, PslH, PslF e PslI, sendo a primeira localizada na membrana interna, com o domínio GT citoplasmático, e o restante localizadas no citoplasma da célula. Apesar de não haver uma aparente regulação da biossíntese de PSL por c-di-GMP, o nucleotídeo regula a transcrição do operon *psl* através do fator de transcrição FleQ.[20,41] Além disso, mesmo com a ausência de domínios convencionais de ligação a c-di-GMP, a hipótese do nucleotídeo se ligar na interface de interação das proteínas Psl, mediando um complexo ativado, não pode ser descartada, já que tal mecanismo foi observado no complexo biossintético de PNAG.[42] PslE é uma proteína de membrana interna com um domínio citoplasmático tirosina autoquinase e um domínio periplasmático homólogo a Wzz. Wzz é uma proteína da via de biossíntese de lipopolissacarídeo bacteriano que se organiza em estruturas hexaméricas ou octaméricas, formando um grande poro central que pode auxiliar no transporte do polímero.[43] Uma vez no periplasma, o polímero é possivelmente modificado pela hidrolase PslG para posteriormente ser exportado pela única proteína de membrana externa, PslD.

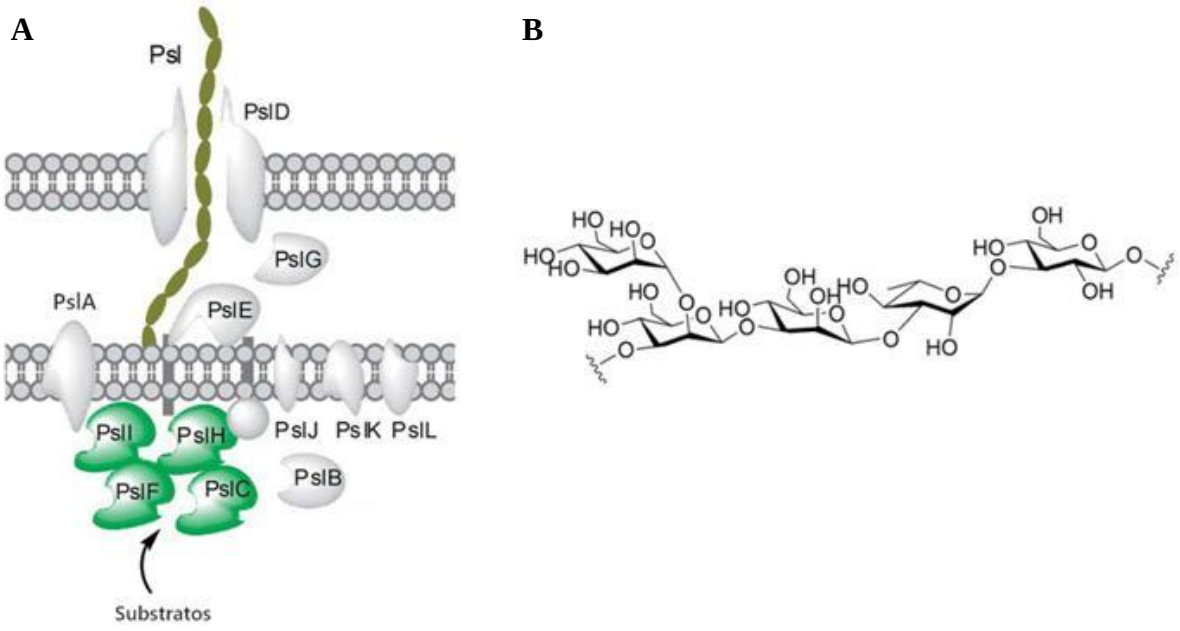

Figura 8 - (A) Complexo biossintético de PSL de *P. aeruginosa*, com destaque para as glicosiltransferases em verde e (B) estrutura molecular do PSL.
Fonte: Adaptado de LIANG [25]

Apesar de existirem algumas evidências estruturais do exopolissacarídeo PEL, sua estrutura molecular ainda não foi totalmente desvendada. Sua primeira descrição se deu em 2004, em que tratamentos enzimáticos e bioquímicos da matriz de biofilme mostraram que PEL apresenta ligações glicosídicas do tipo 1→4 e 1→6.[33] Em 2015, *Jennings* e colaboradores mostraram por análises de clivagem de ligações glicosídicas que PEL é um polímero linear, parcialmente acetilado com carga positiva e majoritariamente composto de N-acetilgalactosamina e N-acetilglicosamina.[44] Além disso, foi mostrado que anticorpos contra PNAG e quitosana, assim como o tratamento com quitosanase, também se mostraram efetivos contra PEL.[44] Estudos de PelF, a GT do complexo PEL, mostraram que a enzima é específica para açúcares ligados à UDP, como UDP-glicose.[44-45]

O complexo biossintético de PEL é composto por sete proteínas denominadas Pel(A-G) de acordo com a ordem em que seus respectivas CDSs aparecem no gDNA.[33,46] Estudos computacionais baseados nas sequências primárias das proteínas Pel ajudaram a elaborar um modelo para o complexo biossintético de PEL. A tabela 1 mostra as características preditas de cada proteína e a figura 9 esquematiza o complexo enzimático.

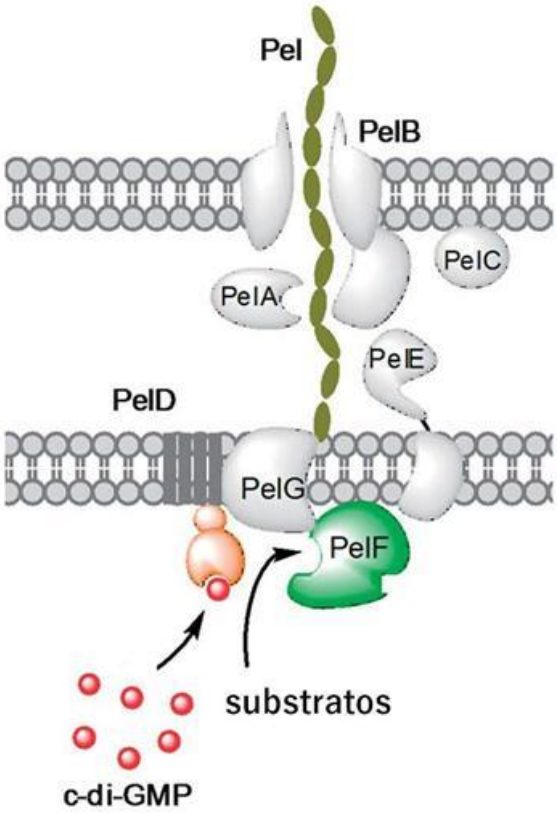

Figura 9 - Modelo de complexo biossintético de PEL de *P. aeruginosa*, com destaque para a GT, PelF, em verde e a proteína reguladora, PelD, em alaranjado.
Fonte: Adaptada de LIANG [25]

Tabela 1 - Descrição das proteínas envolvidas na biossíntese de PEL baseada na predição de domínios proteicos.

Proteína	Descrição	Referência
PelA	Acetiltransferase	*Colvin* e colaboradores, 2013
PelB	β-porina de membrana externa com domínio TPR	*Franklin* e colaboradores, 2011
PelC	Proteína auxiliar de membrana externa (OMA)	*Vasseur* e colaboradores, 2007
PelD	Proteína reguladora com domínios GAF e GGDEF	*Whitney* e colaboradores, 2012 e *Li* e colaboradores, 2012
PelE	Proteína de membrana interna com domínio TPR	*Franklin* e colaboradores, 2011
PelF	Glicosiltransferase	*Ghafoor* e colaboradores, 2013
PelG	Transportador de polissacarídeos de membrana interna	*Vasseur* e colaboradores, 2005

Fonte: Elaborada pela autora.

Predições computacionais mostram que a única proteína inteiramente citoplasmática do complexo Pel é PelF. Essa enzima possui um domínio GT e encontra-se envolvida na polimerização do polissacarídeo. Estudos revelaram que a expressão de PelF ocorre apenas no período de crescimento do biofilme, reforçando a ideia de que o PEL possui função estrutural.[5] O mecanismo de síntese e translocação do polissacarídeo para o periplasma ainda não foi totalmente elucidado. Acredita-se que esse processo seja mediado por PelD, PelE ou PelG, as únicas proteínas contendo domínios transmembranares que são preditas de localizarem-se na membrana interna.[26] Embora a interação entre PelF e outras proteínas do complexo Pel ainda não foi comprovada, estudos de *pull-down* indicam que PelF pode ter outros parceiros de interação citosólicos como uma provável proteína com domínio acetiltransferase e PA4657, uma proteína com domínio oxidorredutase dependente de FAD/NAD.[45] Interessantemente, oxidorredutases desse tipo são capazes de manter pontes de dissulfeto em proteínas, podendo ser essa sua função em relação à PelF.[47]

PelD é uma proteína essencial para a formação da película de biofilme de *P. aeruginosa* que contém uma porção citosólica e um domínio de membrana interna DUF4118.[38,48] A porção citosólica de PelD engloba um domínio GAF, domínio que comumente se liga a nucleotídeos, seguido de um domínio GGDEF degenerado (RNDEG). Apesar do domínio GGDEF não possuir função catalítica, PelD mantém o motivo de ligação a c-di-GMP do sítio-I intacto, sendo capaz de se ligar tanto a uma como a duas moléculas do nucleotídeo.[49-50] A figura 10 ilustra duas estruturas cristalográficas de PelD ligadas a uma e a duas moléculas de c-di-GMP. Por ser capaz de interagir com a molécula reguladora da

formação de biofilme, acredita-se que PelD seja a proteína reguladora do complexo biossintético de PEL, uma vez que ela é a única proteína com domínio de ligação a c-di-GMP. De fato, cepas de *P. aeruginosa* carregando PelD com mutações de resíduos essenciais para o reconhecimento de c-di-GMP são incapazes de formar biofilmes.[50-51] O mecanismo de regulação da produção de PEL e a funcionalidade do domínio transmembrânico de PelD permanecem desconhecidos, bem como a função de PelE.

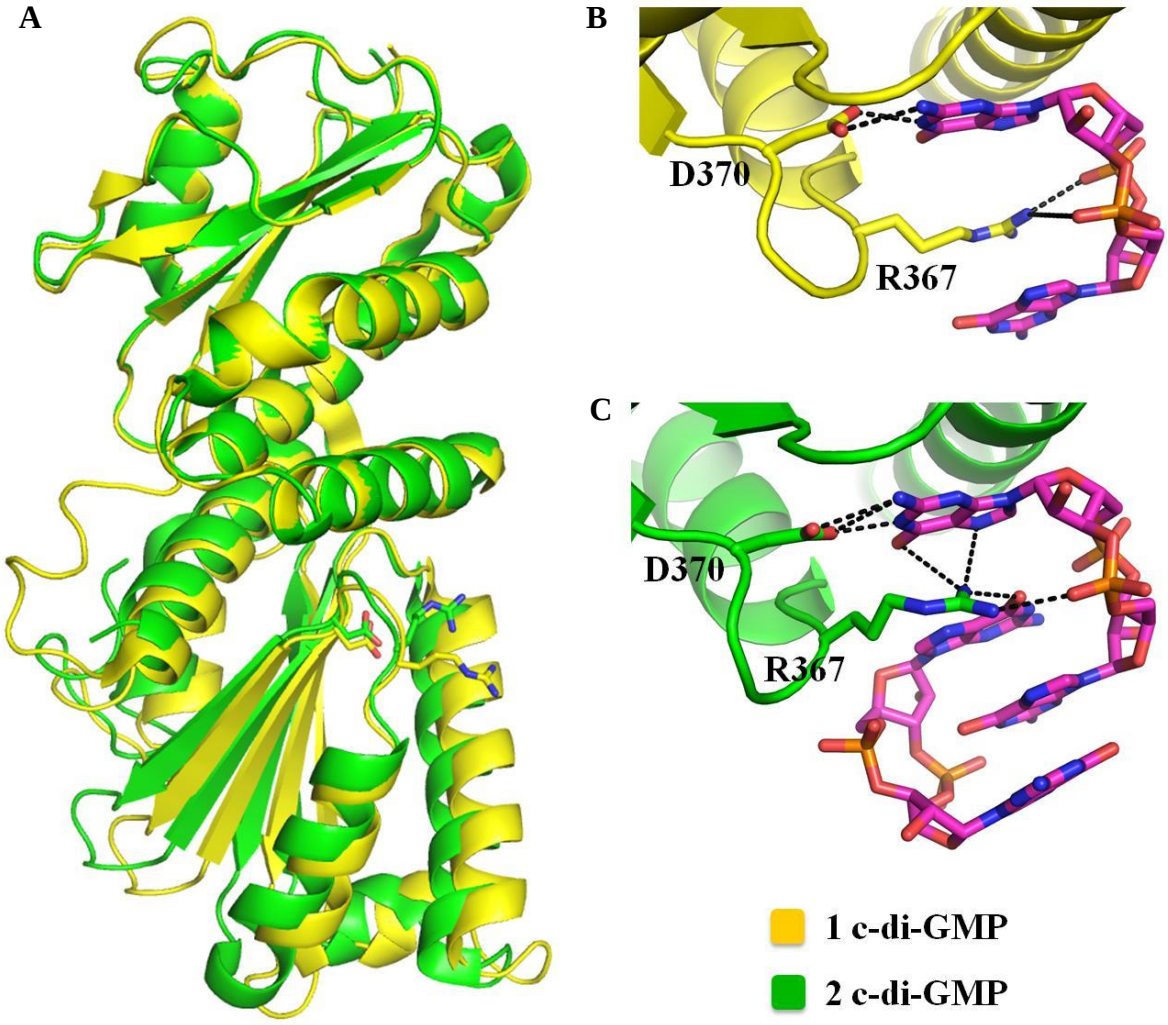

Figura 10 - (A) Alinhamento do domínio GAF das estruturas da porção citoplasmática de PelD (PDB: 4EUV e 4DNO) com destaque para o motivo de ligação a c-di-GMP RxxD. Interações dos resíduos de arginina e ácido aspártico do motivo RxxD com (B) uma molécula de c-di-GMP e (C) um dímero de c-di-GMP.
Fonte: Elaborada pela autora.

Predições de domínios proteicos mostram que PelG apresenta 12 hélices de membrana interna com elevada porcentagem de resíduos de leucinas e isoleucinas em sua cadeia polipeptídica (21,3 e 7,9%, respectivamente).[48] Tais características são típicas de membros da família de transportadores de polissacarídeos procarióticos (do inglês, PST), proteínas que

transportam precursores de lipopolissacarídeos e carboidratos complexos.[52] Alguns membros da família PST atuam em conjunto com outras proteínas que regulam a passagem de carboidratos complexos.[53-54] Dessa forma, tem sido especulado que PelG seja a possível transportadora de polissacarídeo de membrana interna, sendo esta provavelmente regulada por PelD.

A única proteína inteiramente periplasmática desse complexo é PelA, uma proteína fundamental para a formação de biofilme de PA14.[48,55] PelA apresenta atividade deacetilase *in vitro* que corrobora com a detecção de açúcares aminoacetilados no polissacarídeo PEL.[44,55] Dessa forma, acredita-se que PelA possa modificar o polissacarídeo nascente antes do mesmo ser translocado para o exterior da célula, desempenhando papel similar a acetilases AlgI, AlgJ e AlgF do complexo de síntese de alginato.

As proteínas transmembrânicas restantes localizam-se na membrana externa com domínios periplasmáticos. PelB é uma proteína rica em fitas β, estrutura comumente encontrada em porinas de membrana externa. PelB contém um domínio periplasmático TPR que possivelmente interage com o domínio TPR de PelE para proteger o polissacarídeo durante sua migração no periplasma, desempenhando papel similar ao domínio TPR de AlgK.[26] A segunda proteína de membrana externa é PelC, proteína essencial na produção de PEL.[46] PelC foi prevista ser um membro de proteínas auxiliares de membrana externa (do inglês, OMA), proteínas multiméricas que ajudam no transporte de substâncias para o meio extracelular.[46] Apesar de haver várias teorias sobre a funcionalidade de PelC, nenhuma delas ainda foi comprovada.

Análises de bioinformática e comparações dos complexos biossintéticos descritos sugerem que os mecanismos de regulação, produção e exportação de todos os polissacarídeos possuam semelhanças entre si. Por exemplo, produção de celulose, alginato e PEL envolvem proteínas reguladoras com domínios de ligação a c-di-GMP que se encontram ancoradas na membrana interna (BcsA e BcsE, Alg44 e PelD, respectivamente). No periplasma, os polímeros sofrem modificações catalisadas por hidrolases ou acetilases e, no caso de PEL e alginato, são transportados através de um *scaffold* proteico formado pelo domínio TPR de PelB, PelE e AlgK. Por essas semelhanças, acredita-se que a produção de PEL seja ativada pela interação de c-di-GMP com PelD que, por sua vez, regula a ativação do complexo. A fim de analisar essa hipótese, diversos estudos estruturais e bioquímicos foram realizados, levando a um modelo de ativação de PelD.

1.4 Modelo de ativação de PelD

Como descrito anteriormente, PelD possui um domínio de membrana interna seguido de dois domínios citoplasmáticos GAF e GGDEF (figura 11). Assim como na GT translocadora Alg8, o domínio de membrana de PelD é formado por quatro hélices transmembranas que são conectadas ao domínio GAF por uma longa hélice α, denominada hélice justamembrana (hélice JM) (resíduos 111-154), seguida da hélice S (de sinalizadora, que será discutida posteriormente, resíduos 158-176).

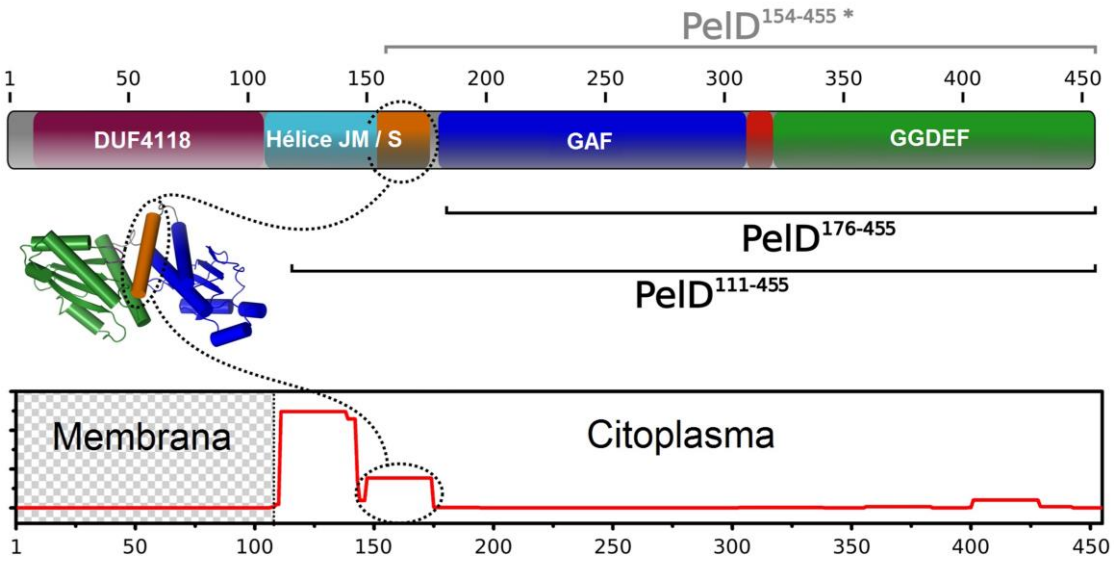

Figura 11- Organização de domínios de PelD e predição de *coiled-coil* realizada através do programa MARCOIL. Na figura, observa-se as duas construções de PelD utilizadas nesse trabalho, $PelD^{111-455}$ e $PelD^{176-455}$. $PelD^{111-455}$ contém toda a porção da hélice S e JM e $PelD^{176-455}$ contém uma porção da hélice S (indicada na estrutura, PDB: 4EUV) com pequena probabilidade de formação de *coiled-coil*.

Fonte: Adaptada de SILVA [56]

Em 2012, dois grupos independentes resolveram a estrutura cristalográfica de construções solúveis de PelD (resíduos de 156/158-455).[49-50] Nesses trabalhos, foi visto que as estruturas da porção citoplasmática de PelD estavam ligadas a uma e a duas moléculas de c-di-GMP, concordando com dados de calorimetria de titulação isotérmica (ITC).[49-50] Embora os domínios citoplasmáticos de PelD possuam estrutura cristalográfica resolvida e tenham sido caracterizados bioquimicamente, os trabalhos de *Whitney* e colaboradores bem como *Li* e colaboradores não chegaram a um modelo de ativação de PelD mediado por c-di-GMP. Buscando entender esse mecanismo de ativação, nosso grupo percebeu através de sobreposições estruturais que a ligação sequencial de uma e duas moléculas de c-di-GMP

promove uma abertura relativa dos domínios GAF e GGDEF, diminuindo as interações dos domínios GAF e GGDEF com a hélice S entre os domínios (figura 12).[56] Essa observação levantou a hipótese que a ligação de c-di-GMP poderia deslocar a hélice S, levando a um rearranjo dos domínios GAF e GGDEF. Isso foi confirmado pela resolução estrutural de uma construção de PelD sem a hélice S (PelD$^{176-455}$, figura 13) por nosso grupo.[56]

Figura 12 - Mudança conformacional do domínio GGDEF de PelD dependente da ligação de c-di-GMP. Alinhamento dos domínios GAF de PelD sem c-di-GMP (cinza claro, PDB: 4ETX), com uma molécula de c-di-GMP (cinza escuro, PDB: 4ETZ) e ligada a um dímero do nucleotídeo (preto, PDB: 4DNO). A hélice S e o dímero de c-di-GMP estão representados em amarelo.
Fonte: Elaborada pela autora.

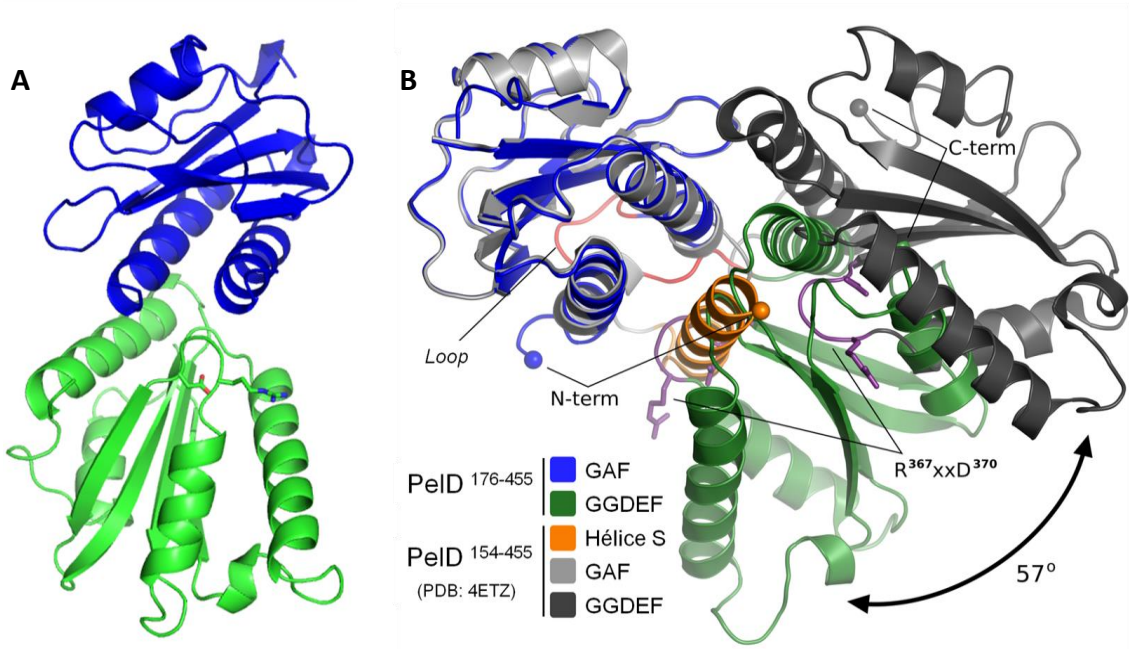

Figura 13 - (A) Estrutura cristalográfica de PelD$^{176-455}$ obtida por nosso grupo[56] com domínios GAF e GGDEF mostrados em azul e verde, respectivamente. Resíduos de arginina e ácido aspártico do motivo RxxD estão mostrados em bastão. (B) Alinhamento dos domínios GAF da estrutura cristalográfica resolvida por nosso grupo e 4ETZ, destacando o rearranjo conformacional gerado pela ausência da hélice S e o motivo RxxD em roxo.
Fonte: Elaborada pela autora.

GAF é um domínio de ligação de nucleotídeos, como cGMP e cAMP, que usualmente assume forma homodimérica. Em PelD, o domínio GAF não é capaz de se ligar a esses nucleotídeos (afinidade de ligação muito menor do que já reportado para outros domínios GAFs) e não forma dímeros, uma vez que sua interface de dimerização encontra-se voltada para o domínio GGDEF.[50-51] Dessa forma, construções citoplasmáticas contendo o domínio GAF e GGDEF de PelD apresentam-se monoméricas em solução. Por outro lado, construções de PelD contendo a hélice JM apresentam-se diméricas, possivelmente pela formação de um *coiled-coil* previamente predito nessa região.[50,56] Apesar de menos comum, esse tipo de oligomerização foi observado em algumas proteínas, como em uma proteína de função desconhecida de *P. aeruginosa* (PA5279) e na fosfodiesterase 2A de humanos. Além da hélice JM, estudos de bioinformática realizados por nosso grupo indicaram que a hélice S possui uma pequena probabilidade de formação de *coiled-coil*, podendo também participar da formação de dímeros.

Visando analisar a dependência das hélices JM e sinalizadora na ligação de PelD com c-di-GMP, nosso grupo realizou experimentos de dicroísmo circular de $PelD^{111-455}$ e $PelD^{176-455}$ na presença do nucleotídeo. Foi verificado que o sinal de c-di-GMP dimérico diminuía na presença das duas construções de PelD, mostrando que ambas as construções eram capazes de se ligar ao c-di-GMP. Porém, quando os dímeros de c-di-GMP em solução eram induzidos pela presença de Mn^{2+}, apenas $PelD^{111-455}$ era capaz de se ligar ao nucleotídeo, quebrando os dímeros de c-di-GMP a monômeros (dados não publicados).

A possibilidade de formação de *coiled-coil* da hélice S, as análises de ITC e os dados de dicroísmo circular levaram o grupo a especular um mecanismo de ativação de PelD em que a hélice S de PelD atua de maneira análoga à hélice S de LapD de *Pseudomonas fluorescens* (figura 14)[57]. Nesse mecanismo, a ligação de c-di-GMP no domínio EAL degenerado de LapD provoca mudanças conformacionais em seu *switch loop*, gerando o afastamento da hélice S do domínio EAL[57]. Esse afastamento é então transmitido ao domínio transmembrânico e periplasmático através da hélice JM *coiled-coil* e, apenas nessa conformação ligada ao c-di-GMP, o domínio periplasmático é capaz de se ligar à enzima LapG.[57]

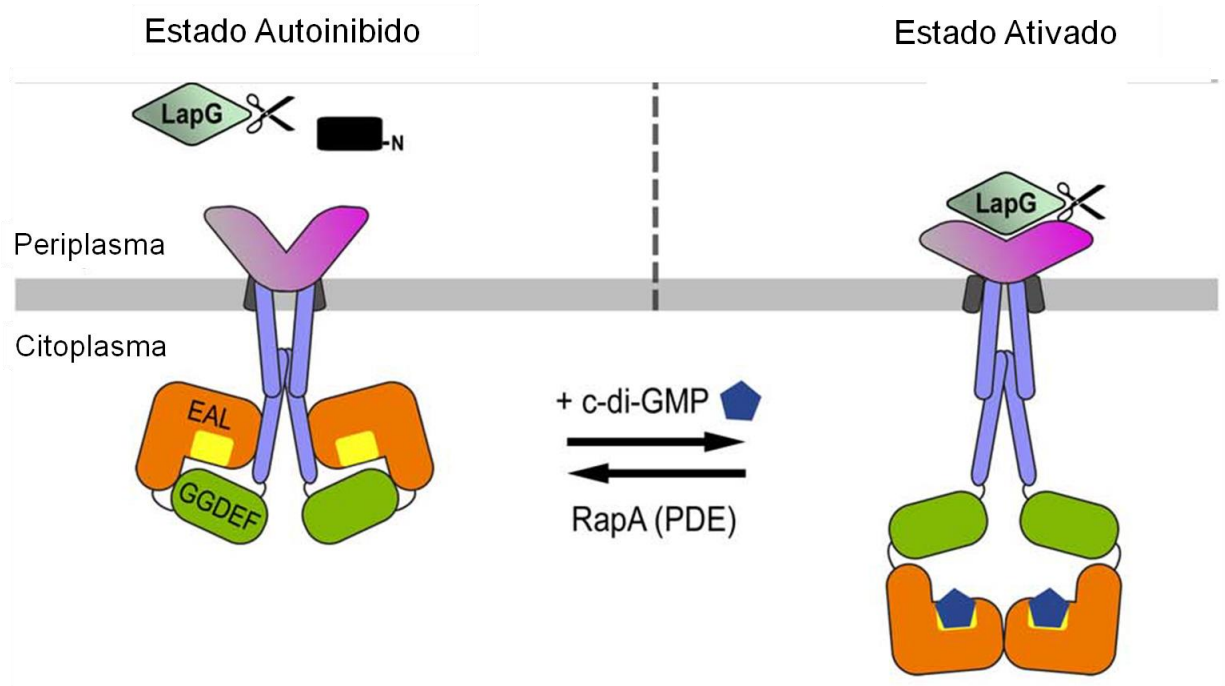

Figura 14 - Mecanismo de ativação de LapD de *P. fluorescens.* A ligação do c-di-GMP ao domínio EAL desestabiliza a hélice S (azul) provocando seu rearranjo estrutural que é translocado ao domínio periplasmático. Essa mudança provoca o recrutamento da protease periplasmática LapG.
Fonte: Adaptada de NAVARRO [56]

No mecanismo proposto para ativação de PelD (figura 15), acredita-se que a hélice S desempenhe um papel semelhante à hélice S de LapD na transdução de sinal até seu domínio de membrana. Nesse modelo, a ausência de c-di-GMP caracteriza o estado autoinibido de PelD, em que a proteína encontra-se dimérica pelo *coiled-coil* de sua hélice JM.[56] A ligação de uma molécula de c-di-GMP a cada domínio GGDEF do dímero provoca o afastamento da hélice S, gerando uma nova interface dimérica.[56] O *coiled-coil* da hélice JM é quebrado, criando uma cavidade livre para o transporte do polissacarídeo que é posteriormente translocado pelo domínio de membrana.[56] A ativação do domínio de membrana parece ser essencial para a biossíntese de PEL, uma vez que a expressão do domínio citoplasmático de PelD em cepas deletadas de *pelD* (PA14Δ*pelD*) não é capaz de promover a produção da matriz exopolissacarídica.[50] Além disso, as mudanças conformacionais do domínio citoplasmático de PelD provavelmente favorecem a interação de PelD com PelF, já que a proximidade do domínio GT à membrana é necessária para que, após a síntese, o polímero seja exportado para o meio extracelular.[56]

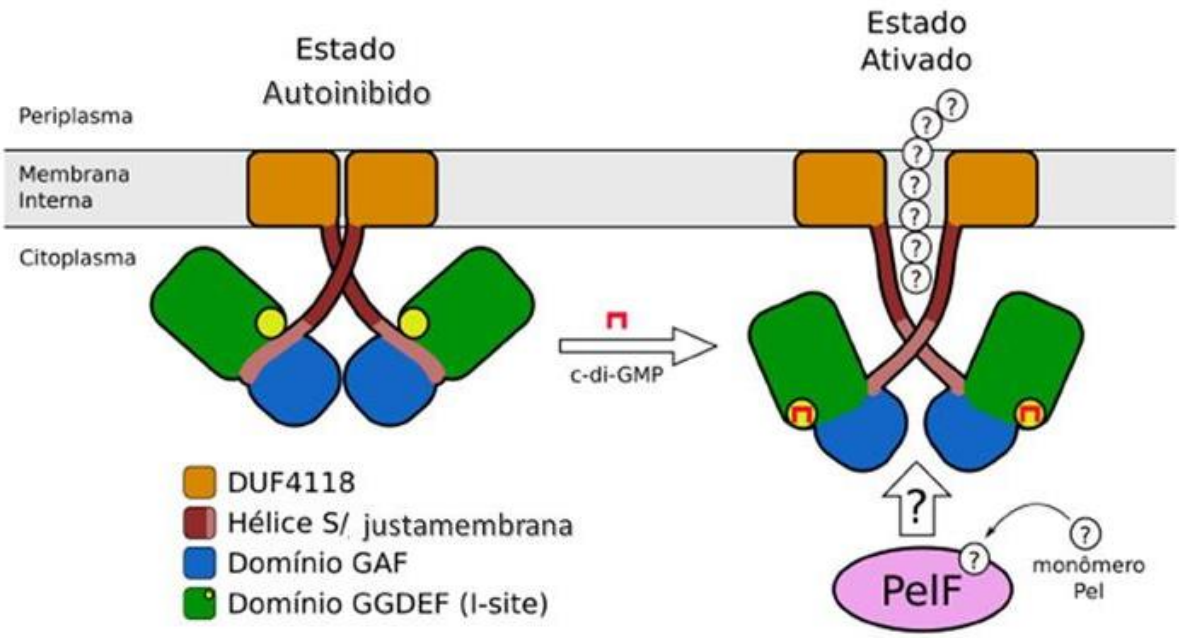

Figura 15 - Mecanismo de ativação de PelD proposto por nosso grupo em 2012, mostrando que a ligação de c-di-GMP promove a ligação de PelF e translocação do polissacarídeo nascente por PelD.
Fonte: Adaptada de SILVA [56]

O modelo atual de ativação de PelD apresenta-se condizente com os dados experimentais e comparações com outras vias de produção de EPS. Porém, grande parte do mecanismo de ativação permanece obscuro e ainda não foi comprovado.

Por exemplo, foi visto que PelD interage com formas monoméricas e dímericas de c-di-GMP, mas o papel da interação de PelD com as diferentes formas do nucleotídeo nunca foi descrito. Pode-se citar também a suposta formação do *coiled-coil* de PelD através da hélice S em seu estado ativado. Embora exista uma pequena probabilidade de formação de *coiled-coil* nessa região, essa hipótese foi baseada unicamente em predições computacionais e em comparações com outros mecanismos de transdução de sinal envolvendo hélices JM e domínios de membrana. Além disso, a estrutura cristalográfica obtida por nosso grupo mostrou que, na ausência da hélice S, os domínios GAF e GGDEF se rearranjam formando um *core* hidrofóbico na região anteriormente ocupada pela hélice S. Contudo, a importância desse rearranjo no mecanismo de ativação de PelD nunca foi descrito.

A hipótese de que PelD transloca o polímero nascente vem da similaridade entre os domínios de membrana de PelD e Alg8, deixando de lado o possível recrutamento de PelG, uma proteína que é predita de possuir domínios de translocação de polissacarídeos. A possível participação de PelG na formação do complexo de síntese e transporte de PEL pela membrana interna também não foi especulada. A interação entre PelD, PelF e PelG pode ocorrer, pois, diferentemente de GTs de outras vias biossintéticas de matrizes extracelulares, PelF não

possui nenhuma parte transmembrânica capaz de transportar o polissacarídeo sintetizado ao periplasma. Assim, é necessário que PelF esteja próxima à proteína transportadora, PelG, e da proteína ativadora de todo o complexo, PelD. Por fim, o modelo de ativação mediado por c-di-GMP demonstra como PelD é provavelmente ativada, mas não demonstra como PelD retorna a seu estado autoinibido, um mecanismo essencial na via de regulação da formação de EPSs.

2 Objetivos

Visando desvendar os mecanismos moleculares que regem a ativação do complexo de biossíntese de PEL, o presente trabalho se propôs a realizar análises biofísicas, bioquímicas e microbiológicas a fim de esclarecer a ativação e desativação de PelD mediada por c-di-GMP, assim como investigar a formação do possível complexo de membrana interna. Para isso, primeiramente foi realizada a produção de amostras proteicas por meio de processos de clonagem das CDSs de PelA, PelB, PelC, PelE, PelF, PelG e alguns dos domínios isolados dessas proteínas. Além disso, foi feita a clonagem de toda porção gênica *pelA-G* e *pelD-G*, visando a co-purificação do complexo proteico Pel. A expressão heteróloga de todos os clones foi testada e as proteínas expressas tiveram seus processos de purificação otimizados para futuras caracterizações biofísicas e ensaios cristalográficos.

Posteriormente, a interação entre PelF, PelG e porções citoplasmáticas de PelD, foram analisadas por reações de *crosslinking*, cromatografia de exclusão molecular (do inglês, SEC) e *pull-down*. A possível interação de outras proteínas com o complexo de membrana interna também foi estudada por *pull-down* e análise de formação de biofilme da biblioteca de mutantes de *P. aeruginosa* PA14.[58-59]

Finalmente, buscando avaliar a importância da hélice S e da ligação de c-di-GMP a porções citoplasmáticas de PelD, foram realizados ensaios funcionais *in vivo* de cepas de *P. aeruginosa* PA14 com mutações sítio dirigidas na CDS de PelD. Tais mutantes tiveram sua capacidade de formação de biofilme avaliadas visando identificar regiões proteicas importantes para a ativação de PelD.

3 Metodologia

3.1 Obtenção de amostras proteicas

Nesta seção será detalhado o processo de produção de amostras proteicas, englobando a clonagem das CDSs em vetor de expressão, expressão heteróloga e purificação de proteínas. As amostras obtidas foram utilizadas em caracterizações biofísicas, ensaios cristalográficos e estudos de interação descritos posteriormente.

3.1.1 Clonagem

Buscando uma melhor caracterização estrutural das proteínas Pel, decidiu-se estudar as proteínas inteiras, assim como seus domínios proteicos. Para isso, primeiramente, os programas Pfam,[60] Psipred,[61-62] SignalP[63] e THMM[64] foram utilizados com objetivo de delimitar regiões de domínios proteicos. Após essa etapa, foram desenhados oligonucleotídeos para a amplificação de cada construção contendo um sítio de clivagem de exonucleases específicas em seu início (tabela 2). As sequências *pelD-G* e *pelA-G* tiveram a sequência inicial de seus oligonucleotídeos prolongada com 15 pb da sequência complementar do vetor de expressão pBADm11-Strep para uma clonagem utilizando o método *In-Fusion* (Clontech).[65] Os oligonucleotídeos foram sintetizados pelas empresas Exxtend, IDT e Eurofins.

Os clones das construções solúveis de PelD foram previamente clonados pela aluna Sumária Silva durante seu trabalho de mestrado em nosso grupo.[56] Os clones das construções de membrana, bem como todo o processo de produção e caracterização de tais amostras foram realizados no Laboratório de Biologia Estrutural de Secreção Bacteriana (Instituto Pasteur - França), sob a supervisão de Rémi Fronzes e Petya Krasteva. A clonagem das CDSs de construções de membrana se deu a partir da amplificação das respectivas CDSs do gDNA de *P. aeruginosa* PAO1, enquanto que as CDSs correspondentes a construções citoplasmáticas e periplasmáticas foram amplificadas a partir do gDNA de *P. aeruginosa* PA14. A amplificação gênica foi realizada utilizando a enzima *High Fidelity* (Thermo Scientific) na presença de dimetilsufóxido (DMSO) e seguindo as instruções do fabricante.

Tabela 2 - Sequências de DNA clonadas nesse trabalho e seus respectivos *primers* de amplificação. Sequências em azul, verde e amarelo representam porções periplasmáticas, citoplasmáticas e de membrana, respectivamente.

	Construção	Característica	Vetor	*Primers*
Periplasma	PelA $^{47-948}$	Inteira	pET-SUMO	CATGGAATTCGGCGGGCCGTCCAGCGTG CATGCTCGAGTCAGCGGCAGACGAGTTGGCC
	PelB $^{35-1193}$	Domínio TPR	pET-SUMO	CATGGAATTCACCTTCAACAGCGAAGAAGTATTCATGCC CATGAAGCTTTCAGCGGCCGAAGCGCGT
	PelC $^{27-172}$	Porção periplasmatica	pET-SUMO	CATGGGATCCGCTACGCCGCTGGCGCGC CATGAAGCTTTCACTCGAGCCGCAGGTCGC
	PelE $^{88-329}$	Domínio TPR	pET-SUMO	CATGGGATCCTTCCCGGCGCTGTACCTG CATGAAGCTTTCATGTCCAGTATCTCGCCAG
Citoplasma	PelF	Inteira	pET-SUMO	GAATTCATGACCGAACACACCGCTC CTCGAGATCATGCAATCTCCGTGGCT
	PelF $^{1-289}$	Domínio DUF2492	pET-SUMO	GAATTCATGACCGAACACACCGCTC CTCGAGATCACTCGGCGCCATCGAGTA
	PelF $^{1-291}$	Domínio DUF2492	pET-SUMO	GAATTCATGACCGAACACACCGCTC CTCGAGATCACCGTGGCTCGGCGCCAT
	PelF $^{13-289}$	Domínio DUF2492	pET-SUMO	GAATTCGATGTCTGCCTGCTGCTG CTCGAGATCACTCGGCGCCATCGAGTA
	PelF $^{310-507}$	Domínio GT	pET-SUMO	GAATTCCGGCGGCCGCCGGGGAT CTCGAGATCATGCAATCTCCGTGGCT
	PelF $^{313-507}$	Domínio GT	pET-SUMO	GAATTCCCGGGGATTCCGCCG CTCGAGATCATGCAATCTCCGTGGCT
Membrana	PelB	Inteira	pET-21a	GGATCCCATATGGCCAACTCGTCTGCCGCTGAC CTCGAGAAGCTTTCAGCGGCCGAAGCGCGTGCT
	PelD	Inteira	pET-21a	GGATCCCATATGTCCGCGCACAAGGATTTCACC CTCGAGGCGGCCGCAACAGCCACTTGCTGATCATTC
	PelG	Inteira	pET-SUMO e pET-21a	CATATGGGATCCATGGCCGGCATCGGCTTCGAAC CTCGAGGCGGCCGCCTATCAGCGATTGAGCATGAAGGT e CATATGGAATTCATGGCCGGCATCGGCTTCGAAC CTCGAGAAGCTTTCAGCGATTGAGCATGAAGGT
	PelBC	Inteiras	pET-21a	GGATCCCATATGGCCAACTCGTCTGCCGCTGAC CTCGAGAAGCTTCTCGAGCCGCAGGTCGCCGAC
	PelD-G	Inteiras	pBADm11-Strep	ACAGGAGGAATTAACCATGTCCGCGCACAAGGATTTC CTGCGGGTGGCTCCAGCGATTGAGCATGAAG
	PelA-G	Inteiras	pBADm11-Strep	ACAGGAGGAATTAACCATGCGGTTCAGCAAGAAAG CTGCGGGTGGCTCCAGCGATTGAGCATGAAG

Fonte: Elaborada pela autora.

Todos os DNAs amplificados foram analisados através de gel de agarose 0,8% e purificados com o kit *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega). Posteriormente, os DNAs amplificados e os vetores de expressão foram digeridos com exonucleases apropriadas. Uma nova etapa de purificação foi realizada e os insertos foram ligados ao vetor de expressão com o auxilio da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen). As sequências amplificadas e purificadas de *pelD-G* e *pelA-G* foram utilizadas diretamente para a ligação no vetor pBAD-m11-Strep utilizando o kit *In-Fusion*.

Os clones foram então inseridos na cepa de propagação *E. coli* DH5α (ou Top10, para as construções de membrana) por meio de choque térmico e após o período de recuperação celular em meio *Luria-Bertani* (LB) as bactérias foram plaqueadas em meio LB sólido contendo 50 µg/ml canamicina (para clones em pET-SUMO) e 100 µg/ml ampicilina (para clones em pET-21a e pBADm11-Strep). Após o crescimento das bactérias, colônias isoladas foram pré-inoculadas para a posterior extração de DNA plasmidial (kit SV Miniprep, Promega).

Aproximadamente 200 ng de DNA plasmidial foram digeridos com as respectivas exonucleases para a confirmação de ligação do inserto ao vetor de expressão. Em caso afirmativo, os clones eram sequenciados utilizando o método de Sanger no sequenciador 3130 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). Por fim, os resultados do sequenciamento foram analisados com o auxílio do programa BioEdit.

Mutantes de PelF com elevada energia superficial entrópica foram preditos pelo programa SERp,[66] que retornou três regiões com alta entropia: E357/E358/E359, K219/E220/K222 e E114/E115. Os oligonucleotídeos foram desenhados para cada uma das três regiões a fim de mutar os resíduos citados por resíduos de alanina. As mutações foram feitas com a amplificação de todo o vetor pET-SUMO-*pelF* utilizando a enzima *Phusion* (New England Biolabs) segundo as instruções do fabricante. Os DNAs amplificados foram tratados com a enzima DpnI (Thermo Scientific) visando clivar qualquer DNA molde metilado proveniente de *E. coli* DH5α (DNA sem mutação) e foram então transformados na mesma bactéria de propagação. Colônias únicas foram isoladas, tiveram seus plasmídeos extraídos e as mutações foram confirmadas por sequenciamento.

3.1.2 Testes de expressão e indução

As expressões heterólogas das proteínas Pel foram realizadas em *E. coli* BL21 (DE3) e em Top10, para os clones em pBADm11-Strep. Culturas com densidade óptica ($DO_{600\ nm}$)

entre 0,6-0,8 foram induzidas com concentrações crescentes dos agentes indutores isopropil-β-D-galactopiranosídeo (IPTG), para clones em vetores pET, e arabinose, para clones em pBADm11-Strep. A expressão heteróloga se deu por 3 h a 37 °C e, posteriormente, as culturas foram fervidas e analisadas em eletroforese em gel SDS-PAGE, podendo ser posteriormente analisadas por *Western blot*.

Para o *western blot*, as amostras de construções de membrana celular foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose (BioRad) utilizando o equipamento *Trans-Blot Turbo* (BioRad) de acordo com as instruções do fabricante. A membrana foi então bloqueada em 5% leite dissolvido em tampão fosfato salino (PBS) contendo 0,1% Tween. Anticorpos *Anti-polyHistidine Clone HIS-1* (Clontech) e *StrepMAB-Classic* (IBA) foram adicionados à solução para interação específica com poli-histidina e estreptavidina, respectivamente. Após 16 horas de incubação a 4 °C, as membranas foram lavadas no mesmo tampão e anticorpos *anti-mouse* conjugados com HPR (Sigma) foram adicionados por 45 minutos a temperatura ambiente. As membranas foram lavadas novamente e a revelação foi feita utilizando o reagente ECL (GE Healthcare).

O mesmo teste de indução foi realizado em células *E. coli* Rosetta (DE3) para os clones pET-21-*pelB*, pET-21-*pelD*, e em meio *Terrific-Broth* (TB) para os clones pBADm11-Strep-*pelD-G* e pBADm11-Strep-*pelA-G*.

3.1.3 Expressão heteróloga e purificação de construções solúveis

A expressão heteróloga de PelA$^{47-948}$, PelB$^{35-1193}$, PelC$^{27-172}$, PelE$^{88-329}$, PelF, PelF $^{1-289}$, PelF $^{13-289}$, PelF $^{1-291}$ e mutantes com energia entrópica reduzida de PelF, foi realizada em meio LB. Ao atingir a DO_{600nm} de aproximadamente 0,6, as células contendo os plasmídeos de expressão de construções citoplasmáticas e periplasmáticas foram induzidas com 0,1 mM IPTG.

Após a expressão, as células foram separadas por centrifugação e ressuspendidas em 20 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl (PelC foi ressuspendida em 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl) na presença de 5 mM imidazol, lisozima (Sigma) e coquetel de inibidor de protease (Roche). A lise celular foi realizada por sonicação e os debris celulares foram separados por centrifugação.

A fração solúvel era então filtrada e aplicada em resina TALON (Clontech) previamente equilibrada com os respectivos tampões. As proteínas foram lavadas com 10

volumes de coluna (VC) em seus respectivos tampões contendo 10 mM imidazol e foram eluídas na presença de 50, 150 e 300 mM imidazol com 5 VC. Após a análise de todas as frações em gel SDS-PAGE, as frações contendo as proteínas eluídas eram incubadas em presença de ULP1 a 4 °C por aproximadamente 16 horas para a clivagem da cauda 6xHis-SUMO.

Após a clivagem, as reações foram concentradas em membranas com poros apropriados (Milipore) e dialisadas para retirada do imidazol. Uma vez que a enzima ULP1 também possui uma cauda 6xHis, uma nova cromatografia de afinidade por metal imobilizado (do inglês, IMAC) foi feita para a retirada da protease e de 6xHis-SUMO. Por fim, as construções foram concentradas e purificadas por SEC em coluna Superdex75 10/300GL (GE Healthcare). Os picos de absorção em 280 nm foram separados e analisados por SDS-PAGE.

A expressão e purificação das frações solúveis de PelD foram realizadas como descrito por *Silva*.[56]

3.1.4 Otimização da purificação de PelG

Culturas de *E. coli* BL21 (DE3) foram crescidas em meio TB até a DO_{600nm} atingir aproximadamente 1 unidade de absorbância. A expressão proteica foi induzida com 0,8 mM IPTG a 16 °C por 16 horas. As etapas de coleta de células, lise celular e separação de debris celulares foram feitas como descrito para as construções solúveis.

Uma vez que PelG é uma proteína integral de membrana, a membrana celular bacteriana foi separada por meio de centrifugação do lisado (100.000 g durante uma hora) e a membrana foi então solubilizada em 20 mM Tris-HCl pH 8,6, 300 mM NaCl, 50 µM DTT.

Para um teste de solubilidade, dez alíquotas da porção de membrana foram deixadas na presença dos detergentes mostrados na tabela 3. Após uma hora de agitação a 4 °C, as porções insolúveis e solúveis foram separadas por uma nova centrifugação e analisadas por SDS-PAGE seguido de *Western blot*.

Para o teste de atividade de ULP1 na presença de detergentes, a solubilização da membrana foi feita em 20 mM Tris-HCl pH 8,6, 300 mM NaCl, 50 µM DTT, 1% DDM e oito alíquotas iguais foram separadas. Cada alíquota foi aplicada em uma coluna contendo resina TALON previamente equilibrada com tampão de extração. Cada coluna foi lavada com 15 VC de 20 mM Tris-HCl pH 8,6, 300 mM NaCl contendo os detergentes indicados na tabela 3 em concentrações duas vezes maiores que suas respectivas Concentrações Micelares Críticas

(CMCs). PelG foi eluída em 5 VC dos mesmos tampões suplementados de 120 mM imidazol e foi incubada na presença de ULP1 a 4 °C por 6 horas. Por fim, as alíquotas foram analisadas por SDS-PAGE.

Tabela 3 - Detergentes utilizados na otimização de extração e purificação de PelG.

Nome	Abreviatura	Concentração de extração (%)	CMC (%)	Fornecedor
n-Dodecyl-β-D-maltopyranoside	β-DDM	1	0,009	Anatrace
Cymal 6	Cymal-6	2	0,030	Anatrace
N,N-Dimethyldodecylamine N-oxide	LDAO	1	0,020	Anatrace
n-Decyl-N,N-Dimethylamine-N-Oxide	DDAO	2	0,200	Anatrace
n-Octyl-β-D-glucopyranoside	OG	2	0,500	Anatrace
Fos-choline 12	Fos-choline 12	1	0,047	Anatrace
3[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio] propanesulfonic acid	CHAPS	1	0,500	Sigma
n-Decyl-β-D-maltopyranoside	DM	1	0,090	Anatrace
2,2-dioctylpropane-1,3-bis-β-D-maltopyranoside	DM-NPG	2	0,003	Anatrace

Fonte: Elaborada pela autora.

3.1.5 Expressão heteróloga e purificação de PelG

PelG foi expressa heterologamente em células *E. coli* BL21 (DE3) cultivadas em meio TB na presença de 0,8 mM IPTG. Após a lise celular e a separação da membrana lipídica descritas no item anterior, a membrana foi dissolvida em 20 mM Tris-HCl pH 8,6, 300 mM NaCl, 50 µM DTT, 1% DDM, centrifugada para retirar frações insolúveis e aplicada em uma coluna contendo resina TALON. A resina foi lavada com 15 VC de 20 mM Tris-HCl pH 8,6, 300 mM NaCl, 50 µM DTT, 0,006% DM-NPG contendo 15 mM imidazol e a proteína foi eluída com 5 VC do mesmo tampão contendo 160 mM imidazol.

A fração eluída foi concentrada, dialisada e incubada na presença de ULP1 durante 16h a 4 °C. Para a retirada da protease e 6xHis-SUMO, uma segunda IMAC foi realizada: a amostra era adicionada à coluna, sendo isolada durante a lavagem com tampão sem imidazol, enquanto que ULP1 e 6xHis-SUMO eram eluídas na presença de 200 mM imidazol.

Alíquotas concentradas de PelG foram submetidas a uma SEC utilizando a coluna Superdex200 10/300GL (GE Healthcare) e diversos tampões e detergentes diferentes.

3.1.6 Otimização de tampões

A otimização de PelC$^{27-172}$ e PelF foi feita baseada nos valores de polidispersividade medidos em experimentos de espalhamento dinâmico de luz (do inglês, DLS). Proteínas purificadas foram concentradas a aproximadamente 20 mg/ml e diluídas a 2 mg/ml em cada uma das condições do kit de solubilidade JBS. Após duas horas a temperatura ambiente, os precipitados eram retirados por centrifugação e a fração solúvel era medida a 20 °C em *Zetasizer* µV (Malvern). Condições em que as proteínas apresentavam menores estados oligoméricos agregativos e menor polidispersividade eram selecionadas para posteriores SECs seguidas de ensaios cristalográficos.

Além do DLS, uma nova otimização de tampões de PelF foi realizada utilizando a técnica *Thermofluor*.[67] As medidas de fluorescência em diferentes agentes tamponantes do kit de solubilidade foram realizadas com o auxílio do fluoróforo *SYPRO Orange* (Life Technologies) que fluoresce ao se ligar às regiões hidrofóbicas de proteínas desnaturadas. As soluções contendo 0,4 mg/ml de PelF foram aquecidas de 20 °C a 95 °C com incrementos de 1 °C a cada 30 s, e a cada incremento de temperatura as amostram eram excitadas a 490 nm e tinham sua fluorescência medida a 575 nm. A partir das medidas de fluorescência, foi possível traçar curvas de desnaturação referentes a cada um dos tampões teste e escolher o melhor tampão de acordo com a maior temperatura de desenovelamento de PelF. A fim de testar aditivos que poderiam ajudar na estabilização da proteína, reagentes do kit *Additive Screen* foram utilizados em PelF previamente diluída no melhor tampão escolhido. As medidas foram realizadas como descrito acima.

A otimização de PelG foi feita primeiramente em relação ao agente tamponante e ao meio de cultura utilizado no cultivo de células. Dessa forma, as células foram cultivadas em meio LB e TB e o processo de purificação da proteína de cada meio foi realizado nos agentes tamponantes Tris-HCl pH 8,6 e CHES pH 9,5. Após todo o processo de purificação, os cromatogramas das quatro condições foram comparados para a escolha da melhor condição de expressão e de tamponamento. Depois disso, PelG foi expressa e purificada como descrito em 3.1.5, sendo a última SEC realizada em 20 mM Tris-HCl pH 8,6, 300 mM NaCl na presença de:

- 0,006% DM-NPG;
- 0,006% DM-NPG e 100 µM DTT;

- 0,014% DDM;
- 0,03% LDAO;
- 4 mM LDAO e 0,5% éter mono-octil tetraetileno glicol (C_8E_4) (Anagrade);
- 1,4% sacarose monododecanoato (Anatrace).

Os cromatogramas foram comparados e as melhores condições foram escolhidas para ensaios cristalográficos.

3.2 Ensaios cristalográficos

Amostras purificadas de PelC$^{27-172}$, PelF, PelF, PelF K219A/E220A/K222A, PelF E114A/E115A e PelG foram submetidas a vários ensaios de cristalização que englobavam diversos kits e condições de cristalização. Todas as triagens foram feitas utilizando a técnica de gota sentada.

PelC$^{27-172}$ e PelF foram utilizadas em triagens com os kits *Index*, *PEGRx I* e *II*, *MembFac* e *SaltRx I* e *II* (Hampton Research). Triagens de PelC$^{27-172}$, foram realizadas em 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl e 20 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl, com concentrações proteicas variando de 1 a 7,5 mg/ml. Já os ensaios de PelF e seus mutantes foram realizados com proteínas de 1 a 30 mg/ml em 20 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl e 20 mM HEPES pH 8, 300 mM NaCl, sendo algumas das triagens realizadas na presença de 50 mM arginina e 50 mM ácido glutâmico.

Triagens de PelG foram feitas utilizando os kits *MemGold I* e *II* (Molecular Dimensions), *MemStart&MemSys* (Molecular Dimensions), *JB Screen Classic 1-5* (Jena Bioscience) e *JB Screen Membrane 1-3* (Jena Bioscience). Os ensaios foram realizados com PelG variando de 0,5 a 3 mg/ml em tampão 20 mM Tris-HCl pH 8,6, 300 ou 500 mM NaCl, 100 µM DTT na presença de 0,006% DM-NPG, 0,03% LDAO, 4 mM LDAO e 0,5% C_8E_4 e 1,4% sacarose monododecanoato. Condições que apresentaram formação de microcristais foram otimizadas com variação de pH, concentração de agente precipitante e por uma nova triagem utilizando o kit *Additive Screen* (Hampton Research) utilizando a técnica de gota pendurada.

3.3 Estudos oligoméricos

3.3.1 Cromatografia de exclusão molecular

A primeira investigação de oligomerização das proteínas Pel foi feita por SEC, uma vez que o volume de eluição de uma dada amostra se correlaciona com sua massa molecular. Essa correlação pode ser obtida com uma curva de calibração da coluna utilizada, relacionando a massa de proteínas globulares já conhecidas com seus respectivos volumes de eluição. Assim, foi feita a curva de calibração da coluna Superdex75 10/300 GL utilizando proteínas padrões e as instruções do kit de calibração de baixo peso molecular (GE Healthcare). Os volumes de eluição de cada proteína foram encontrados utilizando a ferramenta de integração do software *AKTA pure* (GE Healthcare). Utilizando as mesmas condições cromatográficas das proteínas padrão, fez-se a SEC de PelA$^{47-948}$, PelB$^{35-1193}$, PelC$^{27-172}$, PelE$^{88-329}$ e PelF e, a partir de seus volumes de eluição, suas massas moleculares puderam ser estimadas.

3.3.2 *Crossliking*

A oligomerização de PelA$^{47-948}$, PelB$^{35-1193}$, PelC$^{27-172}$, PelD$^{111-455}$, PelD$^{176-455}$, PelE$^{88-329}$, PelF e PelG foram estudadas por *crosslinking*. Todas as proteínas foram primeiramente dialisadas em tampão HEPES para o agente de *crosslinking* não interagir com aminas primárias do tampão Tris, no qual as proteínas foram purificadas. Cada proteína a uma concentração de 5 µM foi incubada por 30 minutos a 4 °C com 0,5 mM de etileno glicol bis-sulfosuccinimidil succinato (EGS, Sigma Aldrich), com exceção de PelG, que foi incubada com 3 mM bis-sulfosuccinimidil suberato (BS^3, Thermo Scientific). As reações foram interrompidas com a adição de 50 mM Tris-HCl pH 8 e analisadas por meio de eletroforese SDS-PAGE. As mesmas condições de *crosslinking* foram utilizadas para avaliar a dependência dos estados oligoméricos de PelD$^{111-455}$, PelD$^{176-455}$ e PelF na presença de c-di-GMP, com concentrações do nucleotídeo variando de 0 a 0,1 mM.

3.3.3 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo

O estado oligomérico de PelF também foi avaliado por espalhamento de raios-X a baixo ângulo (do inglês, SAXS) utilizando 1 e 2,5 mg/ml de proteína em 20 mM HEPES pH 7,5, 300 mM NaCl. Os espalhamentos foram realizados na linha D02A-SAXS2 do Laboratório Nacional de Luz Síncroton (LNLS) utilizando um comprimento de onda de 1,488 Å e uma distância de 1200 mm entre o detector e a amostra. O vetor de espalhamento q foi definido por $q = 4\pi \text{sen}\theta/\lambda$, sendo 2θ o ângulo espalhado, e as curvas espalhadas foram coletadas com amostras a 20 °C em um porta amostra de caminho óptico de 1 mm, sendo a cela formada por duas janelas de mica. O espalhamento foi realizado em pulsos de 300 s e os dados foram normalizados pela intensidade incidente do feixe. Com a finalidade de obter curvas em escala absoluta para o cálculo de massa molecular, foram realizadas medidas de água nas mesmas condições, obtendo-se espalhamento médio da água que, junto de sua constante de choque a 20 °C, possibilitou a correção dos dados para escala absoluta. O espalhamento do tampão foi subtraído do espalhamento da proteína e os padrões de integração foram feitos utilizando o *software* FIT2D. As curvas foram escalonadas de acordo com a concentração proteica e as funções de distribuição de distância, $P(r)$, e diâmetro máximo, D_{max}, foram avaliados pelo pacote Gnom[68]. Os raios de giro (R_g) foram determinados independentemente pelo método de transformada de Fourier inversa utilizando o Gnom e pela equação de Guinier[69]. Utilizando o valor de $I(0)$, bem como a comparação de outras curvas de SAXS de proteínas padrão (lisozima e BSA),[70-71] foi possível determinar a massa molecular de PelF em solução.

3.4 Estudos de interação

3.4.1 Cromatografia de exclusão molecular de PelF e porções citoplasmáticas de PelD

Os ensaios de interação entre PelF e construções solúveis de PelD foram feitos por SEC na coluna analítica Superdex75 10/300 GL. Aproximadamente 4,5 nmols de PelF e cada construção de PelD eram incubados em banho de gelo por três horas na presença e ausência de c-di-GMP. Após o período de incubação para a interação das proteínas, as amostras eram

centrifugadas para a retirada de qualquer precipitado. Além dos testes de interação, as proteínas isoladas (com e sem c-di-GMP) também passaram pelo mesmo processo para a comparação dos cromatogramas. As amostras foram então aplicadas na coluna de exclusão molecular e os cromatogramas foram comparados por sobreposição. Todos os ensaios cromatográficos foram feitos em 20 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl.

3.4.2 *Crosslinking*

Estudos de interação por *crosslinking* entre PelF, construções solúveis de PelD e PelG foram conduzidos em 20 mM HEPES pH 8, NaCl 500 mM, entre as construções solúveis, e em 20 mM HEPES pH 8,6, NaCl 500 mM, 50 µM DTT, 0,006% DM-NPG para reações contendo PelG, como descrito no item de estudos oligoméricos.

3.4.3 Quantificação de biofilme dos mutantes da biblioteca de transposons de *P. aeruginosa* PA14

Visando encontrar possíveis parceiros de interação de PelF similares à acetil-transferase e oxidorredutase descritas por *Ghafoor*[45], bem como encontrar proteínas relacionadas à síntese de UDP-glicose, estudos computacionais utilizando PSI-BLAST[72] e a enciclopédia de Kyoto de genes e genomas (do inglês, KEGG)[73-74] foram realizados para selecionar as proteínas em *P. aeruginosa* PA14 correspondentes as proteínas descritas no trabalho citado. Selecionadas as proteínas de interesse, mutantes de uma biblioteca de transposons de PA14[58-59] contendo a inativação dos diversos genes selecionados foram isolados da biblioteca de transposons e tiveram suas capacidades de formação de biofilme avaliadas utilizando o método de cristal violeta.[75] O isolamento desses mutantes, assim como os ensaios de cristal violeta foram realizados no laboratório da professora Regina Baldini, no Instituto de Química (IQ - USP), com o auxílio do Dr. Gianlucca Nicastro. Cepas mutantes pré-inoculadas em meio LB foram incubadas a 37 ˚C e 200 rpm por 16 horas. As culturas foram diluídas 5% em um novo meio LB em placas de poliestireno que foram mantidas estaticamente a 30 ˚C por 16 horas. Para a retirada de células não aderidas na forma de biofilme, a placa foi lavada vigorosamente com água e os biofilmes foram corados por 5 minutos com solução de 0,1% de cristal violeta. A placa foi novamente lavada, o corante

aderido foi dissolvido em DMSO e a solução teve sua densidade medida em 595 nm. Os experimentos foram feitos em triplicata.

3.4.4 *Pull-down*

Culturas de *P. aeruginosa* PA14 *ΔpelD* crescidas por 16 horas a 30 °C foram coletadas por centrifugação, ressupendidas em tampão 20 mM Tris-HCl pH 8, NaCl 500 mM e lisadas por sonicação. Os debris celulares foram separados por centrifugação e foi adicionado 0,04% Triton X-100 para a solubilização das proteínas presentes nas micelas de fosfolipídeos. A fração solúvel foi novamente separada por centrifugação e utilizada nos estudos de *pull-down*.

Nos ensaios, 6xHis-SUMO e 6xHis-SUMO-PelD$^{176-455}$ foram imobilizados em colunas de afinidade Ni-NTA e os excessos proteicos foram lavados no tampão descrito acima. O extrato solúvel de *P. aeruginosa* PA14 *ΔpelD* foi passado nas colunas e as resinas foram lavadas com 10 VC de tampão suplementado de 10 mM imidazol. A eluição das proteínas foi feita em tampão contendo 500 mM imidazol e as amostras eluídas foram analisadas por SDS-PAGE.

3.5 Estudos do controle de PelD por c-di-GMP

3.5.1 Clonagem

Para a construção do plasmídeo suicida utilizado na deleção e reconstituição da CDS *pelD*, regiões de 750 pb *up* e *downstream* à CDS *pelD* foram amplificadas utilizando as sequências de nucleotídeos iniciadores sintetizados pela IDT (Life Technologies) indicados na tabela 4. A amplificação foi realizada utilizando os pares de *primers* 1-2, 3-4 e 1-4. As reações foram feitas com a enzima *Phusion* (New England Biolabs) na presença de 200 ng de gDNA de *P. aeruginosa* PA14 e 3% DMSO, segundo as indicações do fabricante. Após a confirmação da amplificação pela análise em gel de agarose 0,8%, as reações foram purificadas com o kit *Wizard SV Gel and PCR clean-up* (Promega).

Tabela 4 - Sequências iniciadoras utilizadas para amplificação das regiões *up* e *downstream* à CDS de PelD e para a amplificação dos plasmídeos mutantes. *Primers* 1 e 3 se anelam nas extremidades 5' das regiões *up* e *downstream*, respectivamente, enquanto os *primers* 3 e 4 se anelam na extremidade 3'. Além dos mutantes indicados, duplos mutantes de R367A com resíduos da hélice S e domínios GAF e GGDEF também foram construídos.

Primer	**Localização**	**Sequência**
ΔpelD_1 *ΔpelD_2*	-	AAGCTTGGAGTTCAACTACGGCATCG GATATCGCGAGGGTGAAATCCTTG
ΔpelD_3 *ΔpelD_4*	-	GATATCGCTGGGACATTTCCTTTTCA GGATCCCTCGAGGATGTGCTCCAGTA
L160E	**Hélice S**	GCAGCGAACTGCGCTCGCTCTGGTCGTTGC GCAACGACCAGAGCGAGCGCAGTTCGCTGC
L164E	**Hélice S**	TCGCAGACCGAGCTCCGAACTGCGCAGG CCTGCGCAGTTCGGAGCTCGGTCTGCGA
L167E	**Hélice S**	GCAGTTGTCGCTCACCGAGCAGCGAACTGC GCAGTTCGCTGCTCGGTGAGCGACAACTGC
L171E	**Hélice S**	TCTGCGACAACTGGAGCGCGAGCTGCCG CGGCAGCTCGCGCTCCAGTTGTCGCAGA
V188E	**GAF**	GGCGGAAACCGAGCTGGCGCTGC GCAGCGCCAGCTCGGTTTCCGCC
L299E	**GAF**	GCGATGTGCCCGGCCTCGATCGCCAGCAGGC GCCTGCTGGCGATCGAGGCCGGGCACATCGC
L314E	**Loop conector**	CGGCCAGTTGCTCTGCGCGACGGTCGC GCGACCGTCGCGCAGAGCAACTGGCCG
L316E	**Loop conector**	GATGTCGGCCTCTTGCAGTGCGCGACGGTCG CGACCGTCGCGCACTGCAAGAGGCCGACATC
R367A	**GGDEF (RxxD)**	CACGTCGAGGCCAGCCTGGCTGCCTTCC GGAAGGCAGCCAGGCTGGCCTCGACGTG
L369E	**GGDEF (RxxD)**	CGCAACTGCACGTCCTCGCCACGCTGGCTGC GCAGCCAGCGTGGCGAGGACGTGCAGTTGCG
L390E	**GGDEF**	CCTTCGGCGGAAGTCTCCGGCAACAACACCAG CTGGTGTTGTTGCCGGAGACTTCCGCCGAAGG

Fonte: Elaborada pela autora.

Para a deleção de *pelD*, regiões *up* e *downstream* amplificadas (1-2 e 3-4, respectivamente) foram duplamente digeridas com enzimas de restrição *Fast Digest* HindIII e EcoRV; e EcoRV e BamHI (Thermo Scientific), respectivamente. Os insertos foram novamente purificados e simultaneamente ligados ao vetor pNPTS138 previamente digerido com HindIII e BamHI com o auxílio da T4 DNA ligase (Thermo Scientific), segundo as instruções do fabricante. A reação foi utilizada para transformar células quimiocompetentes *E. coli* DH5α que foram crescidas em meio LB sólido contendo 50 µg/ml de canamicina. Colônias isoladas foram pré-inoculadas e tiveram seus DNAs plasmidiais extraídos com o auxílio do kit *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification* (Promega). Aproximadamente 150

ng dos plasmídeos foram digeridos com HindIII e BamHI e a presença dos insertos foi analisada em gel de agarose 0,8%. Os plasmídeos que possuíam os dois insertos duplamente clonados (pNPTS138 *ΔpelD*) foram analisados no sequenciador 3130 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

Para reconstituição gênica, o inserto clonado no vetor pNPTS138 estendeu-se da região de 750 pb *upstream* de *pelD* até a região de 750 pb *downstream*, incluindo a CDS de PelD. As etapas de clonagem foram feitas como descrito acima, sendo que a ligação foi feita com um único inserto. Após a construção desse plasmídeo (pNPTS138 *RpelD*), mutantes sítio-dirigidos que interferem na forma ativa de PelD foram gerados utilizando *primers* da tabela 4. A amplificação foi feita utiliando a enzima *Phusion* DNA polimerase (New England Biolabs) na presença de 3% DMSO segundo as recomendações do fabricante. Os DNAs amplificados foram digeridos com a enzima *Fast Digest* DpnI (Thermo Scientific) e posteriormente utilizados para transformar células *E. coli* DH5α. Após a extração do DNA plamidial, as mutações foram confirmadas por sequenciamento, como descrito anteriormente.

3.5.2 Construção de mutantes de PelD em *Pseudomonas aeruginosa* PA14

O vetor pNPTS138 *ΔpelD* foi utilizado para transformar células *E. coli* S17 que, após o crescimento em meio sólido LB contendo 50 µg/ml de canamicina, foi estriada juntamente com PA14 em LB para promover a conjugação do plasmídeo. Após 6 horas a 37 ˚C, as bactérias foram crescidas em LB sólido contendo 250 µg/ml de canamicina e 20 µg/ml de ácido nalidíxico para selecionar apenas as células que incorporaram o plasmídeo em seu gDNA.

Para confirmar a inserção do vetor, uma PCR de colônia foi realizada utilizando os *primers* Δ*pelD_1* e Δ*pelD_4*. Os clones que apresentavam amplificações correspondentes à cepa selvagem e com a CDS deletada, indicando a inserção do vetor no gDNA, eram selecionados para as próximas etapas.

A fim de promover a recombinação gênica e retirada do vetor suicida, culturas das colônias selecionadas eram crescidas em meio LB por 16 horas a 37 ˚C e plaqueadas em meio LB sem sal contendo 10% sacarose. O vetor pNPTS138 possui o gene *sacB*, que confere sensibilidade à sacarose presente no meio. Dessa forma, bactérias que possuem o plasmídeo inserido no gDNA não são capazes de crescer nesse meio. Para selecionar a mutação

desejada, uma nova PCR de colônia foi realizada e o sequenciamento do gDNA foi realizado para confirmação da deleção.

Na reconstituição gênica de *pelD*, as etapas de conjugação e recombinação gênica foram realizadas como descrito no item anterior, utilizando a cepa PA14*ΔpelD* e *E. coli* S17 transformada com os plasmídeos de reconstituição construídos.

3.5.2 Análise da formação de biofilme em mutantes de PelD

O crescimento dos mutantes de PA14 para a análise de formação de biofilme foi realizado como descrito no item 3.4.3. Após o período de incubação, as culturas finais tiveram suas absorbâncias medidas a 595 nm e a placa foi lavada vigorosamente com água. A placa foi corada por 5 minutos com solução de 0,1% de cristal violeta, lavada em água e o corante aderido foi dissolvido em 95% etanol. A solução teve sua densidade óptica medida em 595 nm. O valor da densidade óptica do corante foi dividido pela densidade óptica das células, gerando um valor de unidade de adesão. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.5.3 Calorimetria diferencial de varredura

Visando avaliar a estabilidade térmica de $PelD^{176-455}$ em relação à proteína complexada a c-di-GMP, estudos de DSC foram realizados com 1 mg/ml de proteína na presença e ausência de 250 µM c-di-GMP. Os experimentos foram conduzidos em um microcalorímetro VP-DSC (Microcal) com amostras aquecidas de 15 a 90 °C a 1,5 °C/minuto. Os termogramas dos tampões foram subtraídos dos termogramas das proteínas e as curvas resultantes foram normalizadas pela concentração proteica. Todos os experimentos foram feitos em duplicata em 20 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl.

4 Resultados e discussão

O presente trabalho se propôs a realizar vários estudos *in vivo* para investigar o mecanismo de ativação de PelD e estudos bioquímicos para investigar o recrutamento de PelF pelo complexo Pel de membrana interna. Complementarmente, o trabalho buscou detectar a formação dos complexos Pel de periplasma, de membrana interna e de membrana externa, por meio de ensaios interação com seus componentes isolados, assim como pela expressão heteróloga das regiões que codificavam os complexos isolados (*pelBC*, *pelD-G*) e o complexo inteiro (*pelA-G*).

4.1 Obtenção e caracterização de amostras proteicas

Para os estudos bioquímicos, é essencial a produção e obtenção de amostras proteicas puras. Dessa forma, o item 4.1 mostrará o processo de obtenção e caracterização inicial das amostras proteicas utilizadas nesse trabalho, abrangendo as etapas de clonagem, expressão heteróloga, purificação proteica, otimização de condições de produção de amostras e caracterizações oligoméricas e estruturais iniciais.

4.1.1 Clonagem

A produção de amostras para estudos bioquímicos iniciou-se com o desenho de construções solúveis de PelA, PelB, PelC, PelE (construções periplasmáticas) e PelF (proteína citosólica). Para isso, foram realizadas predições computacionais de peptídeo sinal, domínios proteicos, hélices transmembrana e estrutura secundária a fim de produzir porções funcionais solúveis e não truncadas.

Como exemplo, análises da sequência de PelF revelaram a presença de dois domínios: DUF3492 e GT. A sigla do domínio DUF vem do inglês, *Domain of Unknown Function*, que significa domínio de função desconhecida. O domínio DUF3492 de PelF é predito se estender do aminoácido 12 ao 291, enquanto que o domínio GT estende-se de 310 ao 482, como mostrado na figura 16. Adicionalmente, foram feitas predições de estrutura secundária de

PelF para que as construções proteicas não interrompessem alguma possível estrutura secundária, o que poderia ocasionar uma desestabilização da construção proteica expressa.

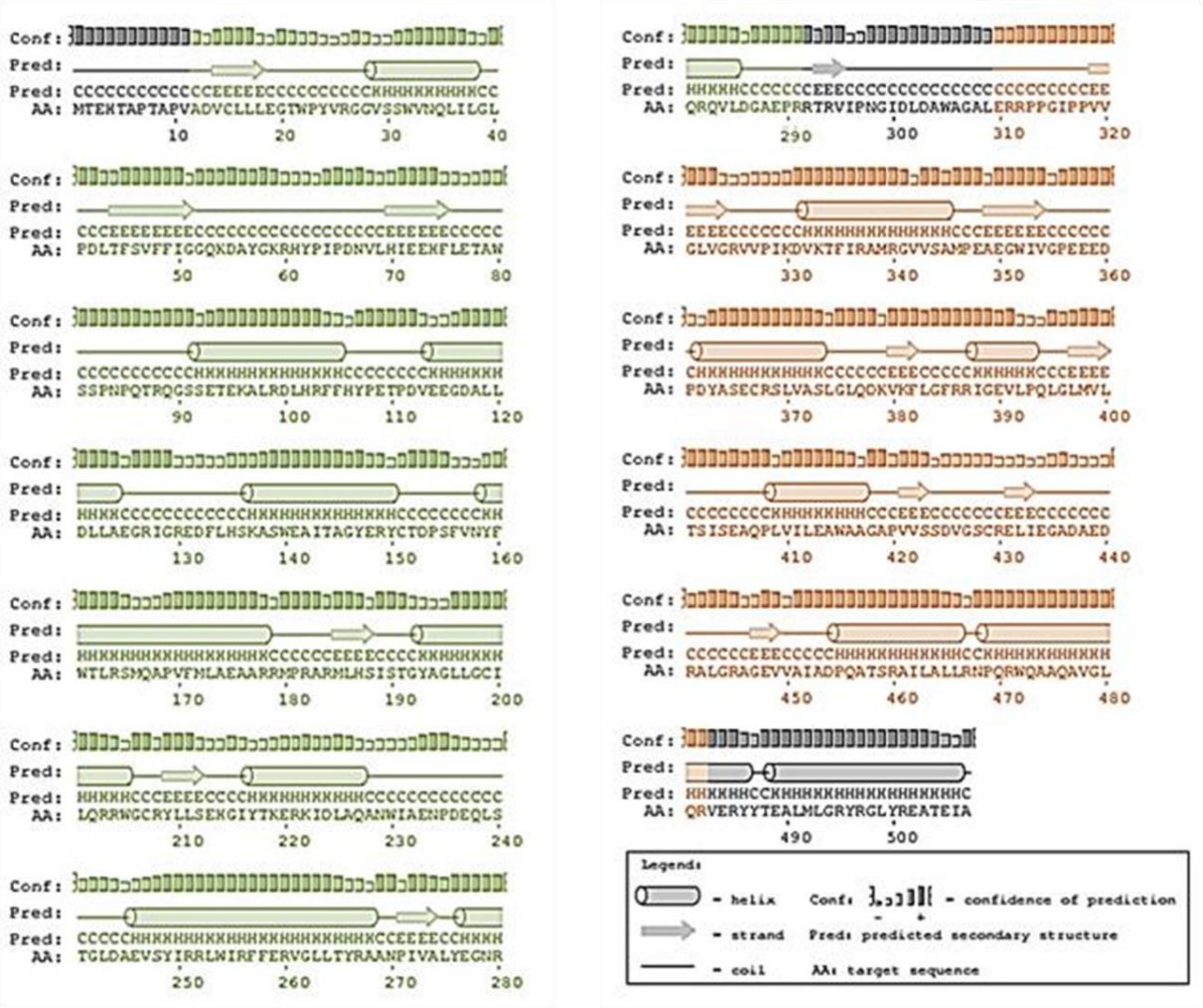

Figura 16 - Predições computacionais de estruturas secundárias e domínios proteicos de PelF pelos programa Psipred e Pfam. As barras indicam a confiabilidade da predição, os cilindros indicam hélices alfa (H), as setas indicam fitas beta (E) e as linhas regiões de *loops* (C). As cores indicam os domínios DUF3492 (verde) e GT (alaranjado).

Fonte: Elaborada pela autora.

O mesmo tipo de análise foi feito para as construções periplasmáticas de PelA, PelB, PelC e PelE, gerando as construções apresentadas nas tabelas 2 e 5. Baseado nessas construções, foi feito o desenho apropriado dos *primers* (tabela 2) e todas as construções foram amplificadas (figura 17) e ligadas em seus respectivos vetores de expressão (com exceção das construções do domínio GT de PelF que, apesar de terem sido amplificadas, não foram ligadas no vetor pET-SUMO). Os clones foram propagados e a inserção de cada inserto foi confirmada por sequenciamento. Visando a maior solubilização da proteína de interesse, construções solúveis (e CDS de PelG) foram clonadas em vetor pET-SUMO, uma vez que a

proteína de fusão SUMO decorrente da expressão nesse vetor é conhecida por apresentar alta solubilidade em soluções aquosas.

Construções de membrana foram clonadas preferencialmente em vetores que produziriam um *tag* na região C-terminal da proteína, como os vetores pET-21a e pBADm11-Strep, para que a sinalização do peptídeo sinal e o enovelamento da proteina hidrofóbica não fossem interferidos pela expressão de um *tag* na região N-terminal da proteina. Além disso, as maiores construções gênicas, *pelD-G* e *pelA-G*, foram inseridas no vetor pBADm11-Strep utilizando uma clonagem baseada em recombinação homóloga. Essa estratégia dispensa o uso de enzimas de restrição apropriadas que podem não ser encontradas em grandes fragmentos de DNA.

Tabela 5 - Construções clonadas nesse trabalho, mostrando o tamanho dos fragmentos de DNA clonados e as massas moleculares das respectivas construções proteicas expressas. As massas apresentadas correspondem apenas à construção clonada, desconsiderando os 16 kDa da proteína de fusão SUMO no caso das costruções em pET-SUMO.

	Construção	Característica	Vetor	Tamanho (pb)	Massa (kDa)
Periplasma	PelA $^{47-948}$	Inteira	pET-SUMO	2703	100
	PelB $^{35-1193}$	Domínio TPR	pET-SUMO	3474	131
	PelC $^{27-172}$	Porção periplasmática	pET-SUMO	435	16
	PelE $^{88-329}$	Domínio TPR	pET-SUMO	723	26
Citoplasma	PelF	Inteira	pET-SUMO	1521	57
	PelF $^{1-289}$	Domínio DUF2492	pET-SUMO	867	33
	PelF $^{1-291}$	Domínio DUF2492	pET-SUMO	873	33
	PelF $^{13-289}$	Domínio DUF2492	pET-SUMO	831	32
	PelF $^{310-507}$	Domínio GT	pET-SUMO	594	21
	PelF $^{313-507}$	Domínio GT	pET-SUMO	585	21
Membrana	PelB	Inteira	pET-21a	3582	140
	PelD	Inteira	pET-21a	1368	50
	PelG	Inteira	pET-SUMO e pET-21a	1371	51
	PelBC	Inteiras	pET-21a	4141	152
	PelD-G	Inteiras	pBADm11-Strep	5227	192
	PelA-G	Inteiras	pBADm11-Strep	12196	450

Fonte: Elaborada pela autora.

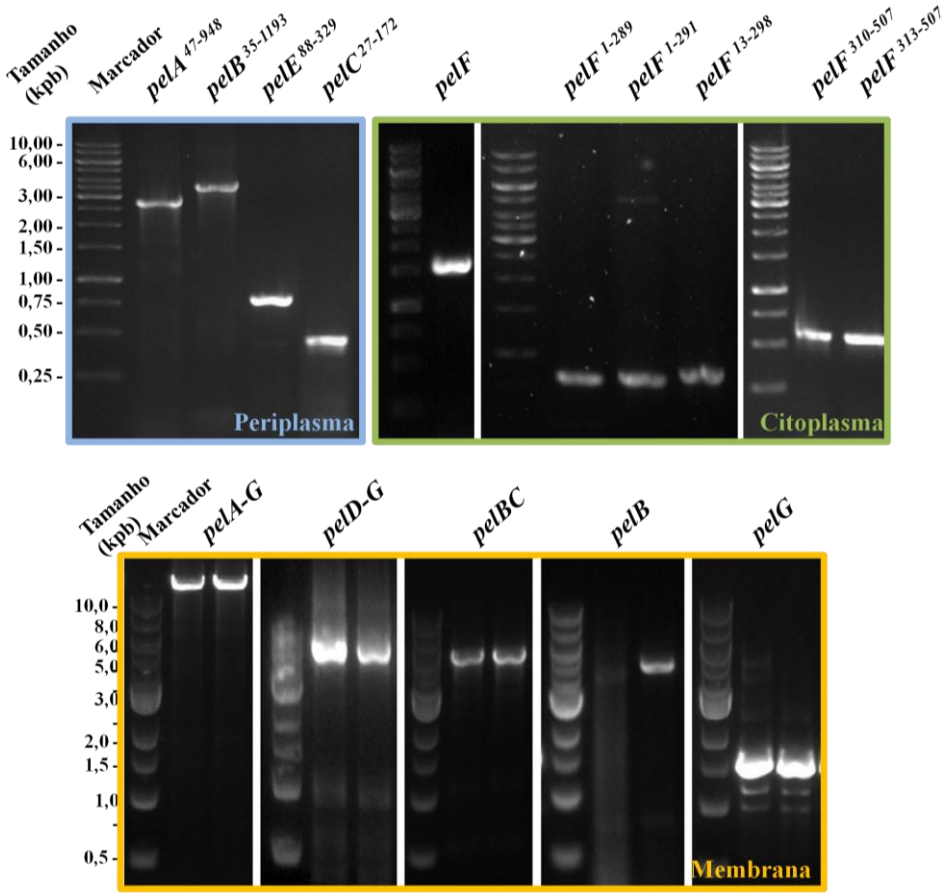

Figura 17 - Géis de agarose das amplificações de todas as construções periplasmáticas, citoplasmáticas e de membrana estudadas nesse trabalho.
Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.2 Teste de expressão e indução

Culturas celulares foram crescidas e induzidas a expressar as proteínas Pel heterólogas. Todas as construções periplasmáticas e citoplasmáticas foram expressas, como mostrado nas figuras 18 e 19.

Contudo, apesar de todos os esforços variando as cepas e condições de expressão das proteínas e complexos de membrana clonados nos vetores pET-21a e pBADm11-Strep, nenhuma expressão foi observada por *western blot*. Assim, decidiu-se clonar *pelG* no vetor pET-SUMO, observando-se então a expressão protéica, como mostrado na figura 19. A expressão de PelG com o *tag* 6xHis-SUMO na região N-terminal mostra que, apesar de possuir um domínio altamente solúvel na porção N-terminal, a proteína pôde ser corretamente expressa, uma vez que o processo de enovelamento e aderência de PelG na membrana deve ocorrer concomitantemente ao processo de síntese proteica.

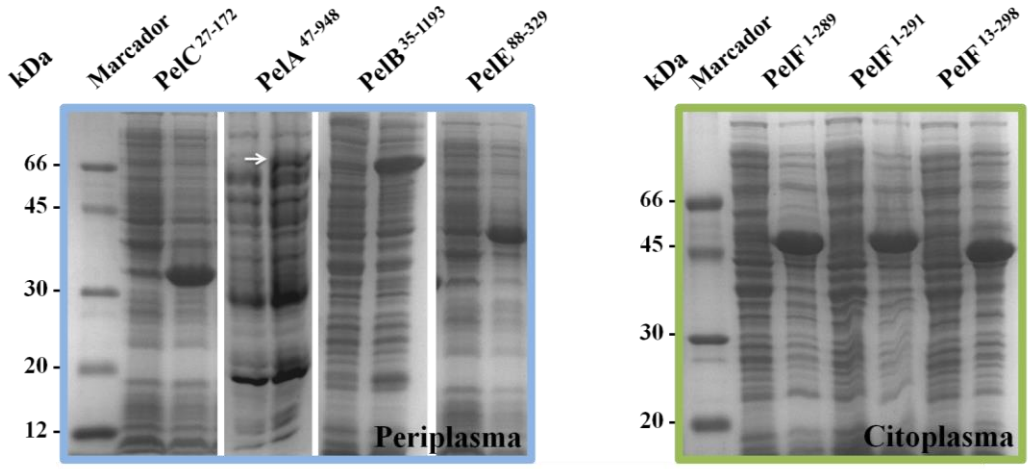

Figura 18 - Teste de expressão das construções Pel do periplasma e citoplasma. O primeiro poço representa a cultura não induzida e o segundo poço a cultura induzida com 1 mM IPTG. A seta branca em PelA destaca a banda de sua expressão.
Fonte: Elaborada pela autora.

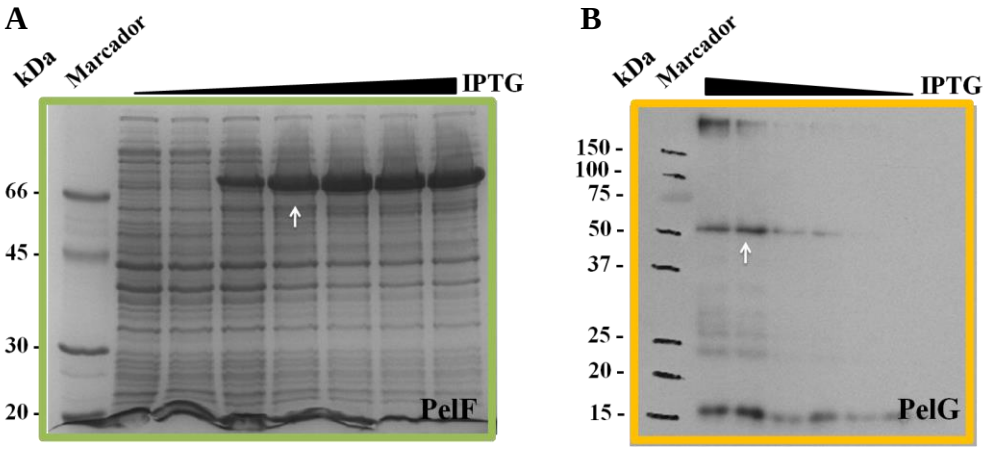

Figura 19 - (A) SDS-PAGE do teste de indução de PelF, onde a seta branca ressalta a concentração de 0,01 mM IPTG em que ocorre a saturação da expressão proteica. (B) *Western blot* do teste de indução de PelG com a seta branca indicando a condição de saturação de expressão proteica a 0,8 mM IPTG.
Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.3 Produção e caracterização proteica

Devido ao grande número de amostras, os próximos itens de produção de amostras apresentarão em maiores detalhes a otimização de obtenção das duas proteínas com melhores resultados: PelF, cujas etapas de clonagem e purificação são idênticas às das outras construções solúveis (citosólicas e periplasmáticas), e PelG, a única proteína de membrana que pôde ser expressa.

4.1.3.1 PelF e construções solúveis

PelF foi expressa heterologamente e purificada como descrito nos item 3.1.3. A figura 20A apresenta as primeiras etapas de purificação de PelF, mostrando a recuperação de 6xHis-SUMO-PelF do extrato celular, clivagem do *tag* 6xHis-SUMO, e recuperação de PelF na fração não ligada da segunda IMAC. Posteriormente, PelF foi submetida a uma SEC para a retirada de agregados e outros contaminantes e, no fim das etapas de purificação, a proteína apresentou-se livre de contaminantes e apta para estudos biofísicos e cristalográficos.

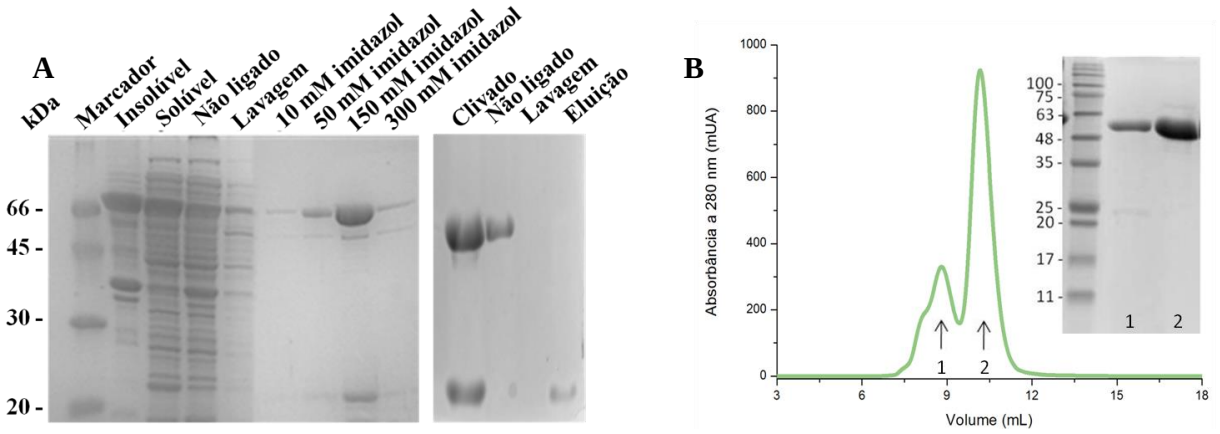

Figura 20 - (A) Gel SDS-PAGE com frações da purificação da primeira (esquerda) e segunda IMAC (direita) de PelF, mostrando a fração de proteína purificada após a clivagem com ULP1. (B) Cromatograma de SEC de PelF e gel SDS-PAGE indicando as frações de PelF eluídas.
Fonte: Elaborada pela autora.

Em futuros ensaios cristalográficos, é desejável que as proteínas purificadas estejam em condições tamponantes que propiciem a formação ordenada de cristais, estando elas as mais monodispersas possíveis e em uma única população conformacional.[76-77] Por isso, foi feita a otimização de tampões de PelF utilizando o kit de solubilidade JBS (Jena Bioscience) e o kit *Additive Screen* (Hampton Research) por meio de análises de DLS e *Thermofluor*. As melhores condições tamponantes de PelF foram Tris-HCl pH 8 e HEPES pH 7,5 contendo 300 mM NaCl podendo ser suplementado com 1,2% glicerol.

Utilizando os tampões descritos acima, foram realizadas diversas triagens cristalográficas com o auxílio de vários kits comerciais com diferentes agentes precipitantes. Pela relutância da cristalização de PelF e suas construções, tentou-se expressar a proteína inteira em *E. coli* SHuffle, uma cepa produtora da chaperona isomerase DsbC que ajuda na formação de pontes de dissulfeto (PelF possui seis cisteínas), e novos ensaios cristalográficos foram feitos com essa proteína purificada, não retornando formação de cristais.

Sabendo-se que resíduos de aminoácidos carregados que possuem elevado grau de liberdade podem prejudicar o arranjo das proteínas no processo de formação de um cristal, indispensável para a resolução da estrutura por cristalografia de raios-X, optou-se por fazer mutantes de PelF com energia superficial entrópica reduzida, ou seja, realizar a mutação dos aminoácidos que elevam a entropia da superfície proteica por aminoácidos com graus de liberdade menores. Para predizer tais aminoácidos, utilizou-se o programa SERp,[66] que retornou três regiões com alta probabilidade de elevada entropia superficial: E357/E358/E359, K219/E220/K222 e E114/E115. Foi feita a mutação desses três *clusters* substituindo os referidos aminoácidos por alaninas e as proteínas foram novamente expressas. O mutante E357A/E358A/E359A permaneceu em frações insolúveis do lisado bacteriano, apresentando características hidrofóbicas. Dessa forma, apenas os outros dois mutantes foram utilizados nos ensaios cristalográficos que ainda não apresentaram a formação de nenhum cristal proteico.

Até aqui foram apresentados os resultados referentes a melhor amostra solúvel obtida, PelF. Contudo, as mesmas etapas de produção de amostras visando à caracterização estrutural e estudos bioquímicos de todas as construções apresentadas nesse trabalho também foram realizadas. A seguir, é mostrada uma tabela de progressão indicando todas as etapas concluídas para cada construção solúvel trabalhada (tabela 6). Além de PelF, foram obtidas amostras purificadas das construções periplasmáticas do complexo Pel cujos cromatogramas são apresentados na figura 21.

Tabela 6 - Progressão de cada construção trabalhada. “ ✓" indica que a etapa foi realizada e “x” indica que, apesar dos esforços para concluí-las, as etapas não foram concluídas com sucesso.

	Construção	Clonagem	Expressão	Purificação	Estudos bioquímicos	Cristalização	Otimização de cristais
Periplasma	PelA $^{47-948}$		✓	✓	✓		
	PelB $^{35-1193}$	✓	✓	✓	✓		
	PelC $^{27-172}$	✓	✓	✓	✓	✓	
	PelE $^{88-329}$	✓	✓	✓	✓		
Citoplasma	PelF	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	PelF $^{1-289}$	✓	✓				
	PelF $^{1-291}$	✓	✓				
	PelF $^{13-289}$	✓	✓				
	PelF $^{310-507}$	x					
	PelF $^{313-507}$	x					
	PelD $^{111-455}$	*Trabalho de mestrado de *Silva*[56]			✓	*Trabalho de mestrado de *Silva*[56]	
	PelD $^{176-455}$				✓		

Fonte: Elaborada pela autora.

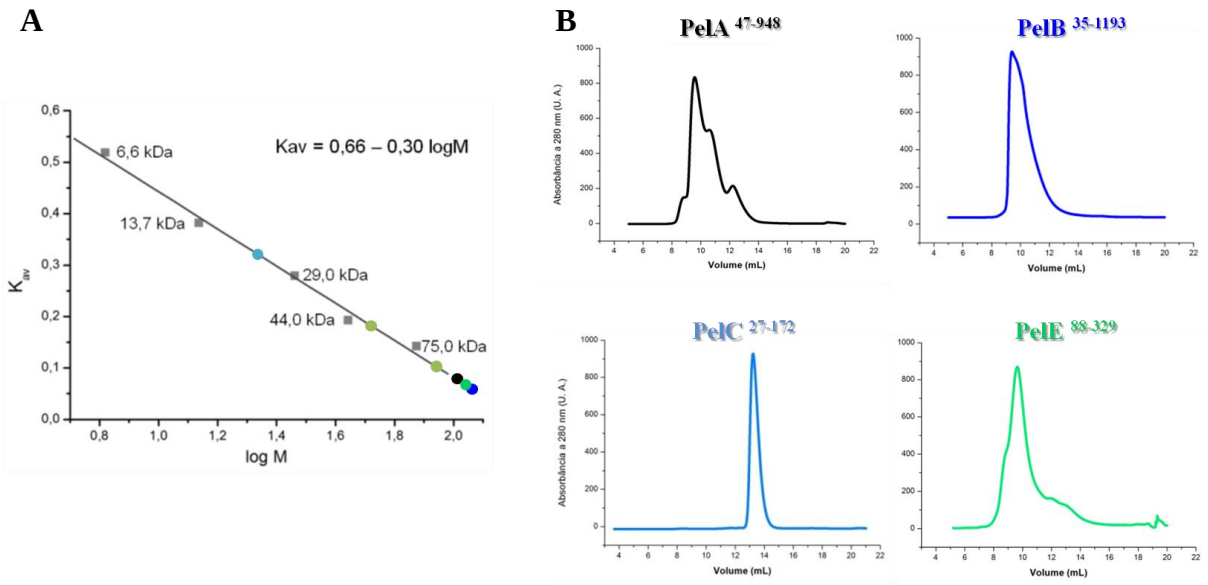

Figura 21 - (A) Curva de calibração de Superdex 75 10/300GL construída com o auxílio de proteinas globulares de massa molecular conhecida. Pontos redondos indicam as posições referentes aos volumes de eluição de cada amostra. (B) Cromatogramas de SEC das construções periplasmáticas.
Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 7 - Massas calculadas das construções periplasmáticas e de PelF comparadas às massas calculadas a partir da SEC. Construções de PelA e PelC aparentam estar em estado monoméricos em solução, enquanto que PelF possivelmente possui duas formas oligoméricas em solução: monomérica e dimérica.

	Construção	Massa calculada (kDa)	Massa SEC (kDa)
Periplasma	**PelA** $^{47\text{-}948}$	100	96
	PelB $^{35\text{-}1193}$	131	104
	PelC $^{27\text{-}172}$	16	19
	PelE $^{88\text{-}329}$	26	100
Cito-plasma	**PelF**	57	84/55

Fonte: Elaborada pela autora.

A partir dos volumes de eluição de cada amostra, foi possível calcular a massa molecular de cada proteína (tabela 7) baseada na curva de calibração da coluna Superdex 75 10/300GL (Figura 21A). As massas calculadas por SEC das construções periplasmáticas indicam que PelA$^{47\text{-}948}$ e PelC$^{27\text{-}172}$ encontram-se majoritariamente monoméricas em solução. Complementarmente, foram realizados estudos de *crosslinking* que indicaram que PelA$^{47\text{-}948}$ apresenta outros dois estados oligoméricos, sendo um deles dimérico (banda próxima a 200 kDa) e outro de maior ordem (figura 22A). Apesar de monômeros e dímeros serem as

oligomerizações mais comuns em acetiltransterases, estruturas tetraméricas também foram descritas, podendo esse ser o enovelamento do maior estado oligomérico de PelA$^{47-948}$.[78] O mesmo estudo foi realizado com PelC$^{27-172}$ que, na presença do *crosslinker*, apresentou o mesmo padrão que a fração controle, indicando que essa construção muito provavelmente encontra-se monomérica em solução.

Observando as massas moleculares calculadas por SEC de PelB$^{35-1193}$ e PelE$^{88-329}$, pode-se inferir que tais proteinas possuem massas correspondentes a estados monoméricos e tetraméricos. Porém, apesar das proteínas terem sido purificadas, as massas correspondentes a essas construções nos géis de poliacrilamida apresentavam-se muito discrepantes de suas massas calculadas, o que poderia ser um forte enovelamento formado pelo domínio TPR de ambas as proteínas. Mesmo assim, apesar dos plasmídeos de expressão dessas proteínas terem sido sequenciados, optou-se por não realizar outros estudos com essas amostras que poderiam ser proteínas truncadas ou mesmo proteínas diferentes de PelB$^{35-1193}$ e PelE$^{88-329}$.

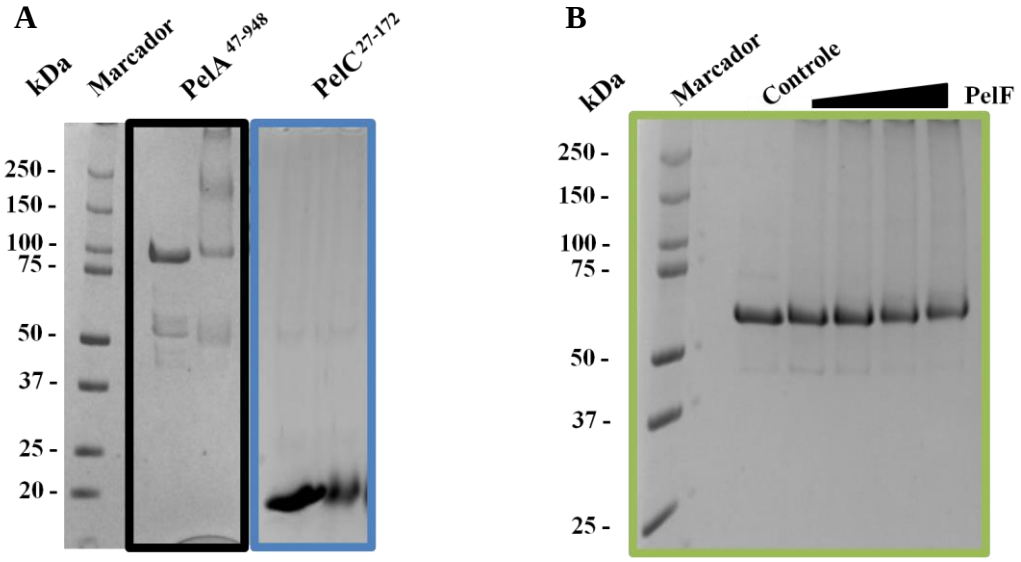

Figura 22 - (A) *Crosslinking* de PelA$^{47-948}$ e PelC$^{27-172}$, onde o primeiro poço indica a proteína controle e o segundo poço indica a proteina com o *crosslinker* EGS. (B) *Crosslinking* de PelF em concentrações proteicas crescentes, mostrando que o aumento da concentração proteica não leva à formação de novos estados oligoméricos.
Fonte: Elaborada pela autora.

PelF apresentou picos de eluição na SEC com massas correspondentes a estados monoméricos e diméricos. Para investigar a presença desses estados oligoméricos, foram feitas análises de SAXS que apresentaram massa molecular de 112 ± 12 kDa utilizando a curva em escala absoluta, corroborando com indícios de que PelF possui frações diméricas em solução. Em contrapartida, estudos de *crosslinking* não apresentaram indícios de dímeros de

PelF, o que pode ocorrer quando não há aminas primárias suficientemente próximas para reagirem com o *crosslinker*. Uma vez que a intensidade dos picos monomérico de PelF na SEC é bem mais pronunciado que o pico de eluição do monômero, a enzima possivelmente encontra-se em um equilíbrio de estados monomérico e dimérico em solução, sendo prevalente a fração monomérica em baixas concentrações de PelF.

4.1.3.2 PelG

Diferentemente do processo de purificação de uma proteína solúvel como PelF, proteínas de membrana possuem duas etapas de purificação adicionais: a extração da fração de membrana realizada por ultracentrifugação e a extração da proteína dos fosfolipídeos com o auxílio de detergentes. Na busca pelo melhor detergente para extração de PelG, membranas contendo a proteína superexpressa foram solubilizadas em diferentes detergentes e a extração foi avaliada por gel SDS-PAGE seguido de *western blot*. Como pode ser observado na figura 23, com exceção de CHAPS, todos os outros detergentes foram capazes de solubilizar PelG em maior ou menor escala. Visto que a extração é a etapa de purificação que utiliza a maior quantidade de detergente, optou-se por utilizar o detergente DDM por motivos financeiros.

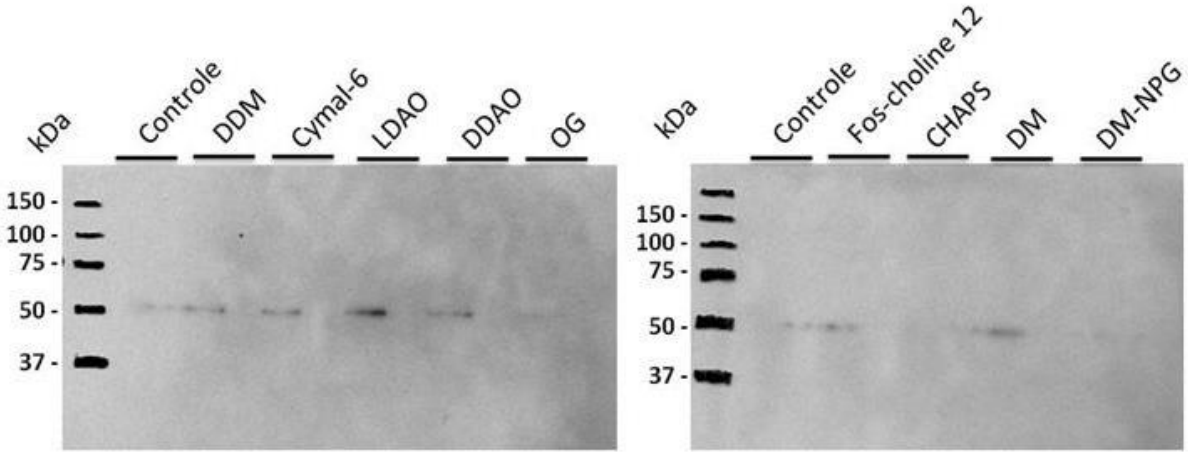

Figura 23 - *Western blot* do teste de solubilidde de PelG em diversos detergentes. Em cada amostra, o primeiro poço representa a fração solúvel e o segundo poço representa a fração insolúvel após o processo de solubilização. O controle foi preparado sem a adição de detergentes.
Fonte: Elaborada pela autora.

Sabendo-se que em ambientes contendo detergente algumas proteases solúveis perdem sua eficiência, a próxima etapa de purificação envolveu um teste de clivagem de 6xHis-SUMO de PelG por ULP1 na presença de diversos detergentes, uma etapa crucial para os futuros passos de purificação proteica. Assim, após a extração com DDM e uma primeira

IMAC com troca de detergentes, PelG e a protease foram incubadas e a clivagem foi analisada por SDS-PAGE. Observando a figura 24, pode-se notar que as condições com maior porção de clivagem foram na presença de detergentes não-iônicos, como DM-NPG, DDM e OG. Por outro lado, ULP1 apresentou perda de atividade em detergentes zwitteriônicos, deixando uma porção considerável de proteína não clivada. Por apresentar menor CMC e propiciar a atividade eficiente de ULP1, DM-NPG foi escolhido como o detergente de purificação de PelG.

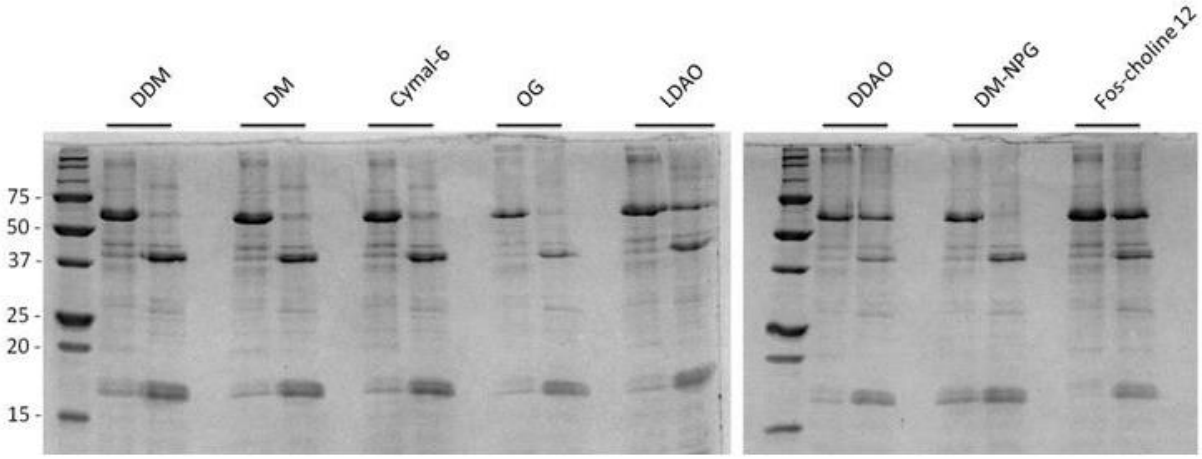

Figura 24 - Teste de clivagem de ULP1 na presença de diferentes detergentes. O primeiro poço de cada detergente representa a fração não clivada e o segundo poço representa a fração incubada com ULP1. Apesar de PelG não ter sido totalmente clivada em todas as condições, é notável a melhor ação enzimática na presença de detergentes não-iônicos.
Fonte: Elaborada pela autora.

Encontradas as melhores condições de solubilização e clivagem de 6xHis-SUMO, PelG foi novamente expressa em meio LB, extraída utilizando DDM e purificada em tampão contendo DM-NPG. As próximas etapas de purificação foram análogas as de PelF, englobando uma primeira IMAC para a separação do extrato celular, clivagem de 6xHis-SUMO, segunda IMAC para a retirada do *tag* e da protease e, finalmente, uma SEC para separação de qualquer agregação ou contaminante (figura 25).

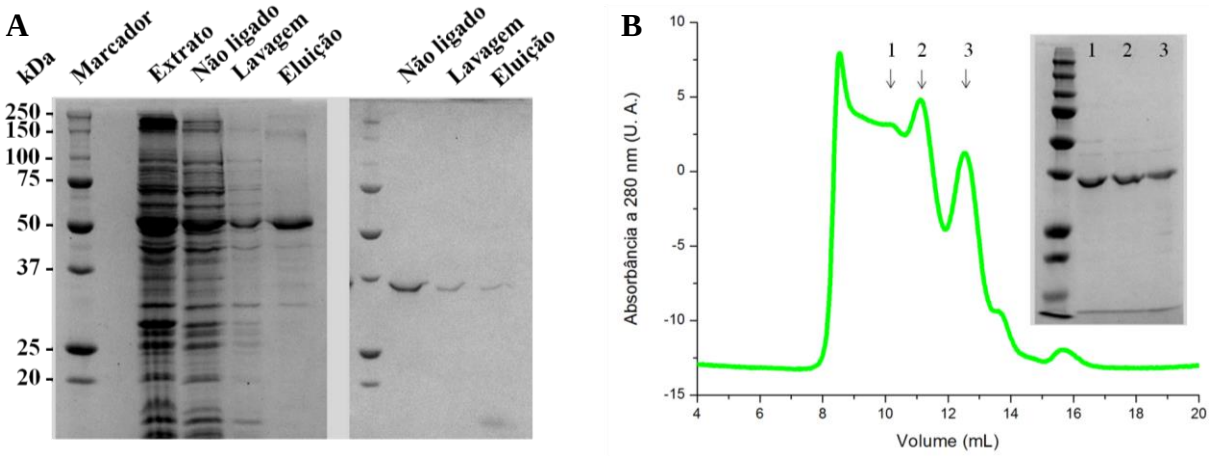

Figura 25 – (A) Primeira e segunda IMAC de PelG, respectivamente. Apesar de PelG possuir aproximadamente 51 kDa, a proteína migra como uma massa aparente menor no gel, indicando um enovelamento parcial mesmo na presença de fortes agentes desnaturantes, fato comum para proteínas de membrana. Além disso, o enovelamento parcial de PelG no gel também é favorecido pela amostra não sofrer tratamento térmico, uma vez que o aquecimento de PelG levava à formação de agregados que não penetravam o gel. (B) Cromatograma de SEC de PelG e gel SDS-PAGE indicando as frações eluídas de PelG.

Fonte: Elaborada pela autora.

Apesar da obtenção de uma amostra pura de PelG, a proteína apresentou-se extremamente não homogênea no perfil de eluição apresentado no cromatograma da figura 25B. A fim de aumentar a homogeneidade da amostra para futuros ensaios cristalográficos, foi feita a otimização de condições de expressão e purificação de PelG por meio da comparação dos perfis de SEC de cada condição testada. Inicialmente, PelG foi purificada de culturas crescidas em meio LB e TB contendo agentes tamponantes Tris-HCl pH 8,6 e CHES pH 9,5. A purificação de PelG foi feita como descrito no item 3.1.5 e os cromatogramas finais são mostrados na figura 26. É possível observar que, quando expressa em meio LB, a proteína adota, no mínimo, três estados conformacionais, enquanto que em meio TB PelG apresenta majoritariamente dois estados. Além disso, a expressão em TB combinada com um pH menos básico permitiu a obtenção de maiores quantidades proteicas com menos agregados, o que não foi visto para as outras condições. Assim, optou-se por realizar a expressão de PelG em meio TB e a purificação proteica em tampão Tris-HCl pH 8,6.

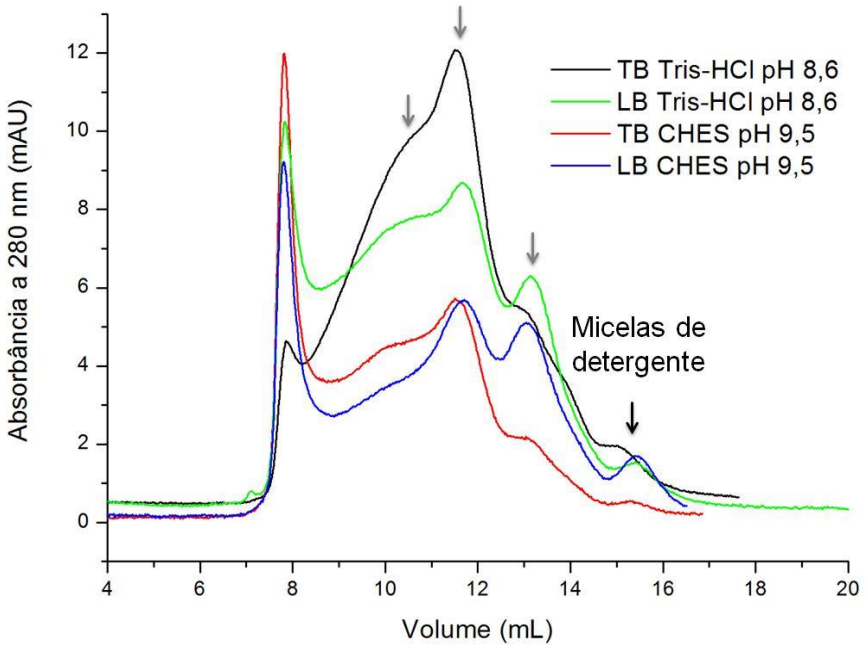

Figura 26 - SEC em Superdex200 10/300 GL de PelG para verificar as melhores condições de expressão e purificação. Setas cinzas indicam diferentes estados oligoméricos de PelG.
Fonte: Elaborada pela autora.

PelG foi então expressa e purificada nas condições indicadas acima para ser utilizada em novas triagens de detergentes. Observando a figura 27, pode-se notar que o pico de eluição de PelG é bem largo na presença de DDM e LDAO, abrangendo os três estados oligoméricos observados e tornando essas condições desfavoráveis para cristalização. Quando a proteína é mantida na presença de *amphipols*, polímeros surfactantes capazes de estabilizar proteínas de membrana, o oligômero maior é estabilizado. Contudo, uma vez que complexos proteína-*amphipols* são conhecidos por apresentarem dificuldades de cristalização, essa condição foi descartada. Condições contendo DM-NPG, DM-NPG + DTT e sacarose monododecanoato foram capazes de estabilizar os dois estados oligoméricos maiores de PelG e a combinação de detergentes LDAO + C_8E_4 estabilizou preferencialmente o menor estado da proteína. Dessa forma, esses detergentes foram escolhidos para serem utilizados em triagens cristalográficas.

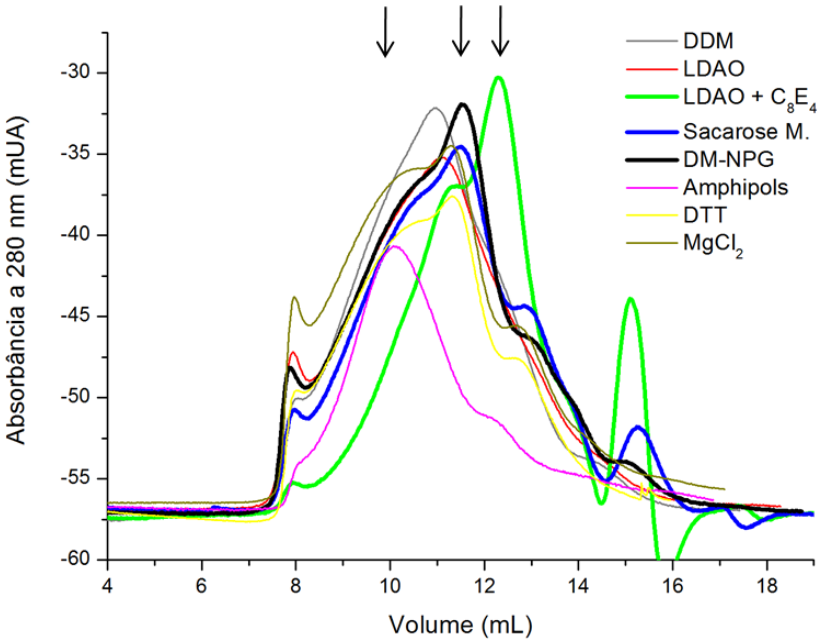

Figura 27 - Dependência dos estados oligoméricos de PelG na presença de diferentes detergentes. Cromatogramas em linhas mais espessas indicam as condições capazes de estabilizar preferencialmente os estados intermediários e de menor massa molecular. Setas pretas indicam os três estados oligoméricos de PelG em solução.
Fonte: Elaborada pela autora

Ensaios cristalográficos iniciais realizados com PelG em tampão 20 mM Tris-HCl, pH 8,6, 300 mM NaCl, 0,006% DM-NPG, 100 µM DTT resultaram na formação de microcristais em condições contendo 0,1 M NaCl, 0,1 M Tris-HCl pH 8,5, 0,1 M $MgCl_2$, 12% M/V PEG 4000 e 0,1 M acetato de zinco, 0,1 M acetato de sódio pH 4,6, 12% M/V PEG 4000 (figura 28). Essas condições foram otimizadas em triagens do tipo gota pendurada com a variação de pH, agente precipitante e utilizando o kit *Additive Screen*. Apesar de nenhuma mudança ainda ter sido observada, os cristais de PelG certamente passarão por outras longas triagens de otimização para obtenção de cristais e resolução se sua estrutura molecular.

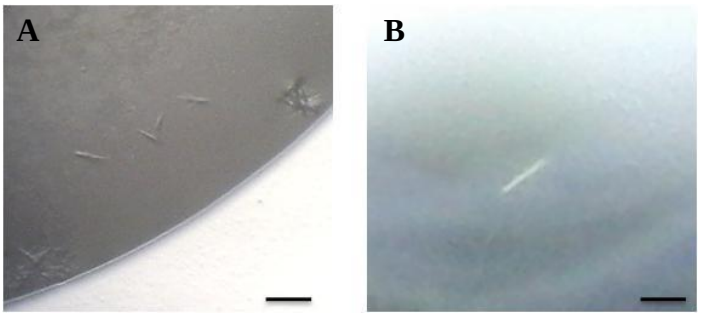

Figura 28 - Microcristais de PelG crescidos em tampões (A) Tris-HCl pH 8,5 e (B) acetato de sódio pH 4,6. Barras de escala representam 10 µm.
Fonte: Elaborada pela autora.

Por fim, foram feitas caracterizações oligoméricas de PelG por meio de *crosslinking* em várias concentrações protéicas e na presença de c-di-GMP (figura 29). Observando os padrões de *crosslinking* é possível notar pelo menos dois estados oligoméricos de PelG com massas correspondentes a dímeros e trímeros (massa real calculada de 51 kDa) que não são influenciados pela concentração proteica ou presença de c-di-GMP. Como descrito anteriormente, PelG mantém-se parcialmente enovelada em gel SDS-PAGE, sendo sua fração dimérica também resistente à desnaturação total nas condições apresentadas.

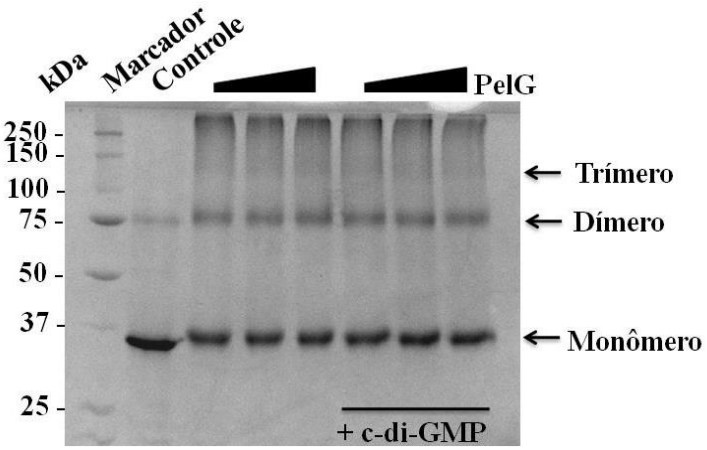

Figura 29 - *Crosslinking* de PelG na presença e ausência de c-di-GMP, indicando que a formação de dímeros e trímeros de PelG independe de sua concentração protéica ou presença de c-di-GMP.
Fonte: Elaborada pela autora.

4.2 Estudos de interação

Como já descrito anteriormente, especula-se uma interação entre PelD, PelF, e PelG uma vez que o polímero sintetizado por PelF deve estar próximo à membrana para ser exportado e PelD é a única proteína do complexo biossintético de PEL com domínio de ligação a c-di-GMP. Além disso, o trabalho também buscou avaliar as prováveis interações proteicas da porção periplasmática de complexo biossintético de PEL, resultados que serão mostrados ao longo dessa seção.

4.2.1 Estudos de interação da porção periplasmática do complexo Pel

Como descrito anteriormente, decidiu-se trabalhar apenas com as construções periplasmáticas de PelA e PelC, que apresentaram resultados condizentes com o desenho de cada construção. Utilizando essas amostras, foram feitos estudos de *crosslinking* para averiguar a formação de uma possível interação proteica dessas frações periplasmáticas (figura 30). Observando a figura 30, pode-se notar que não houve a formação de uma nova banda referente ao complexo PelA$^{47-948}$/PelC$^{27-172}$ no padrão de *crosslinking*, indicando que essas duas proteínas não interagem ou necessitam de outros componentes periplasmáticos para formarem um complexo.

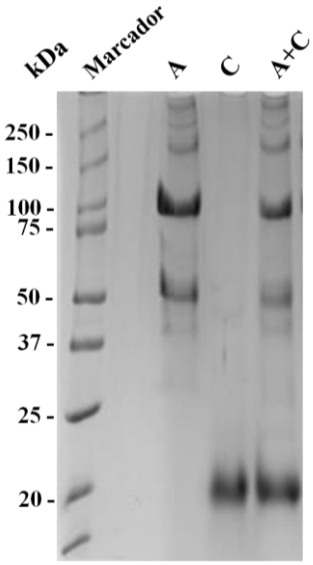

Figura 30 - *Crosslinking* de PelA$^{47-948}$ e PelC$^{27-172}$, mostrando que não ocorre a formação de um complexo proteico entre as duas proteinas.
Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.2 Estudos do recrutamento de PelF pelo complexo Pel de membrana interna

Para compreender toda a dinâmica e os fatores que influenciam essas interações, é necessário também compreender como essas proteínas isoladas encontram-se em solução e quais fatores são capazes de influenciar estruturalmente cada uma delas. Assim, é preciso compreender a dependência oligomérica de PelD, PelF e PelG com fatores como a concentração e presença de c-di-GMP. Tais caracterizações foram realizadas com PelF e PelG e estão mostrados na seção 4.1.3. Dessa forma, antes de realizar estudos de interação entre as

três proteinas citadas, primeiramente apresentaremos caracterizações oligoméricas das construções solúveis de PelD.

Estudos oligoméricos de construções citoplasmáticas de PelD foram conduzidos por *crosslinking*, como mostrado na figura 31. PelD$^{176-455}$ apresentou-se monomérica em todos os ensaios realizados, enquanto que PelD$^{111-455}$ apresentou frações diméricas que diminuíam com o aumento de concentração de c-di-GMP, mostrando que a presença da hélice JM e a presença do nucleotídeo são essenciais para a formação de dímeros de PelD. A diminuição do dímero de PelD na presença do nucleotídeo corrobora com o mecanismo de ativação de PelD proposto pelo grupo e será mais detalhado nos próximos itens.

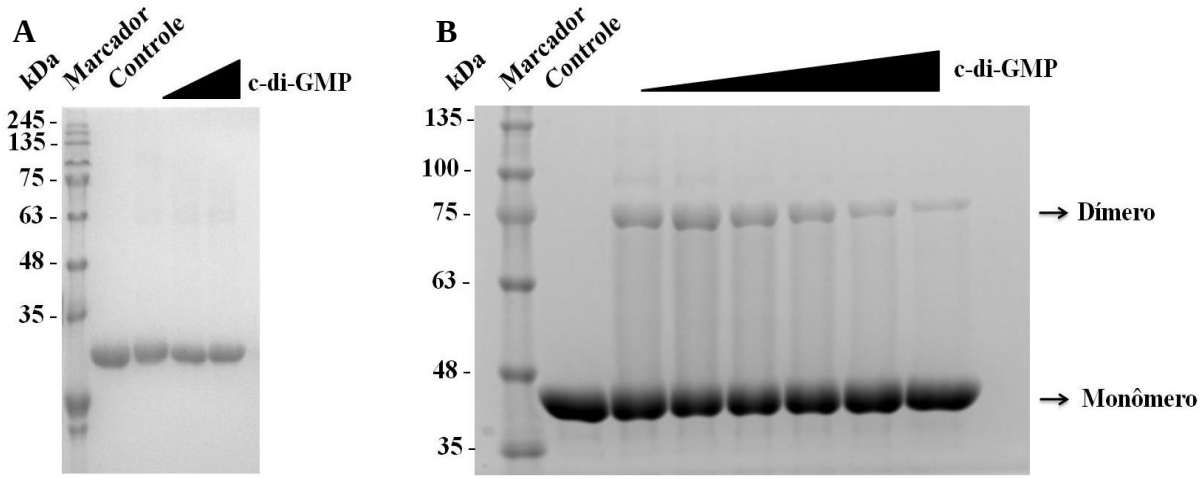

Figura 31 - *Crosslinking* de (A) PelD$^{176-455}$ e (B) PelD$^{111-455}$ na presença de concentrações crescentes de c-di-GMP. As massas reais calculadas de PelD$^{176-455}$ e PelD$^{111-455}$ são, respectivamente, 31 e 39 kDa.
Fonte: Elaborada pela autora.

Sabendo que PelD pode ser afetada pela presença de c-di-GMP, a interação entre construções solúveis de PelD e PelF foi primeiramente analisada por SEC na presença e ausência de c-di-GMP. Como mostrado na figura 32, o cromatograma de amostras contendo ambas as proteínas é apenas a sobreposição dos cromatogramas controle das proteínas separadas, indicando que não houve a formação de um complexo proteico com massa molecular maior. Como as condições de interação variam ao longo da cromatografia, em especial as concentrações proteicas e de c-di-GMP, novos testes de interação usando reações de *crosslinking* foram feitos variando as concentrações protéicas e presença de c-di-GMP monomérico e dimérico induzido pela presença de íons divalente. Contudo, nenhuma interação proteica foi detectada, indicando que a provável interação entre essas proteínas requer outros fatores reacionais ou parceiros de interação. Por isso, ensaios de *crosslinking* e *pull-down* foram realizados com PelF, PelG e construções solúveis de PelD a fim de averiguar

uma possível interação entre essas proteínas (figura 33). Novamente, nenhuma interação foi detectada, indicando que a porção de membrana de PelD e PelE podem ser essenciais na formação desse complexo, bem como outros possíveis parceiros de PelF.

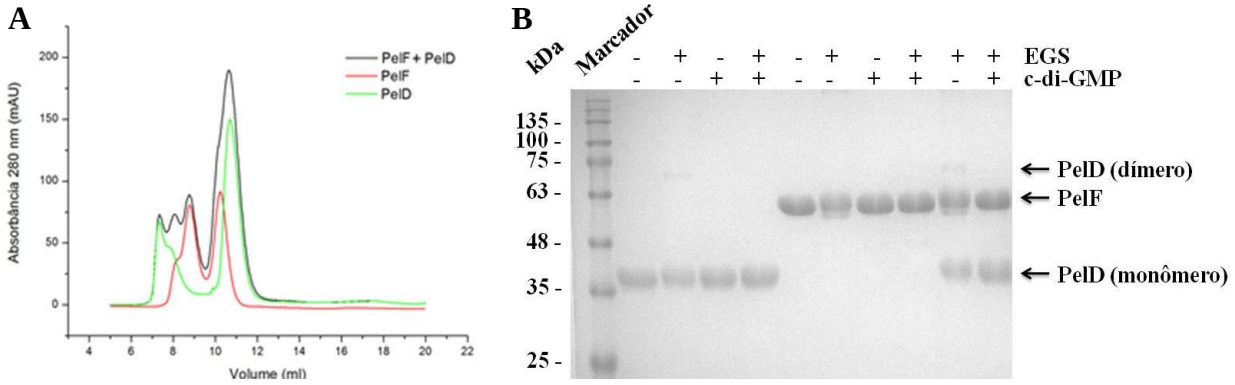

Figura 32 - Testes de interação entre PelD $^{111\text{-}455}$ e PelF realizados por (A) SEC e (B) *crosslinking*.
Fonte: Elaborada pela autora.

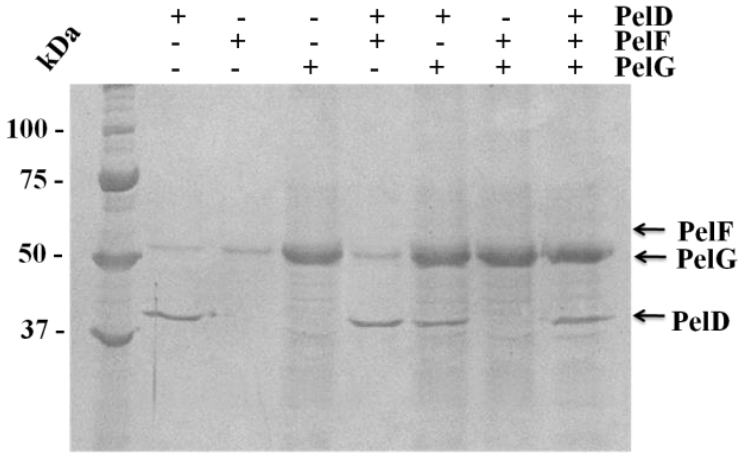

Figura 33 - *Pull-down* de PelF, PelG e PelD$^{111\text{-}455}$, com PelG imobilizada na coluna TALON através do *tag* 6xHis-SUMO. Observa-se que a resina provavelmente estava contaminada com PelG, o que não comprometeu a análise já que a banda de eluição de PelG é muito mais pronunciada. Além disso, nota-se que PelD$^{111\text{-}455}$ se ligava inespecificamente na resina, mas sua banda de eluição não aumentava na presença de PelG, indicando que essas proteínas não interagiram.
Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.3 Busca por parceiros de interação fora do complexo biossintético de PEL

Em 2013, *Ghafoor* e colaboradores, descreveram UDP-glicose como o possível substrato de PelF pela medida da concentração intracelular dessa molécula em cepas selvagens e com *pelF* deletado.[45] Além disso, no mesmo trabalho foi descrita a provável interação de PelF com enzimas acetiltransferases e oxidorredutases, comumente encontradas na modificação de polímeros e na conservação de pontes de dissulfeto proteicas, respectivamente. A existência de possíveis parceiros de interação de PelF e a não interação entre PelF, PelG e frações solúveis de PelD nos levou a buscar outros parceiros de interação citoplasmáticos do complexo Pel.

Inicialmente, fora realizados estudos de *pull-down* contra o extrato celular de *P. aeruginosa* PA14 deletada de *pelD* usando como isca imobilizada a proteína PelD$^{176-455}$ ligada a 6xHis-SUMO (figura 34). Comparando o padrão de eluição de PelD$^{176-455}$ com a amostra controle 6xHis-SUMO, pode-se observar a presença de duas bandas proteicas co-eluidas com PelD$^{176-455}$ que não estão presentes na amostra controle. Visto que tais bandas não possuem tamanho correspondente a outros componentes do complexo Pel, é possível que essas proteínas possam interagir com PelD e outros componentes desse complexo proteico. A identificação dessas bandas por espectrometria de massas está em andamento.

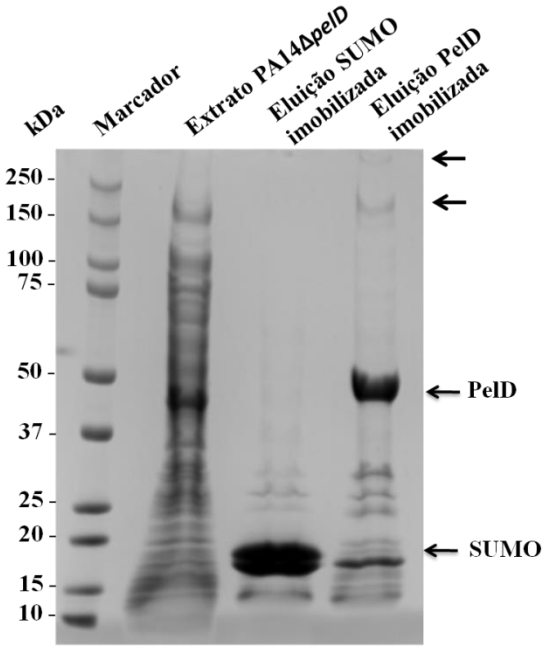

Figura 34 - *Pull-down* de PelD$^{176-455}$ com setas pretas não-identificadas mostrando as bandas de proteínas co-eluídas com PelD$^{176-455}$.
Fonte: Elaborada pela autora.

Posteriormente, para encontrar possíveis parceiros de interação de PelF descritas por *Ghafoor*[45], assim como encontrar proteínas relacionadas à síntese de UDP-glicose, utilizou-se o PSI-BLAST[72] e o KEGG[73-74] para selecionar as proteínas em *P. aeruginosa* PA14 correspondentes as proteínas descritas no trabalho citado. Selecionadas as proteínas de interesse (tabela 8), mutantes da biblioteca de transposons de PA14[58-59] contendo a inativação dos correspondentes genes selecionados foram isolados da biblioteca de transposons e tiveram suas capacidades de formação de biofilme avaliadas. Nessa abordagem, a inativação das CDSs das prováveis proteínas que interagem com PelF, ou que sintetizam seu substrato, levaria a uma drástica diminuição da formação de biofilme.

Tabela 8 - 36 proteínas de *P. aeruginosa* PA14 selecionadas por PSI-BLAST e KEGG como possíveis parceiros de interação de PelF.

	Proteína	Descrição
Acetiltranferases	PA14_32860	*Hypothetical protein*
	PA14_06300	*GNAT family acetyltransferase*
	PA14_35760	*Hypothetical protein*
	PA14_19360	*GNAT family acetyltransferase*
	PA14_64320	*Hypothetical protein*
	PA14_46460	*Hypothetical protein*
	PA14_51560	*Acetyltransferase*
	PA14_20491	*Acetyltransferase*
	PA14_58830	*Hypothetical protein*
	PA14_64360	*Hypothetical protein*
	PA14_46440	*Acetyltransferase*
	PA14_03080	*Acetyltransferase*
	PA14_30760	*Acetyltransferase*
	PA14_39410	*Hypothetical protein*
	PA14_71690	*GNAT family acetyltransferase*
	PA14_11750	*Acetyltransferase*
	PA14_09990	*Acetyltransferase*
	PA14_20491	*Acetyltransferase*
	PA14_06250	*GNAT family acetyltransferase*
	PA14_40130	*Hypothetical protein*
	PA14_31660	*Hypothetical protein*
	PA14_35200	*Acetyltransferase*
Oxidor-redutases	PA14_61600	*Hypothetical protein*
	PA14_51040	*Oxidoreductase*
	PA14_44560	*Flavin-containing monooxygenase*
Síntese de UDP-glicose	PA14_18380	*AlgA: mannose-1-phosphate guanylyltransferase*
	PA14_71970	*WpbW: GDP-mannosepyrophosphorylase*
	PA14_70270	*AlgC: phosphomannomutase*
	PA14_62840	*GlmM:phosphoglucosaminemutase*
	PA14_38350	*GalU: UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase*
	PA14_68200	*RmlA: glucose-1-phosphate thymidylyltransferase*
	PA14_07790	*Nucleotidyltransferase*
	PA14_73220	*GlmU: glucosamine-1-P acetyltransferase*
	PA14_62620	*Glucose-6-phosphate isomerase*
	PA14_68210	*RmlC: dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase*
	PA14_18580	*AlgD: GDP-mannose 6-dehydrogenase*

Fonte: Elaborada pela autora.

A triagem inicial da formação de biofilme de todos os mutantes foi feita em placas de poliestireno e, posteriormente, aqueles que apresentaram uma diminuição da formação de biofilme foram melhores avaliados utilizando tubos de vidro. A análise dos biofilmes revelou que o único mutante com diminuição da formação de biofilme era incapaz de expressar GalU, enzima única na última etapa de biossíntese da UDP-glicose, corroborando com os dados de que tal nucleotídeo glicosilado é um dos substratos de PelF (figura 35).[45]

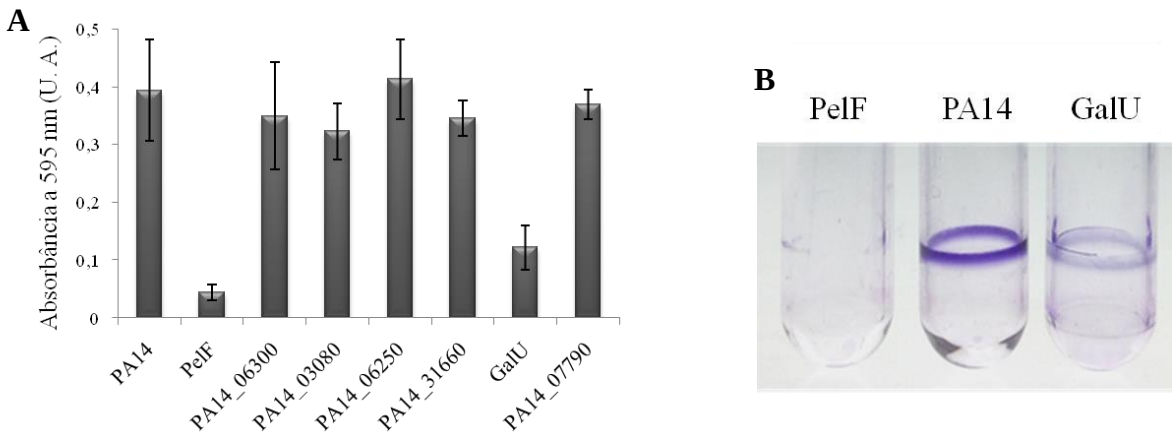

Figura 35 - Formação de biofilme utilizando o corante cristal violeta em mutantes da biblioteca de tranposons de PA14. (A) Quantificação do biofilme das cepas selecionadas após a triagem inicial e (B) biofilme corado dos mutantes de PelF e GalU comparados à cepa selvagem.
Fonte: Elaborada pela autora.

4.3 Estudo do controle de PelD por c-di-GMP

Como já mencionado anteriormente, PelD é a única proteína do complexo biossintético de PEL com domínio de ligação a c-di-GMP, o mensageiro intracelular da formação de biofilme bacteriano. Assim, PelD é provavelmente a única proteína reguladora desse complexo, sendo sua regulação promovida pelo c-di-GMP.

Para compreender melhor o mecanismo de ativação de PelD por c-di-GMP proposto em 2012[56], nosso grupo realizou uma série de experimentos de dicroísmo circular e calorimetria de titulação isotérmica visando estudar a resposta de duas construções citoplasmáticas de PelD ($PelD^{111-455}$, que contém as hélices JM e S, e $PelD^{176-455}$) com a presença de c-di-GMP. Como descrito no item 1.4, foi visto que a presença das hélices JM e S é essencial para a ligação de PelD a dímeros de c-di-GMP. Além disso, $PelD^{111-455}$ é capaz de quebrar dímeros de c-di-GMP a monômeros (dados não publicados), podendo essa ser uma etapa essencial na ativação de PelD. Complementarmente, observou-se que a constante de

afinidade de PelD$^{176-455}$ por monômeros de c-di-GMP é menor que a afinidade de PelD$^{111-455}$ por dímeros do nucleotídeo (dados não publicados), fatos que ajudam a entender como a proteína pode ser desativada pelo fácil despreendimento do monômero de c-di-GMP.

A fim de comprovar o mecanismo de ativação dependente de c-di-GMP de PelD proposto por nosso grupo, foram planejados diversos mutantes que desestabilizariam a hélice S de sua posição entre os domínios GAF e GGDEF, desestabilizariam o *core* hidrofóbico entre os mesmos domínios na ausência da hélice S e que seriam incapazes de se ligar a c-di-GMP. A figura 36 ilustra as posições das mutações realizadas nas estruturas de PelD citoplasmática que contém a hélice S (PelD$^{154-455}$, suposto estado inativado da proteína) e que não contém a hélice S (PelD$^{176-455}$, suposto estado ativado), enquanto a tabela 9 mostra os fenótipos esperados para cada mutação (discutido com mais detalhes no item 4.3.2). Além disso, estudos de DSC foram feitos com PelD$^{176-455}$ visando avaliar a influência de c-di-GMP na estabilidade da proteína.

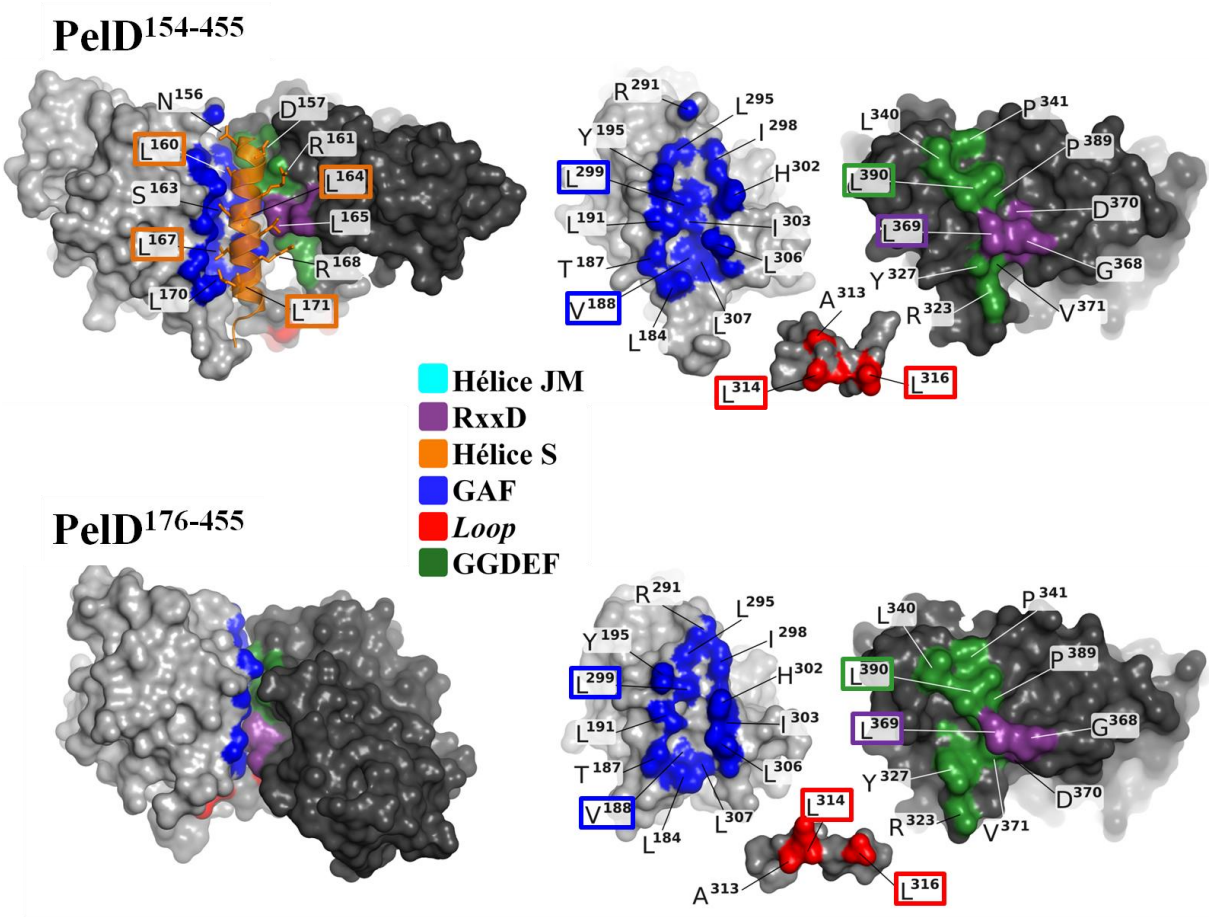

Figura 36 - Estruturas cristalográficas de PelD$^{154-455}$ (PDB: 4ETZ, suposto estado inativado de PelD) e PelD$^{176-455}$ (suposto estado ativado) resolvida por nosso grupo o domínio GAF representado em cinza claro e GGDEF em cinza escuro. Regiões coloridas representam as superficies em contato tanto com a hélice S quanto com o *core* hidrofóbico entre os domínios GAF e GGDEF. Resíduos de aminoácidos marcados indicam aqueles mutados nesse trabalho, como mostrado na tabela 9.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 9 - Mutantes de PelD em *P. aeruginosa* PA14 com seus respectivos fenótipos esperados e alterações estruturais promovidas. "*" indica a alteração provocada na forma ativada de PelD.

Mutação	Alteração estrutural	Fenótipo esperado
L160E **L164E** **L167E** **L171E**	Desestabiliza a hélice S Afeta o *coiled-coil**	Incapaz de produzir biofilme
V188E **L299E**	Desestabiliza a hélice S Desestabiliza o *core* hidrofóbico*	Redução da formação de biofilme
L314E **L316E**	Desestabiliza o *core* hidrofóbico*	Redução da formação de biofilme
L369E **L390E**	Desestabiliza a hélice S Desestabiliza o *core* hidrofóbico*	Redução da formação de biofilme
R367A	Não se liga a c-di-GMP	Incapaz de produzir biofilme
L167E + R367A **L171E + R367A**	Igual ao mutante simples	Igual ao mutante simples
V188E + R367A **L369E + R367A** **L390E + R367A**	Igual ao mutante simples	Igual ao mutante simples

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.1 Construção de mutantes

A construção dos mutantes descritos na tabela 9 foi feita através da reconstituição gênica de *pelD* com as respectivas mutações em uma cepa de *P. aeruginosa* PA14 deletada de *pelD* (PA14 *ΔpelD*). Dessa forma, primeiramente foi construída a cepa PA14 *ΔpelD* e, a partir dessa cepa, o gene selvagem *pelD* e seus mutantes foram reconstituídos para a análise de formação de biofilme, como descrito na seção 3.5.1. A figura 37 mostra algumas etapas da construção dos mutantes de PelD. Com exceção do duplo mutante L299E + R367A, todos os mutantes foram construídos com sucesso.

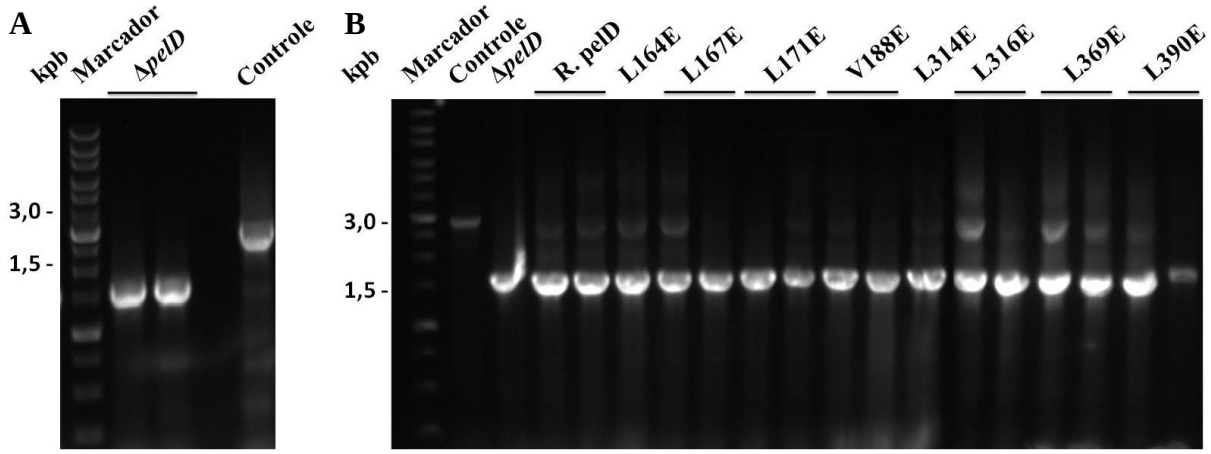

Figura 37 - (A) PCR de colônia mostrando a segunda recombinação gênica de PA14*ΔpelD* com a amplificação positiva do fragmento de 1,5 kpb correspondente ao fragmento deletado. (B) Primeira recombinação da reconstituição de algumas das CDSs mutadas nesse trabalho. Observa-se fragmentos correspondentes ao vetor de reconstituição (3 kpb) e à cepa PA14Δ*pelD* (1,5 kpb), indicando a incorporação do plasmídeo no gDNA.
Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.2 Análise de formação de biofilme em mutantes de PelD

Análises semiquantitativas da formação de biofilme dos mutantes produzidos foram realizadas utilizando ensaios de cristal violeta (figura 38). Como esperado, o mutante PA14 Δ*pelD* apresentou formação de biofilme praticamente nula enquanto que a cepa com a CDS reconstituída restaurou a capacidade de formação de biofilme da linhagem selvagem.

Mutantes do *loop* conector entre os domínios GAF e GGDEF (L314E e L316E, representados em vermelho) não afetariam a suposta forma inativada de PelD, uma vez que seus resíduos estão direcionados para o solvente (figura 36). Porém, na provável forma ativada de PelD, tais resíduos se encontram voltados para o *core* hidrofóbico entre os domínios GAF e GGDEF, participando de várias interações hidrofóbicas nessa região. Assim, a mutação desses resíduos afetaria apenas o *core* hidrofóbico de PelD ativada. Observando a figura 38, nota-se uma grande diminuição da formação de biofilme desses mutantes (de 4 a 5 vezes menor em relação à cepa selvagem), indicando que a estabilidade desse *core* hidrofóbico é muito importante para o estado ativado de PelD.

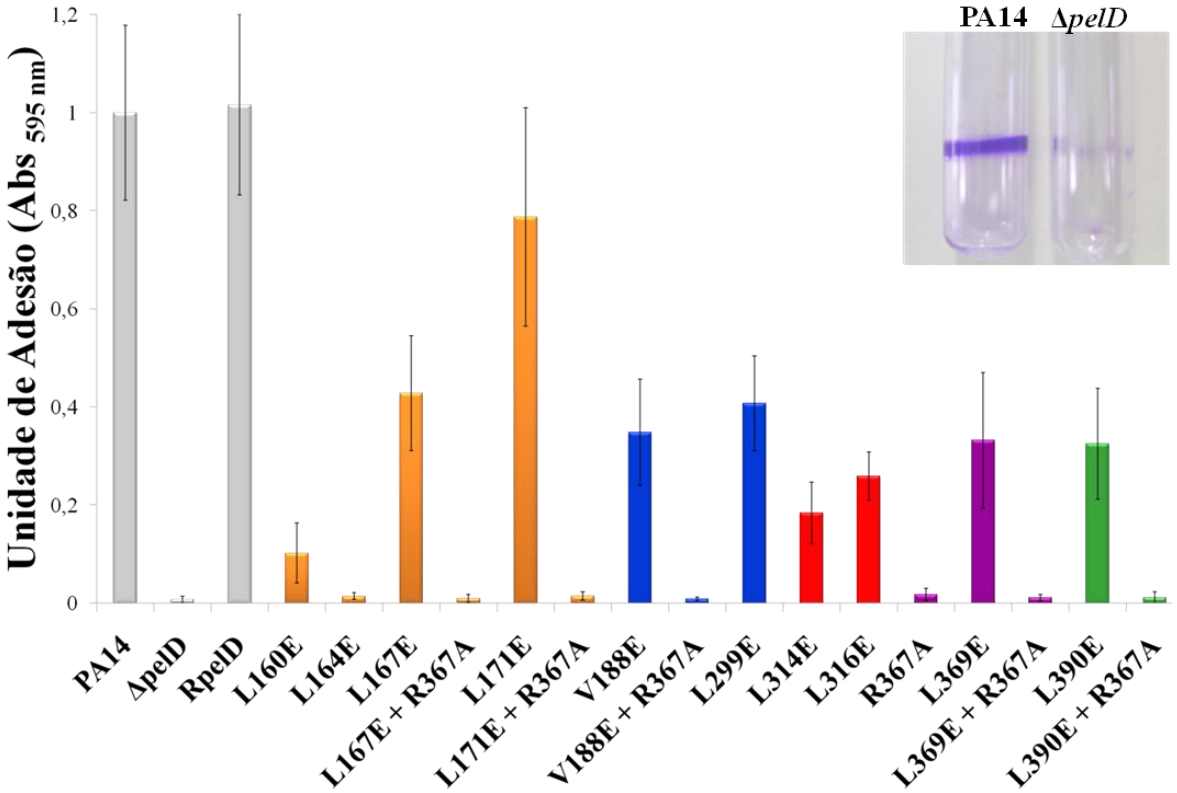

Figura 38 - Redução da formação de biofilme de PA14 *ΔpelD* corado com cristal violeta (canto direito superior) e unidade de adesão dos mutantes gerados, mostrando a importância dos contatos hidrofóbicos da hélice S e região interdomínios para a ativação do complexo Pel.
Fonte: Elaborada pela autora.

Barras em alaranjado representam os mutantes na região da hélice S de PelD. Os mutantes com mutação única nessa região quebrariam os contatos hidrofóbicos da hélice S com os domínios GAF ou GGDEF, fenômeno provocado pela ligação de um dímero de c-di-GMP, desestabilizando a hélice dessa região. Concomitantemente, essas mutações impediriam a formação do *coiled-coil* da hélice S, uma estrutura que seria essencial na translocação de sinal do domínio citoplasmático para o periplasmático. Pelo impedimento da formação do *coiled-coil*, era esperado que tais mutações abolissem a formação de biofilme desses mutantes, o que de fato ocorreu nos mutantes L160E e L164E. Contudo, os mutantes L167E e L171E mantiveram aproximadamente 50 e 80% de sua capacidade da formação de biofilme, respectivamente. Em uma primeira análise, isso parece contradizer o mecanismo proposto por nosso grupo, uma vez que tais mutações desestabilizam a hélice S e a formação de seu *coiled-coil*. Porém, nota-se que a capacidade de formação de biofilme dos mutantes da hélice S é restaurada à medida que as mutações são feitas do N para o C-terminal da hélice, indicando que, ao perder os contatos com os domínios citosólicos, a hélice S possivelmente forma uma estrutura do tipo *coiled-coil* com sua porção N-terminal, causando o rearranjo do restante da hélice JM que transloca o sinal ativador para o domínio de membrana. Dessa forma, mutações

no C-terminal da hélice S não afetariam muito a formação de biofilme desses mutantes, como observado em nossos experimentos. Esse mecanismo é suportado pelas análises computacionais previamente realizadas pelo grupo que predizem a provável existência de formação de *coiled-coil* na região da hélice S (figura 11). Além disso, estudos de *crosslinking* mostram que o aumento da concentração de c-di-GMP diminui a formação de dímeros de $PelD^{111-455}$, mostrando que o afastamento da hélice S causado pela ligação do nucleotídeo interfere na estrutura *coiled-coil* formado pela hélice JM. No entanto, mesmo em grande excesso molar do ligante, $PelD^{111-455}$ ainda possui uma pequena porção dimérica, reforçando o fato de que a hélice S forma um fraco *coiled-coil* capaz de estabilizar dímeros da proteína.

Mutações dos domínios GAF e GGDEF (representados em azul e verde, respectivamente, com o motivo RxxD do domínio GGDEF em roxo) causariam, ao mesmo tempo, a desestabilização da hélice S e do *core* hidrofóbico da forma ativada de PelD. A desestabilização da hélice S, segundo nosso modelo, promoveria a ativação de PelD, gerado um mutante super ativo. Todavia, como a desestabilização da hélice é acompanhada da desestabilização do *core* hidrofóbico da forma ativada, foi observada a diminuição da formação de biofilme dessas cepas, mostrando novamente a importância do *core* hidrofóbico de PelD e concordando com os dados de formação de biofilme dos mutantes do *loop* conector que também desestabilizavam essa forma ativada da proteína.

Por fim, sabe-se que a mutação R367A impede a ligação de c-di-GMP à PelD, gerando cepas incapazes de formar biofilme, como visto em nossos experimentos.[50-51] Segundo nosso modelo, a ligação de c-di-GMP à PelD seria necessária para promover a desestabilização da hélice S entre os domínios GAF e GGDEF. Uma vez que essa desestabilização foi gerada pelos mutantes da hélice S e dos domínios GAF e GGDEF, os duplos mutantes contendo mutações dessas regiões e R367A não teriam sua formação de biofilme afetada, possuindo um fenótipo igual ao dos mutantes simples. Contudo, como observado na figura 38, todos os duplo mutantes apresentaram-se incapazes de formar biofilme, indicando o c-di-GMP não só promove a desestabilização da hélice S, como também é essencial para que o estado ativado de PelD seja estabilizado.

4.3.3 Calorimetria diferencial de varredura

Para estudar a estabilidade do estado ativado de PelD promovido pela ligação do c-di-GMP, foram feitos experimentos DSC buscando avaliar a estabilidade térmica de PelD$^{176-455}$ baseada nas temperaturas médias de desenovelamento (T_m) da proteína na presença e ausência de c-di-GMP, como mostrado na figura 39. Os termogramas obtidos foram tratados como descrito no item 3.5.3, resultando em um ΔT_m de 3,18 ºC (T_m = 41,65 ± 0,06 ºC para a PelD$^{176-455}$ sem c-di-GMP e 44,83 ± 0,09 ºC para a proteína ligada ao nucleotídeo). Isso evidencia que a ligação do nucleotídeo estabiliza PelD, mantendo o *core* hidrofóbico interdomínio bem estruturado, sendo essa estabilização importante para o estado ativado de PelD, segundo o mecanismo proposto por nosso grupo.

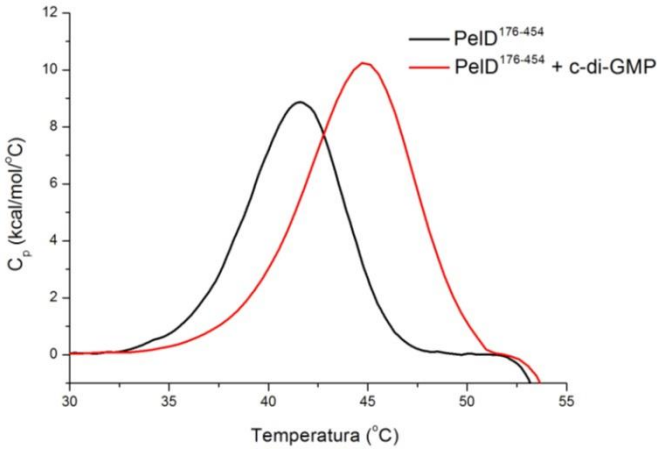

Figura 39 - Análise da influência de c-di-GMP na estabilidade térmica de PelD$^{176-455}$ realizada por DSC. A proteína mantém-se mais estável quando ligada à c-di-GMP, como mostrado na curva vermelha. A precipitação proteica inicia-se próximo a 53 °C, onde observa-se o início do pico exotérmico de precipitação.

Fonte: Elaborada pela autora.

5 Conclusões e perspectivas

O presente trabalho buscou estudar o mecanismo de ativação da formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* PA14. A síntese de polissacarídeos da matriz de biofilme de *P. aeruginosa* PA14 é feita pelo complexo proteico biossíntético de PEL, um polímero cuja estrutura e biossíntese são pouco descritas. Dessa forma, foram utilizados diversos ensaios bioquímicos e funcionais visando o estudo das interações proteicas e o mecanismo de ativação mediado por c-di-GMP desse complexo proteico.

Para isso, construções periplamáticas das proteínas Pel ($PelA^{47-948}$, $PelB^{35-1193}$, $PelC^{27-172}$ e $PelE^{88-329}$), PelF e PelG foram produzidas e caracterizadas oligomericamente. As amostras passaram por diversos testes interação buscando detectar a formação de complexos periplasmáticos, citoplasmáticos e de membrana interna, mas nenhuma interação pôde ser detectada. É provável que a formação do complexo Pel de membrana interna ocorra somente na presença de todas as proteínas de membrana interna ou na presença de outras proteínas não codificadas pelo operon *pel*, como sugerem nossos estudos de *pull-down*. Na tentativa de solucionar a primeira hipótese, CDSs das proteínas de membrana isoladas, das proteínas de membrana interna e de todo o complexo Pel foram clonadas a fim de realizar ensaios de interação dos complexos de membrana. Contudo, apesar dos inúmeros esforços para a produção de tais amostras, apenas PelG foi expressa e pôde ser purificada. Para avaliar as hipóteses de interação, clones das proteínas de membrana podem ser feitos em outros vetores de expressão para que, uma vez expressas, as proteínas com todos os domínios de membrana possam ser melhores investigadas.

Ensaios de *crosslinking* mostraram que $PelD^{176-455}$ monomérica em solução, enquanto que $PelD^{111-455}$ possui formação de dímeros dependente das concentrações de c-di-GMP, indicando que as hélices JM e S de PelD ($PelD^{111-176}$) desempenham um papel importante no controle de formação de dímeros. Além disso, a diminuição de dímeros na presença de elevadas concentrações de c-di-GMP corrobora com o modelo de ativação de PelD por meio da hélice S, análogo ao mecanismo da hélice S de $LapD^{57}$ proposto por nosso grupo.

A análise de quantificação de biofilme de cepas de PA14 contendo mutações pontuais em PelD revelou regiões importantes para a ativação da proteína, como o *core* hidrofóbico interdomínio da forma ativa de PelD e o N-terminal da hélice S. Juntamente com estudos de oligomerização dependente de c-di-GMP e predições de formação de *coiled-coil* de PelD,

esses dados reforçam e complementam o novo mecanismo de ativação de PelD proposto pelo grupo (figura 40), em que a ligação do c-di-GMP dimérico promove o afastamento da hélice S, gerando um rearranjo da hélice JM e dos domínios citoplasmáticos que permanecem ligados a uma molécula de c-di-GMP. Nesse rearranjo, GAF e GGDEF se aproximam formando um bolsão hidrofóbico estabilizado por uma molécula de c-di-GMP, enquanto a hélice JM se reorienta para a translocação de sinal para o domínio de membrana, quebrando o forte *coiled-coil* dessa região. Concomitantemente, a porção N-terminal da hélice S forma um *coiled-coil* pouco estável essencial na translocação de sinal e ativação do complexo Pel. Uma vez ativada, PelD pode ser capaz de recrutar outras proteínas Pel, como PelF e PelG, modificar conformações de outras proteínas membrana, ativando-as, ou recrutar proteínas que não fazem parte do complexo biossintético de PEL. Quando as concentrações de c-di-GMP intracelular diminuem, o nucleotídeo se desliga de PelD devido a sua baixa constante de afinidade pela proteína que volta a seu estado inibido.

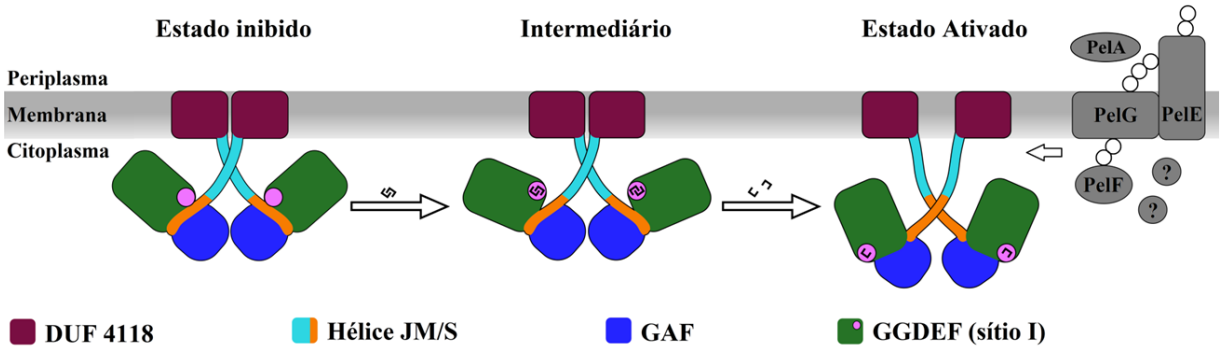

Figura 40 - Mecanismo de ativação de PelD proposto nesse trabalho. A ligação do dímero de c-di-GMP causa o deslocamento da hélice S provocando a formação de um *coiled-coil* fraco na região da hélice S exposta e a aproximação dos domínios citoplasmáticos, estabilizada por c-di-GMP. Essa mudança conformacional é translocada ao domínio transmembrânico pela hélice JM, ativando o complexo. Quando as concentrações celulares de c-di-GMP diminuem, o nucleotídeo se desliga de PelD, fazendo a proteína voltar ao seu estado inicial.
Fonte: Elaborada pela autora.

Por fim, utilizando uma combinação de ensaios bioquímicos e funcionais, o presente trabalho contribuiu significativamente no entendimento dos mecanismos moleculares que regem a formação de biofilme de *P. aeruginosa* PA14, desvendando o mecanismo de ativação de PelD mediado por c-di-GMP, uma etapa essencial na formação de biofilme dessa bactéria. O conhecimento dos mecanismos moleculares de ativação, síntese e translocação de PEL é fundamental para o entendimento da via de formação de biofilme desse importante patógeno humano, sendo esse o primeiro passo para o começo da busca de fármacos que possam impedir a formação do biofilme em *P. aeruginosa* PA14.

Referências

1 O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Review of Microbiology,** v. 54, p. 49-79, 2000. doi: 10.1146/annurev.micro.54.1.49.

2 PARSEK, M. R.; SINGH, P. K. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. **Annual Review of Microbiology,** v. 57, p. 677-701, 2003. doi: 10.1146/annurev.micro.57.030502.090720

3 COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.; LAPPIN-SCOTT, H. M. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology,** v. 49, p. 711-745, 1995. doi: 10.1146/annurev.mi.49.100195.003431.

4 ELIAS, S.; BANIN, E. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. **FEMS Microbiology Reviews,** v. 36, n. 5, p. 990-1004, 2012.

5 COLVIN, K. M.; GORDON, V. D.; MURAKAMI, K.; BORLEE, B. R.; WOZNIAK, D. J.; WONG, G. C.; PARSEK, M. R. The pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of Pseudomonas aeruginosa. **PLoS Pathogens,** v. 7, n. 1, p. e1001264, 2011.

6 MONROE, D. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. **PLoS Biology,** v. 5, n. 11, p. e307, 2007.

7 LAVERTY, G.; GORMAN, S. P.; GILMORE, B. F. Biomolecular mechanisms of pseudomonas aeruginosa and Escherichia coli biofilm formation. **Pathogens,** v. 3, n. 3, p. 596-632, 2014.

8 ROSS, P.; WEINHOUSE, H.; ALONI, Y.; MICHAELI, D.; WEINBERGER-OHANA, P.; MAYER, R.; BRAUN, S.; DE VROOM, E.; VAN DER MAREL, G. A.; VAN BOOM, J. H.; BENZIMAN, M. Regulation of cellulose synthesis in Acetobacter xylinum by cyclic diguanylic acid. **Nature,** v. 325, n. 6101, p. 279-81, 1987.

9 ZHANG, Z.; KIM, S.; GAFFNEY, B. L.; JONES, R. A. Polymorphism of the signaling molecule c-di-GMP. **Journal of the American Chemical Society,** v. 128, n. 21, p. 7015-7024, 2006.

10 GENTNER, M.; ALLAN, M. G.; ZAEHRINGER, F.; SCHIRMER, T.; GRZESIEK, S. Oligomer formation of the bacterial second messenger c-di-GMP: reaction rates and equilibrium constants indicate a monomeric state at physiological concentrations. **Journal of the American Chemical Society** v. 134, n. 2, p. 1019-1029, 2012.

11 STELITANO, V.; BRANDT, A.; FERNICOLA, S.; FRANCESCHINI, S.; GIARDINA, G.; PICA, A.; RINALDO, S.; SICA, F.; CUTRUZZOLA, F. Probing the activity of diguanylate cyclases and c-di-GMP phosphodiesterases in real-time by CD spectroscopy. **Nucleic Acids Research,** v. 41, n. 7, p. e79, 2013.

12 RÖMLING, U.; GOMELSKY, M.; GALPERIN, M. Y. C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. **Molecular Microbiology,** v. 57, n. 3, p. 629-39, 2005.

13 KRASTEVA, P. V.; GIGLIO, K. M.; SONDERMANN, H. Sensing the messenger: the diverse ways that bacteria signal through c-di-GMP. **Protein Science,** v. 21, n. 7, p. 929-48, 2012.

14 HENGGE, R. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. **Nature Reviews Microbiology,** v. 7, n. 4, p. 263-273, 2009.

15 RÖMLING, U.; GALPERIN, M. Y.; GOMELSKY, M. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. **Microbiology and Molecular Biology Reviews,** v. 77, n. 1, p. 1-52, 2013.

16 CHAN, C.; PAUL, R.; SAMORAY, D.; AMIOT, N. C.; GIESE, B.; JENAL, U.; SCHIRMER, T. Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America,** v. 101, n. 49, p. 17084-17089, 2004.

17 RYAN, R. P.; FOUHY, Y.; LUCEY, J. F.; CROSSMAN, L. C.; SPIRO, S.; HE, Y. W.; ZHANG, L. H.; HEEB, S.; CAMARA, M.; WILLIAMS, P.; DOW, J. M. Cell-cell signaling in Xanthomonas campestris involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America,** v. 103, n. 17, p. 6712-6717, 2006.

18 SUDARSAN, N.; LEE, E. R.; WEINBERG, Z.; MOY, R. H.; KIM, J. N.; LINK, K. H.; BREAKER, R. R. Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP. **Science,** v. 321, n. 5887, p. 411-413, 2008.

19 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, 2006.

20 BARAQUET, C.; MURAKAMI, K.; PARSEK, M. R.; HARWOOD, C. S. The FleQ protein from Pseudomonas aeruginosa functions as both a repressor and an activator to control gene expression from the pel operon promoter in response to c-di-GMP. **Nucleic Acids Research,** v. 40, n. 15, p. 7207-7218, 2012.

21 MILLS, E.; PULTZ, I. S.; KULASEKARA, H. D.; MILLER, S. I. The bacterial second messenger c-di-GMP: mechanisms of signalling. **Cell Microbiology,** v. 13, n. 8, p. 1122-1129, 2011.

22 FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology,** v. 8, n. 9, p. 623-633, 2010.

23 FONG, J. N.; YILDIZ, F. H. Biofilm Matrix Proteins. **Microbiology Spectrum,** v. 3, n. 2, 2015. doi:10.1128/microbiolspec.MB-0004-2014.

24 YILDIZ, F. H.; SCHOOLNIK, G. K. Vibrio cholerae O1 El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance,

and biofilm formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America,** v. 96, n. 7, p. 4028-4033, 1999.

25 LIANG, Z. X. The expanding roles of c-di-GMP in the biosynthesis of exopolysaccharides and secondary metabolites. **Natural Product Reports,** v. 32, n. 5, p. 663-683, 2015.

26 FRANKLIN, M. J.; NIVENS, D. E.; WEADGE, J. T.; HOWELL, P. L. Biosynthesis of the Pseudomonas aeruginosa Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl. **Frontiers in Microbiology,** v. 2, p. 167, 2011. doi: 10.3389/fmicb.2011.00167

27 MORGAN, J. L.; STRUMILLO, J.; ZIMMER, J. Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation. **Nature,** v. 493, n. 7431, p. 181-186, 2013

28 FANG, X.; AHMAD, I.; BLANKA, A.; SCHOTTKOWSKI, M.; CIMDINS, A.; GALPERIN, M. Y.; ROMLING, U.; GOMELSKY, M. GIL, a new c-di-GMP-binding protein domain involved in regulation of cellulose synthesis in enterobacteria. **Molecular Microbiology,** v. 93, n. 3, p. 439-452, 2014.

29 MORGAN, J. L.; MCNAMARA, J. T.; ZIMMER, J. Mechanism of activation of bacterial cellulose synthase by cyclic di-GMP. **Nature Structural & Molecular Biology,** v. 21, n. 5, p. 489-96, 2014.

30 TORTORA, G. J. F.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

31 HASSETT, D. J. Anaerobic production of alginate by Pseudomonas aeruginosa: alginate restricts diffusion of oxygen. **Journal of Bacteriology,** v. 178, n. 24, p. 7322-7325, 1996.

32 COMOLLI, J. C.; DONOHUE, T. J. Pseudomonas aeruginosa RoxR, a response regulator related to Rhodobacter sphaeroides PrrA, activates expression of the cyanide-insensitive terminal oxidase. **Molecular Microbiology,** v. 45, n. 3, p. 755-768, 2002.

33 FRIEDMAN, L.; KOLTER, R. Genes involved in matrix formation in Pseudomonas aeruginosa PA14 biofilms. **Molecular Microbiology,** v. 51, n. 3, p. 675-690, 2004.

34 MANN, E. E.; WOZNIAK, D. J. Pseudomonas biofilm matrix composition and niche biology. **FEMS Microbiology Reviews,** v. 36, n. 4, p. 893-916, 2012.

35 COLVIN, K. M.; IRIE, Y.; TART, C. S.; URBANO, R.; WHITNEY, J. C.; RYDER, C.; HOWELL, P. L.; WOZNIAK, D. J.; PARSEK, M. R. The Pel and Psl polysaccharides provide Pseudomonas aeruginosa structural redundancy within the biofilm matrix. **Environmental Microbiology,** v. 14, n. 8, p. 1913-1928, 2012.

36 MERIGHI, M.; LEE, V. T.; HYODO, M.; HAYAKAWA, Y.; LORY, S. The second messenger bis-(3'-5')-cyclic-GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in Pseudomonas aeruginosa. **Molecular Microbiology,** v. 65, n. 4, p. 876-895, 2007.

37 OGLESBY, L. L.; JAIN, S.; OHMAN, D. E. Membrane topology and roles of Pseudomonas aeruginosa Alg8 and Alg44 in alginate polymerization. **Microbiology,** v. 154, n. pt 6, p. 1605-1615, 2008.

38 WHITNEY, J. C.; WHITFIELD, G. B.; MARMONT, L. S.; YIP, P.; NECULAI, A. M.; LOBSANOV, Y. D.; ROBINSON, H.; OHMAN, D. E.; HOWELL, P. L. Dimeric c-di-GMP is required for post-translational regulation of alginate production in Pseudomonas aeruginosa. **Journal of Biological Chemistry,** v. 290, n. 20, p. 12451-12462, 2015.

39 KEISKI, C. L.; HARWICH, M.; JAIN, S.; NECULAI, A. M.; YIP, P.; ROBINSON, H.; WHITNEY, J. C.; RILEY, L.; BURROWS, L. L.; OHMAN, D. E.; HOWELL, P. L. AlgK is a TPR-containing protein and the periplasmic component of a novel exopolysaccharide secretin. **Structure,** v. 18, n. 2, p. 265-73, 2010.

40 JACKSON, K. D.; STARKEY, M.; KREMER, S.; PARSEK, M. R.; WOZNIAK, D. J. Identification of psl, a locus encoding a potential exopolysaccharide that is essential for Pseudomonas aeruginosa PAO1 biofilm formation. **Journal of Bacteriology,** v. 186, n. 14, p. 4466-4475, 2004.

41 HICKMAN, J. W.; HARWOOD, C. S. Identification of FleQ from Pseudomonas aeruginosa as a c-di-GMP-responsive transcription factor. **Molecular Microbiology,** v. 69, n. 2, p. 376-89, 2008.

42 STEINER, S.; LORI, C.; BOEHM, A.; JENAL, U. Allosteric activation of exopolysaccharide synthesis through cyclic di-GMP-stimulated protein-protein interaction. **EMBO Journal,** v. 32, n. 3, p. 354-368, 2013.

43 LARUE, K.; KIMBER, M. S.; FORD, R.; WHITFIELD, C. Biochemical and structural analysis of bacterial O-antigen chain length regulator proteins reveals a conserved quaternary structure. **Journal of Biological Chemistry,** v. 284, n. 11, p. 7395-403, 2009.

44 JENNINGS, L. K.; STOREK, K. M.; LEDVINA, H. E.; COULON, C., MARMONT, L. S.; SADOVSKAYA, I.; SECOR, P. R.; TSENG, B. S.; SCIAN, M.; FILLOUX, A.; WOZNIAK, D. J.; HOWELL, P. L.; PARSEK, M. R. Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the Pseudomonas aeruginosa biofilm matrix. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America,** v. 112, n. 36, p. 11353-11358, 2015.

45 GHAFOOR, A.; JORDENS, Z.; REHM, B. H. Role of PelF in pel polysaccharide biosynthesis in Pseudomonas aeruginosa. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 79, n. 9, p. 2968-2978, 2013.

46 VASSEUR, P.; SOSCIA, C.; VOULHOUX, R.; FILLOUX, A. PelC is a Pseudomonas aeruginosa outer membrane lipoprotein of the OMA family of proteins involved in exopolysaccharide transport. **Biochimie,** v. 89, n. 8, p. 903-15, 2007.

47 WANG, C.; WESENER, S. R.; ZHANG, H.; CHENG, Y. Q. An FAD-dependent pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase is involved in disulfide bond formation in FK228 anticancer depsipeptide. **Chemistry & Biology,** v. 16, n. 6, p. 585-593, 2009.

48 VASSEUR, P.; VALLET-GELY, I.; SOSCIA, C.; GENIN, S., FILLOUX, A. The pel genes of the Pseudomonas aeruginosa PAK strain are involved at early and late stages of biofilm formation. **Microbiology,** v. 151, n. Pt 3, p. 985-97, 2005.

49 LI, Z.; CHEN, J. H.; HAO, Y.; NAIR, S. K. Structures of the PelD cyclic diguanylate effector involved in pellicle formation in Pseudomonas aeruginosa PAO1. **Journal of Biological Chemistry,** v. 287, n. 36, p. 30191-204, 2012.

50 WHITNEY, J. C.; COLVIN, K. M.; MARMONT, L. S.; ROBINSON, H.; PARSEK, M. R.; HOWELL, P. L. Structure of the cytoplasmic region of PelD, a degenerate diguanylate cyclase receptor that regulates exopolysaccharide production in Pseudomonas aeruginosa. **Journal of Biological Chemistry,** v. 287, n. 28, p. 23582-93, 2012.

51 LEE, V. T.; MATEWISH, J. M.; KESSLER, J. L.; HYODO, M.; HAYAKAWA, Y.; LORY, S. A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. **Molecular Microbiology,** v. 65, n. 6, p. 1474-84, 2007.

52 HVORUP, R. N.; WINNEN, B.; CHANG, A. B.; JIANG, Y.; ZHOU, X. F.; SAIER, M. H. The multidrug/oligosaccharidyl-lipid/polysaccharide (MOP) exporter superfamily. **European Journal of Biochemistry,** v. 270, n. 5, p. 799-813, 2003.

53 ISLAM, S. T.; LAM, J. S. Synthesis of bacterial polysaccharides via the Wzx/Wzy-dependent pathway. **Canadian Journal of Microbiology,** v. 60, n. 11, p. 697-716, 2014.
54 ISLAM, S. T.; LAM, J. S. Wzx flippase-mediated membrane translocation of sugar polymer precursors in bacteria. **Environmental Microbiology,** v. 15, n. 4, p. 1001-15, 2013.

55 COLVIN, K. M.; ALNABELSEYA, N.; BAKER, P.; WHITNEY, J. C.; HOWELL, P. L.; PARSEK, M. R. PelA deacetylase activity is required for Pel polysaccharide synthesis in Pseudomonas aeruginosa. **Journal of Bacteriology,** v. 195, n. 10, p. 2329-39, 2013.

56 SILVA, S. S. **Estudos estruturais da proteína PelD de *Pseudomonas aeruginosa*:** um receptor de c-di-GMP responsável pela produção de exopolissacarídeos e formação de biofilmes. 2013. 127p. Dissertação (Mestrado em Física Biomolecular) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

57 NAVARRO, M. V.; NEWELL, P. D.; KRASTEVA, P. V.; CHATTERJEE, D.; MADDEN, D. R.; O'TOOLE, G. A.; SONDERMANN, H. Structural basis for c-di-GMP-mediated inside-out signaling controlling periplasmic proteolysis. **PLoS Biology,** v. 9, n. 2, p. e1000588, 2011.

58 LIBERATI, N. T.; URBACH, J. M.; MIYATA, S.; LEE, D. G.; DRENKARD, E.; WU, G.; VILLANUEVA, J.; WEI, T.; AUSUBEL, F. M. An ordered, nonredundant library of Pseudomonas aeruginosa strain PA14 transposon insertion mutants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America,** v. 103, n. 8, p. 2833-2838, 2006.

59 PA14 transposon insertion mutant library. Massachusetts 2006. Disponível em: < http://ausubellab.mgh.harvard.edu/cgi-bin/pa14/home.cgi >. Acesso em: 05 nov. 2015.

60 FINN, R. D.; BATEMAN, A.; CLEMENTS, J.; COGGILL, P.; EBERHARDT, R. Y.; EDDY, S. R.; HEGER, A.; HETHERINGTON, K.; HOLM, L.; MISTRY, J.; SONNHAMMER, E. L.; TATE, J.; PUNTA, M. Pfam: the protein families database. **Nucleic Acids Research,** v. 42, n. D 1, p. D222-D230, 2014.

61 JONES, D. T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. **Journal of Molecular Biology,** v. 292, n. 2, p. 195-202, 1999.

62 BUCHAN, D. W.; MINNECI, F.; NUGENT, T. C.; BRYSON, K.; JONES, D. T. Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. **Nucleic Acids Research,** v. 41, W1, p. W349-57, 2013. doi: 10.1093/nar/gkt381.

63 PETERSEN, T. N.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G.; NIELSEN, H l. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods,** v. 8, n. 10, p. 785-786, 2011

64 KROGH, A.; LARSSON, B.; VON HEIJNE, G.; SONNHAMMER, E. L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. **Journal of Molecular Biology,** v. 305, n. 3, p. 567-580, 2001.

65 LOW, H. H.; GUBELLINI, F.; RIVERA-CALZADA, A.; BRAUN, N.; CONNERY, S.; DUJEANCOURT, A.; LU, F.; REDZEJ, A.; FRONZES, R.; ORLOVA, E. V.; WAKSMAN, G. Structure of a type IV secretion system. **Nature,** v. 508, n. 7497, p. 550-553, 2014.

66 GOLDSCHMIDT, L.; COOPER, D. R.; DEREWENDA, Z. S.; EISENBERG, D. Toward rational protein crystallization: A Web server for the design of crystallizable protein variants. **Protein Science,** v. 16, n. 8, p. 1569-1576, 2007.

67 ERICSSON, U. B.; HALLBERG, B. M.; DETITTA, G. T.; DEKKER, N.; NORDLUND, P. Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. **Analytical Biochemistry,** v. 357, n. 2, p. 289-98, 2006.

68 SVERGUN, D. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. **Journal of Applied Crystallography,** v. 25, p. 495-503, 1992.

69 GUINIER, A.; FOURNET, G. **Small angle scattering of X-rays**. New York: Wiley 1955.

70 PETOUKHOV, M. V.; SVERGUN, D. I. Joint use of small-angle X-ray and neutron scattering to study biological macromolecules in solution. **European Biophysics Journal,** v. 35, n. 7, p. 567-576, 2006.

71 MYLONAS, F.; SVERGUN, D. I. Accuracy of molecular mass determination of proteins in solution by small-angle X-ray scattering. **Journal of Applied Crystallography,** v. 40, p. s245-s249, 2007.

72 ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research,** v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

73 KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic Acids Research,** v. 28, n. 1, p. 27-30, 2000.

74 KANEHISA, M.; GOTO, S.; SATO, Y.; KAWASHIMA, M.; FURUMICHI, M.; TANABE, M. Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. **Nucleic Acids Research,** v. 42, p. D199-205, 2014. doi: 10.1093/nar/gkt1076.

75 O'TOOLE, G. A.; KOLTER, R. Initiation of biofilm formation in Pseudomonas fluorescens WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. **Molecular Microbiology,** v. 28, n. 3, p. 449-461, 1998.

76 WANG, D. N.; SAFFERLING, M.; LEMIEUX, M. J.; GRIFFITH, H.; CHEN, Y.; LI, X. D. Practical aspects of overexpressing bacterial secondary membrane transporters for structural studies. **Biochimica et Biophysica Acta,** v. 1610, n. 1, p. 23-36, 2003.

77 GEERLOF, A.; BROWN, J.; COUTARD, B.; EGLOFF, M. P.; ENGUITA, F. J.; FOGG, M. J.; GILBERT, R. J.; GROVES, M. R.; HAOUZ, A.; NETTLESHIP, J. E.; NORDLUND, P.; OWENS, R. J.; RUFF, M.; SAINSBURY, S.; SVERGUN, D. I. et al. The impact of protein characterization in structural proteomics. **Acta Crystallographica D,** v. 62, pt 10, p. 1125-1136, 2006.

78 ANGUS-HILL, M. L.; DUTNALL, R. N.; TAFROV, S. T.; STERNGLANZ, R.; RAMAKRISHNAN, V. Crystal structure of the histone acetyltransferase Hpa2: A tetrameric member of the Gcn5-related N-acetyltransferase superfamily. **Journal of Molecular Biology,** v. 294, n. 5, p. 1311-1325, 1999.