UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

LEONARDO DELPHITO

**Estudos bioquímicos e biofísicos das proteínas PA0575 e PA0285,
componentes das vias de sinalização do c-di-GMP em *Pseudomonas*
aeruginosa,**

São Carlos
2020

LEONARDO DELPHITO

**Estudos bioquímicos e biofísicos das proteínas PA0575 e PA0285,
componentes das vias de sinalização do c-di-GMP em *Pseudomonas
aeruginosa*,**

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
Mestre 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
2020

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.

Delphito, Leonardo

Estudos bioquímicos e biofísicos das proteínas PA0575 e PA0285, componentes das vias de sinalização do c-di-GMP em *Pseudomonas aeruginosa*. / Leonardo Delphito; orientador Marcos Navarro - versão corrigida -- São Carlos, 2020.

85 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2020.

1. c-di-GMP. 2. Interação de proteínas. 3. GGDEF-EAL. 4. *Pseudomonas aeruginosa*. 5. Sinalização Intracelular. I. Navarro, Marcos, orient. II. Título.

*Aos meus avós, Domingas Faxina Delphito, Francisca
Angelina Olivi dos Santos e Sidney dos Santos.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Valentino e Patrícia, irmãs, Thaís e Carol e toda minha família.

Ao meu orientador prof. Marcos, pela oportunidade e muitos ensinamentos.

Aos técnicos, Andressa, Bel, Fernando, Humberto e Rafa, sempre muito solícitos e competentes.

Aos amigos que especialmente contribuíram para a realização desse trabalho, Diego Sastre, Rapha Meneghello, Ton Silva e Wesley Generoso.

Aos amigos, Adriano Fernandes, Carmen Giselle, Dani Castro, Déborah Mendonça, Diego Leonardo, Diego Sastre, Diogo Maciel, Edson Comparetti, Gabriel Brognara, Gabrielle Costa, Higor Vinicius, Ítalo Cavini, Jak Ferreira, Jhon Santillan, Ketllyn Zagato, Léo Almeida, Lulu Zuvanov, Marcela Nunes, Marina Gabriel, Nai Torres, Nathalia Martinez, Paty Kumagai, Rafa Marques, Raissa Gutierrez, Rapha Meneghello, Sinara Brasil, Ton Silva, Wesley Generoso, pela companhia, ajuda, conselhos.

Aos amigos da Republica do Léo, Léo Mendes, Gui Souza, Mat Ribeiro, Vic Marino.

À minha namorada Isabela, por ser incrível.

Aos funcionários do Serviço de Pós-graduação, pela atuação rápida e exemplar.

Aos funcionários da Biblioteca do IFSC, pela atuação rápida e exemplar.

A todos os funcionários do Instituto de Física de São Carlos - USP, que em muito contribuem para a excelência dessa instituição.

A todos que contribuíram para a realização desse trabalho de mestrado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil — e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos.

Albert Einstein

RESUMO

DELPHITO, L. **Estudos bioquímicos e biofísicos das proteínas PA0575 e PA0285, componentes das vias de sinalização do c-di-GMP em *Pseudomonas aeruginosa***. 2020. 85p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020

O segundo mensageiro c-di-GMP orienta importantes respostas fisiológicas em bactérias como progressão do ciclo celular, expressão de fatores de virulência, formação de biofilme, entre outros. A sinalização geral desse segundo mensageiro tem início dado estímulos externos e/ou internos e envolve proteínas que sintetizam o c-di-GMP (DGC, diguanilato ciclases, possuem o domínio GGDEF) e proteínas que o degradam (PDE, fosfodiesterases, possuem o domínio EAL). Por sua vez, o c-di-GMP atua sobre diversos alvos moleculares e resulta em respostas fenotípicas específicas. As vias de sinalização do c-di-GMP envolvem uma multiplicidade de DGCs, PDEs e efetores que são acionados especificamente e seletivamente para culminar em uma resposta fisiológica específica. Ainda está em estudo como essas vias não interferem entre si, entretanto, alguns mecanismos já foram propostos, como o confinamento do sinal perto do efector, efetores com diferentes afinidades ao c-di-GMP, interação proteína-proteína, que pode envolver a formação de redes hierárquicas de proteínas. Em um estudo de interação proteína-proteína por duplo híbrido com todas as DGCs e PDEs de *Pseudomonas aeruginosa*, nosso grupo revelou um intrincado mapa de interação entre proteínas, incluindo o par PA0575-PA0285. Essas duas proteínas são transmembranares e possuem uma arquitetura na porção citoplasmática composta por PAS-GGDEF-EAL. Com o objetivo de confirmar a interação detectada *in vivo* entre PA0575 e PA0285 (realizada com construções citosólicas inteiras) e compreender melhor o funcionamento dessas proteínas, diversas construções de PA0575 e PA0285 foram expressas em *E. coli*, e purificadas por cromatografias de afinidade e de exclusão molecular. Em ensaios de *crosslinking* químico e termoforese em microescala foi possível confirmar e mapear a interação direta entre os domínios GGDEF de PA0575 e EAL de PA0285, cuja constante de dissociação (K_d) é aproximadamente 40 μ M. Análises do estado de oligomerização por SEC-MALS com as construções de PA0575 e com o EAL de PA0285 mostraram que os domínios GGDEF e EAL isolados, e GGDEF-EAL de PA0575 são majoritariamente monoméricos em solução, o mesmo foi observado para o EAL de PA0285. Enquanto as construções PAS-GGDEF e PAS-GGDEF-EAL de PA0575 se apresentaram majoritariamente diméricas, de acordo com a necessidade de dimerização via N-terminal do

GGDEF. Observado nos ensaios de *crosslinking* químico a construção inteira citosólica de PA0285 mostrou muito baixa formação de dímeros. Para verificar as atividades DGC e PDE de PA0575 e PA0285, foram realizados ensaios para detecção dos produtos reacionais por HPLC. Em concordância com os resultados de estado oligomérico, as construções diméricas PAS-GGDEF e PAS-GGDEF-EAL de PA0575 apresentaram atividade DGC, decorrente da necessidade de dimerização para atividade, e da dimerização dependente do N-terminal dos GGDEF. Todas as construções de PA0575 e PA0285 contendo o domínio EAL apresentaram atividade PDE, uma vez que o c-di-GMP pode induzir a dimerização do EAL, estado necessário para a atividade PDE. Os resultados de interação entre PA0575 e PA0285, a atividade DGC de PA0575 e a atividade PDE de PA0285 apresentados nesse trabalho são inéditos. O estudo aqui apresentado contribui para um melhor entendimento das proteínas com GGDEF-EAL, integrantes das vias de sinalização do importante mensageiro intracelular bacteriano c-di-GMP.

Palavras-chave: c-di-GMP. Interação de proteínas. GGDEF-EAL. *Pseudomonas aeruginosa*.

ABSTRACT

DELPHITO, L. **Biochemical and biophysical studies of proteins PA0575 and PA0285, components of c-di-GMP signaling pathways in *Pseudomonas aeruginosa*.** 2020. 85p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020

The second messenger c-di-GMP guides important physiological responses in bacteria such as cell cycle progression, expression of virulence factors and biofilm formation, among others. The general signaling of this second messenger initiates from external and/or internal stimuli and involves proteins that synthesize c-di-GMP (DGC, diguanylate cyclases, which contains the GGDEF domain) and proteins that degrade it (PDE, phosphodiesterases, which contains the EAL domain). The c-di-GMP acts on several molecular targets and results in specific phenotypic responses. The c-di-GMP signaling pathways involve a multiplicity of DGCs, PDEs and effectors that are specifically and selectively triggered to culminate in a specific physiological response. It is still being studied how these pathways do not interfere with each other, however, some mechanisms have already been proposed, such as signal confinement close to the effector, effectors with different affinities to c-di-GMP, protein-protein interaction, which may involve the formation of hierarchical protein networks. In a study of protein-protein interaction by two-hybrid system with all DGCs and PDEs of *Pseudomonas aeruginosa*, our group revealed an intricate map of interaction protein-protein, including the PA0575-PA0285 pair. These two proteins are transmembrane and have an architecture in the cytoplasmic portion with of PAS-GGDEF-EAL. In order to confirm the interaction detected *in vivo* between PA0575 and PA0285 (performed with whole cytosolic constructions) and to better understand the functioning of these proteins, several constructs of PA0575 and PA0285 were expressed in *E. coli* and purified by affinity and size-exclusion chromatographies. In chemical crosslinking assays and microscale thermophoresis, it was possible to confirm and map the direct interaction between the GGDEF domains of PA0575 and EAL of PA0285, with dissociation constant (Kd) of approximately 40 μ M. Analysis of the oligomerization states by SEC-MALS with the PA0575 constructs and with the PA0285 EAL showed that the isolated GGDEF and EAL domains, and GGDEF-EAL of the PA0575 are mostly monomeric in solution, the same was observed for PA0285-EAL. While the constructions PAS-GGDEF and PAS-GGDEF-EAL of PA0575 were mostly dimeric, according to the need for dimerization via N-terminal GGDEF domains. Observed in chemical crosslinking assays the entire cytosolic construction of PA0285

showed very low formation of dimers. To verify the DGC and PDE activities of PA0575 and PA0285, analyzes of the product of the enzymatic reaction by hplc were performed. In agreement with the results of oligomeric state, the dimeric constructions PAS-GGDEF and PAS-GGDEF-EAL of PA0575 displayed DGC activity, due to the need for dimerization for activity and the N-terminal dependent dimerization of the GGDEF domains. All PA0575 and PA0285 constructs containing the EAL domain displayed PDE activity, since c-di-GMP can induce EAL dimerization, a necessary condition for PDE activity. The results of interaction between PA0575 and PA0285, DGC activity of PA0575 and the PDE activity of PA0285 presented in this study are unprecedented. This study contributes to a better understanding of proteins with GGDEF-EAL, which are part of the signaling pathways of the important bacterial intracellular messenger c-di-GMP.

Keywords: c-di-GMP. Protein-protein interaction. GGDEF-EAL. *Pseudomonas aeruginosa*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 -	Formação do biofilme bacteriano	22
Figura 02 -	Princípios da sinalização por c-di-GMP	23
Figura 03 -	O sítio ativo do domínio GGDEF	24
Figura 04 -	Dímero DgcZ e catálise	25
Figura 05 -	Domínio EAL, sítio ativo e dimerização	26
Figura 06 -	Domínios reguladores de proteínas contendo GGDEF e/ou EAL	27
Figura 07 -	Domínio sensor PAS.....	28
Figura 08 -	Estruturas de alguns efetores do c-di-GMP	30
Figura 09 -	Algumas respostas fisiológicas mediadas por c-di-GMP na transição vida livre-biofilme	33
Figura 10 -	Modelo proposto para PA0575 de ativação da atividade PDE dependente de GTP	35
Figura 11 -	Proteínas com PAS-GGDEF-EAL de <i>P. aeruginosa</i>	36
Figura 12 -	Exemplos de sinalização local	38
Figura 13 -	Mapa da rede de interação entre proteínas das vias do c-di-GMP em <i>E. coli</i> .	39
Figura 14 -	Mapa da rede de interação entre proteínas das vias do c-di-GMP em <i>P. aeruginosa</i>	40
Figura 15 -	Etapas de algumas técnicas de clonagem utilizadas	44
Figura 16 -	Proteínas em estudo, as construções planejadas, domínios e limites.....	53
Figura 17 -	Amplificação por PCR e verificação das etapas da clonagem.....	55
Figura 18 -	Superexpressão de algumas construções observadas em gel 12% de SDS-PAGE	56
Figura 19 -	Verificação nas etapas de purificação.....	58
Figura 20 -	Resultados de <i>crosslinking</i> de PA0575-PPPPGE contra PA0285-E e PA0285-G	60
Figura 21 -	Resultados de <i>crosslinking</i> de PA0285-E contra PA0575-G e PA0575-PPPPG.....	61
Figura 22 -	Resultados de <i>crosslinking</i> de PA0285-E contra PA0575-G e PA0575-E; PA0285-G contra PA0575-G e PA0575-E	62
Figura 23 -	Resultados de <i>crosslinking</i> de PA0575-PPPPGE contra PA0285-PPGE e PA0285-PPG; PA0285-PPGE contra PA0575-E.....	63

Figura 24 -	Resultados do MST de PA0575-G contra PA0285-E	64
Figura 25 -	Resultados do MST de PA0575-PPPPGE contra PA0285-E.....	65
Figura 26 -	Sobreposição das curvas de ligação de PA0575-G contra PA0285-E, e PA0575-PPPPGE contra PA0285-E	66
Figura 27 -	Cromatogramas de SEC-MALS de construções de PA0575 e PA0285-E.....	68
Figura 28 -	Análise dos produtos da atividade de PA0575-PPPPGE observado em HPLC de fase reversa	71
Figura 29 -	Análise dos produtos da atividade de PA0575-E, PA0575-G e PA0575-PPPPG observado em HPLC de fase reversa.....	72
Figura 30 -	Análise dos produtos da atividade de PA0575-GE observado em HPLC de fase reversa	73
Figura 31 -	Análise dos produtos da atividade de PA0285-PPGE observado em HPLC de fase reversa	74
Figura 32 -	Análise dos produtos da atividade de PA0285-E, PA0285-G e PA0285-PPG observada em HPLC de fase reversa	75
Figura 33 -	Análise dos produtos da atividade de PA0285-GE observado em HPLC de fase reversa	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 -	Parâmetros físico-químicos das construções calculados utilizado o Protparam	54
Tabela 02 -	Etapas realizadas e rendimentos na produção das construções	57
Tabela 03 -	Massas calculadas de PA0575 e PA0285-E por SEC-MALS	69
Tabela 04 -	<i>Primers</i> utilizados para amplificação e clonagem	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLUF	<i>Blue-Light Using FAD</i> , domínio proteico de ligação ao FAD
BSA	albumina de soro bovino
c-di-GMP	guanosina monofosfato (3' - 5') cíclica dimérica
CHASE	<i>Cyclases/Histidine kinases Associated Sensory Extracellular</i> , domínio proteico sensor periplasmático ou extracelular
DGC	diguanylate ciclase, proteína que sintetiza c-di-GMP ou atividade de síntese de c-di-GMP
dRI	variação diferencial do índice de refração
DSS	<i>disuccinimidyl suberate</i> , utilizado como agente de <i>crosslinking</i> químico
EAL	domínio proteico conservado em determinadas fosfodiesterases
EGS	<i>ethylene glycol bis (succinimidyl succinate)</i> , utilizado como agente de <i>crosslinking</i> químico
EPS	substâncias poliméricas extracelulares
FAD	dinucleótido de flavina-adenina
FMN	mononucleótido de flavina
GAF	domínio proteico sensor de ligação a molécula pequena
GGDEF	domínio proteico conservado em diguanylate ciclases
GTP	trifosfato de guanosina
HAMP	acrônimo (domínio presente em <i>Histidine kinases</i> , <i>Adenyl cyclases</i> , <i>Methyl-accepting proteins and Phosphatases</i>), domínio proteico sensor
HD-GYP	domínio conservado em determinadas fosfoesterases
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
IPTG	isopropyl β - d-1-thiogalactopyranoside, análogo de lactose
K _d	constante de dissociação
MST	termoforese em microescala
PAS	domínio proteico sensor ou enovelamento sensor
pb	pares de base, faz referência aos nucleotídeos de DNA.
PCR	reação em cadeia da polimerase
PDB	banco de dados de estruturas de proteínas ou arquivo com coordenadas atômicas

PDE	fosfodiesterase, proteína que degrada o c-di-GMP ou atividade de degradação de c-di-GMP
Pfam	base de dados de famílias de proteínas
pGpG	5'-fosfoguanilil-(3'-5')-guanosina
ProtParam	ferramenta para cálculo de parâmetros físico-químicos
PSIPRED	método de predição de estrutura secundária de proteínas
REC	domínio proteico sensor
RP-HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
SBP	proteína de ligação a soluto
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SEC	cromatografia líquida por exclusão por tamanho
SEC-MALS	cromatografia líquida por exclusão de tamanho acoplada ao espalhamento de luz em múltiplos ângulos
SUMO	proteína SUMO
TMHMM	método de predição de hélices transmembranas baseado em Modelo Oculto de Markov
VFT	domínio de ligação a ligante “venus fly trap”

AMINOÁCIDOS

A	alanina
C	cisteína
D	ácido aspártico
E	ácido glutâmico
F	fenilalanina
G	glicina
H	histidina
I	isoleucina
K	lisina
L	leucina
M	metionina
N	asparagina
P	prolina
Q	glutamina
R	arginina
S	serina
T	treonina
V	valina
W	triptofano
X	qualquer aminoácido
Y	tirosina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	Biofilme bacteriano	21
1.2	O segundo mensageiro c-di-GMP	22
1.3	Síntese de c-di-GMP	23
1.4	Degradação de c-di-GMP	25
1.5	Domínios sensores/reguladores	27
1.6	Efetores do c-di-GMP	29
1.7	Respostas fisiológicas da sinalização por c-di-GMP	31
1.8	Proteínas com GGDEF-EAL	33
1.9	Interações entre proteínas das vias de sinalização por c-di-GMP	36
2	OBJETIVOS	41
3	MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1	Desenho das construções	43
3.2	Clonagem	43
3.3	Expressão e Lise	46
3.4	Purificação de proteínas	46
3.5	Buscas por condições de cristalização	47
3.6	Estudos de interação por <i>crosslinking</i> químico	48
3.7	Estudos de interação por termoforese em microescala (MST)	48
3.8	Análise de oligomerização por SEC acoplada a espalhamento de luz (SEC-MALS)	49
3.9	Produção e purificação de c-di-GMP	49
3.10	Análise de atividade enzimática por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	49
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1	Desenho das construções	51
4.2	Clonagem	54
4.3	Purificação de proteínas	55
4.4	Buscas por condições de cristalização de construções de PA0575 e PA0285	59
4.5	Estudos de interação de PA0575 e PA0285 por <i>crosslinking</i> químico	59
4.6	Estudos de interação de PA0575 e PA0285 por MST	64
4.7	Análise de oligomerização de PA0575 e PA0285 por SEC-MALS	67
4.8	Análise de atividade enzimática de PA0575 e PA0285 por HPLC	69
5	CONCLUSÕES	77
	REFERÊNCIAS	79

APÊNDICE A	85
-------------------------	-----------

1 INTRODUÇÃO

1.1 Biofilme bacteriano

Biofilme bacteriano é definido como um agregado de bactérias em que as células são incorporadas em uma matriz autoproduzida de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) aderidas umas às outras e geralmente a uma superfície.¹ As EPS imobilizam as células do biofilme e as mantêm próximas permitindo interações intensas, incluindo comunicação célula a célula e a formação de um micro-consórcio sinérgico.²

As substâncias poliméricas extracelulares são principalmente polissacarídeos, lipídeos, proteínas e DNA extracelular e compõem a chamada matriz do biofilme, responsável pela arquitetura e coesão do biofilme, e pela adesão a superfícies. A matriz protege as células contra desidratação, ação da radiação ultravioleta, efeitos de antibióticos e do sistema imunológico do hospedeiro; e pode atuar facilitando a transferência horizontal de genes, na reciclagem de nutrientes, captação de recursos do meio e como um sistema digestivo externo pela retenção de enzimas.²

A formação do biofilme ocorre nos seguintes estágios: adesão inicial, adesão reversível do microrganismo a uma superfície; formação inicial do biofilme, a adesão torna-se irreversível e os microrganismos começam a produção de EPS; maturação do biofilme, o desenvolvimento de estruturas mais complexas decorrentes do crescimento da matriz; e dispersão, os microrganismos deixam o biofilme e retornam ao estilo de vida livre (figura 1).³⁻⁵

A transição entre os estilos de vida, na forma livre e biofilme, é dependente de vários fatores como condições ambientais (como disponibilidade de alimento), sinalização intracelular e intercelular (*quorum sensing*, segundo mensageiros, sistema de dois componentes), expressão de genes (formação/remoção do flagelo, produção de EPS).⁵ O estilo de vida em biofilme ocorre em diversos ambientes abióticos como solo, subsolo, rios, sedimento marinho, subsolo marinho e inclusive com participação em ciclos biogeoquímicos.⁶⁻⁸ Também estão presentes nos ambientes bióticos existindo em plantas (folhas, raízes), em animais, como o organismo humano (dentes, intestino), entre outros.⁷

A possibilidade dos biofilmes ocorrerem no organismo humano confere ao biofilme relevância médica, pois é estimado que 80% das doenças bacterianas em humanos são infecções biofilme-associadas.⁹ Essas infecções possuem características decorrentes do biofilme, tais

como: proteção física do sistema imune e de antibióticos,¹⁰ adesão para formar sítios de infecção, coordenação para expressão simultânea de fatores de virulência, entre outras.¹¹ Atualmente há pesquisas para o tratamento das infecções biofilme-associadas que procuram interferir na estrutura do biofilme, principalmente com agentes de dispersão.^{4,11}

Figura 1 - Formação do biofilme bacteriano. (a) etapas na formação de biofilme: adesão inicial, formação inicial de biofilme (microcolônias), maturação do biofilme, dispersão. (b) micrografia do desenvolvimento do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* em superfície de vidro.

Fonte: Adaptada de MADIGAN; MARTINKO; BENDER.¹²

1.2 O segundo mensageiro c-di-GMP

O dinucleotídeo cíclico c-di-GMP (guanosina monofosfato (3'-5') cíclica dimérica) atua como segundo mensageiro em bactérias controlando importantes processos como a alternância entre os estilos de vida (biofilme e na forma livre),¹³⁻¹⁴ progressão do ciclo celular,¹⁵ virulência,¹⁶ entre outros. Foi descoberto em 1987 por Benzimam e colaboradores como um ativador alostérico da celulose sintase de *Gluconacetobacter xylinus* em estudos sobre a biossíntese de celulose.¹⁷⁻¹⁸

Os princípios da sinalização desse segundo mensageiro são observados na Figura 2. Dado sinais ambientais e/ou celulares ocorre a síntese do c-di-GMP a partir de duas moléculas de GTP pela ação de diguanilato ciclases (DGCs), que possuem o domínio GGDEF; ou a

degradação do dinucleotídeo, que é realizada por fosfodiesterases (PDEs), com domínio EAL ou HD-GYP. Uma vez sintetizado ele atua alostericamente sobre moléculas efetoras (proteínas, riboswitches), que agem sobre alvos (DNA, outras proteínas, estruturas celulares complexas como corpo basal flagelar) que conduzirão a uma resposta fenotípica, como por exemplo: regulação do flagelo, produção de exopolímeros da matriz do biofilme, expressão de fatores de virulência.^{14,19}

Figura 2 - Princípios da sinalização por c-di-GMP. A partir de um sinal ocorre a síntese ou degradação do c-di-GMP por enzimas; após sintetizado ele pode interagir com uma molécula efetora que por sua vez atua sobre um alvo, conduzindo a uma resposta fenotípica.

Fonte: Adaptada de JENAL; REINDERS; LORI..¹⁹

1.3 Síntese de c-di-GMP

A síntese do c-di-GMP ocorre catalisada por um dímero DGC através da ação cooperativa de dois domínios GGDEF, cada um com uma molécula de GTP ligada, que se organizam de maneira antiparalela para permitir a condensação no dinucleotídeo cíclico com formação de ligações fosfodiéster.¹⁹⁻²⁰ O enovelamento característico desse domínio consiste em cadeias $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ com as duas cadeias β centrais antiparalelas conectadas por um grampo β (β -hairpin) com o motivo GGDEF.²⁰ O sítio ativo é caracterizado pelo motivo GGDEF e

qualquer mutação pontual (exceto D para E) elimina a atividade enzimática.¹⁴ As duas G estão envolvidas com a ligação do GTP e o E está envolvido na coordenação do metal, dois Mg^{2+} ou dois Mn^{2+} são necessários para a formação da ligação fosfodiéster, o D/E é indispensável para a catálise e também auxilia na coordenação do metal (figura 3 e 4).²⁰⁻²¹

A maioria das DGCs estão sujeitas a inibição alostérica pelo produto com a ligação do c-di-GMP em um sítio específico caracterizado pelo motivo RxxD (figura 4c).¹⁴ A necessidade de dimerização²² fornece um mecanismo simples para controlar a atividade das DGCs, uma vez que é possível usar um domínio acessório que forma dímeros de maneira dependente de sinal. Nesse caso, o domínio acessório não necessita de uma interação específica com o GGDEF, é preciso somente que eles façam parte da mesma cadeia polipeptídica (figura 4a).¹⁹

Figura 3 - O sítio ativo do domínio GGDEF. (a) Domínio GGDEF de PleD (*Caulobacter crescentus*), sítio ativo mostrado em azul com análogo de substrato ligado (GTPαS) e íons de metais em rosa. (b) Sítio ativo de DosC (*Escherichia coli*) (azul) com análogo de substrato ligado e íons de metais em verde. (c) Sítio ativo de DgcZ (*E. coli*) (azul) com substrato ligado e íons de metais em rosa.

Fonte: Adaptada de SCHIRMER.²⁰

Figura 4 - Dímero DgcZ e catálise. (a) Dímero DgcZ (*Escherichia coli*) com análogo de substrato ligado (GTP α S), a dimerização ocorre pelo domínio CZB. (b) Modelo de dímero DgcZ-GGDEF cataliticamente competente com GTP ligado, as ligações fosfodiéster são formadas nos locais indicados por linhas vermelhas ao centro da figura. (c) Dímero DgcZ-GGDEF após a catálise com c-di-GMP monomérico ligado no sítio ativo (A e A'); c-di-GMP dimérico ligado no sítio inibitório (Ip e Ip').

Fonte: Adaptada de SCHIRMER²⁰; ZÄHRINGER *et al.*²³

1.4 Degradação de c-di-GMP

A degradação desse segundo mensageiro ocorre por dois tipos de fosfodiesterases (PDEs). As que possuem o domínio EAL hidrolisam o c-di-GMP em pGpG, e as que possuem HD-GYP convertem-no em GMP.²¹ Para esse estudo focaremos nas PDEs com EAL.

Fosfodiesterases com EAL necessitam de Mg²⁺ ou Mn²⁺ (e são inibidas por Ca²⁺) e catalisam a abertura assimétrica do anel do c-di-GMP pela hidrólise de uma ligação fosfodiéster produzindo o pGpG (5'-fosfoguanilil-(3'-5')-guanosina). O enovelamento característico desse domínio é um barril TIM, um barril β central flanqueado por hélices α (figura 5a).¹³ O c-di-GMP se liga no topo do barril através de dois íons metálicos. O metal 1 é coordenado por dois E (um do motivo EAL), N, D, uma molécula de água e uma molécula de O do fosfato do c-di-GMP. O segundo metal é coordenado por dois D, E, uma molécula de água e outra molécula de O do fosfato do c-di-GMP. A partir dessa configuração é proposto que a molécula de água realize um ataque nucleofílico sobre o fosforo como observado em outras fosfodiesterases nucleotídicas cíclicas (figura 5b).²⁴

Embora o sítio de ligação do substrato fique completamente contido em um monômero EAL, a atividade dessa enzima ocorre no estado dimérico. A interface de dimerização conservada ocorre entre os domínios EAL e é formada por duas hélices com uma delas conectando-se a resíduos que coordenam metais no sítio ativo (figura 5b,c).^{19,25-26} O dímero

possui um mecanismo de abertura e fechamento que regula atividade e é dependente da ligação dos metais e do substrato. Também foi observado que a ligação do substrato induz a dimerização do EAL.²⁶ Esse mecanismo também pode ser regulado por um domínio acessório.^{19,25}

Figura 5 – Domínio EAL, sítio ativo e dimerização. (a) EAL de TBD1265 (*Thiobacillus denitrificans*), enovelamento padrão do EAL. (b) Detalhes do sítio ativo do EAL de BrlP1 (*Klebsiella pneumoniae*) com íons de metais e c-di-GMP ligado e as hélices de dimerização. (c) Dímero do EAL de BrlP1, ao centro hélices responsáveis pela dimerização.

Fonte: (a) e (c) adaptada de CHOU *et al.*²⁷; (b) adaptada de BARENDTS *et al.*²⁴

1.5 Domínios sensores/reguladores

Os níveis celulares de c-di-GMP dependem da atividade antagonista de DGCs e PDEs. Geralmente em um determinado organismo existem vários genes que codificam várias DGCs e PDEs, que carregam domínios reguladores ou sensores distintos. O que permite ao organismo perceber e integrar vários tipos de sinais, ambientais e internos, para ajustar o nível celular de c-di-GMP que vai interagir com vários efetores específicos e gerar uma resposta celular coordenada.¹⁹⁻²⁰ Algumas proteínas com domínios GGDEF e EAL possuem vários domínios sensores sugerindo que uma integração complexa de sinal pode ocorrer mesmo em proteínas únicas.¹⁴

Os sinais percebidos incluem presença de luz, oxigênio, nutrientes, condições redox, antibióticos, moléculas de sinalização intercelular.^{14,28} Esses sinais são detectados por domínios sensores como por exemplo domínios PAS associados a nucleotídeo de flavina ou grupo heme, domínios BLUF associados a nucleotídeo de flavina, e também domínios GAF, REC, CHASE, HAMP.^{14,20} A figura 6 mostra domínios reguladores e resíduos conservados importantes de algumas DGCs e PDEs.

Figura 6 - Domínios reguladores de proteínas contendo GGDEF e/ou EAL. Exemplos de domínios reguladores (em vermelho e cinza) presentes em proteínas com GGDEF e/ou EAL (em verde e azul); resíduos conservados importantes, organismo e atividade também são mostrados.

Fonte: Adaptada de SCHIRMER; JENAL.¹³

Os domínios PAS regulam uma ampla gama de domínios efetores e são encontrados em bactérias, eucariotos e arqueobacterias. Estão presentes em sistemas de dois componentes de histidina-quinases, guanilato ciclases, fosfodiesterases, fatores de transcrição, canais iônicos, proteínas de quimiotaxia, entre outros. Alguns domínios PAS se ligam a cofatores como metabólitos, íons, grupo heme, nucleotídeo de flavina (figura 7). Geralmente o PAS está no N-terminal de seus domínios efetores, e frequentemente numa mesma proteína podem ser encontrados vários domínios PAS ou o PAS e outros domínios sensores como o GAF.²⁹

Figura 7 - Domínio sensor PAS. Conformação canônica do PAS de NifL com FAD ligado (dinucleotídeo de flavina e adenina) e elementos de estrutura secundária destacados.

Fonte: Adaptada de MÖGLICH; AYERS; MOFFAT.²⁹

Os domínios sensores também podem regular a atividade diguanilato ciclase conduzindo a chamada ativação por dimerização, a partir de um sinal ocorre a dimerização do domínio sensor, e o domínio GGDEF presente na mesma cadeia polipeptídica é orientado adequadamente visando o encontro produtivo com outro GGDEF, originando a estrutura quaternária necessária para a catálise. Dessa forma, a atividade enzimática poderia ser controlada em resposta a percepção de sinal. Foi observado que domínios GGDEF isolados apresentam muito pouca ou nenhuma atividade, e que quase sempre as DGCs possuem domínios acessórios no seu N-terminal com a maioria deles com formação de dímeros conhecida ou prevista.²⁰

1.6 Efetores do c-di-GMP

Observada a influência global do c-di-GMP na fisiologia celular bacteriana e a abundância de DGCs e PDEs presentes nos genomas de algumas bactérias, pode se presumir que existem muitos efetores e alvos celulares. Várias famílias de proteínas e RNA que atuam como receptores/efetores nas vias de c-di-GMP foram identificados e caracterizados estrutural e funcionalmente. Até o momento, essas são as principais classes: proteínas com domínio GGDEF degenerados e/ou EAL degenerados, proteínas com os domínios PilZ, fatores de transcrição e riboswitches (figura 8).¹⁹

Os domínios GGDEF degenerados e EAL degenerados não conservam os aminoácidos necessários a atividade catalítica mas podem manter a capacidade de se ligar ao c-di-GMP e podem atuar como receptor/efetor.²¹ Em FimX foi observada a ligação do c-di-GMP ao EAL degenerado (**EVL**) e essa proteína está associada a respostas fisiológicas.³⁰ Já no caso do GGDEF degenerado, em PelD de *P. aeruginosa* composto pelos domínios GAF-GGDEF degenerado (**RNDEG**), foi observado que a ligação do c-di-GMP ocorre no motivo conservado RxxD (sítio I, também denominado sítio inibitório nos GGDEF ativos) com essa proteína associada a produção de exopolissacarídeos do biofilme (figura 8a).³¹

O domínio PilZ foi o primeiro receptor de c-di-GMP a ser identificado devido a sua presença na proteína BcsA de *G. xylinus* cujo os estudos levaram a descoberta do c-di-GMP. Esse domínio apresenta aproximadamente 110 aminoácidos e seu núcleo típico é composto por um barril beta.³² A ligação ao c-di-GMP ocorre através dos motivos RxxxR e DxSxxG e o domínio possui a capacidade de se ligar ao monômero ou ao dímero do c-di-GMP.³³ Mais de 30 proteínas contendo PilZ possuem sua estrutura cristalográfica depositada no bando de dados de proteínas PDB (do inglês, Protein Data Bank). Por exemplo, BcsA (figura 8d) e Alg44 (esta de *P. aeruginosa*) que atuam na produção de polímeros (celulose e alginato, respectivamente) que compõem a matriz do biofilme, YcgR (*E. coli*) que atua na regulação do flagelo³² (figura 8c), e o fator de transcrição MrkH (*Klebsiella pneumoniae*) que regula a expressão de fímbrias envolvidas na aderência a superfície.³⁴

O primeiro fator de transcrição receptor de c-di-GMP identificado foi FleQ, que atua como regulador nos genes de motilidade flagelar e da produção de exopolissacarídeo (operon pel) em *P. aeruginosa*.¹³ O c-di-GMP interage com o domínio AAA+ATPase da FleQ obstruindo a atividade ATPase e alterando sua estrutura quaternária e a atividade de

transcrição.³⁵ A ligação do c-di-GMP a outros fatores de transcrição como FliI (*Pseudomonas fluorescens*), MshE (*Vibrio cholerae*) também foi observada.¹⁹

Riboswitches são segmentos não codificantes do RNA mensageiro que adotam estruturas secundárias específicas e que se alteram com a ligação de pequenas moléculas; eles podem atuar alterando a transcrição, tradução e estabilidade do RNA mensageiro.²¹ Duas classes de riboswitches que se ligam ao c-di-GMP foram identificadas (figura 8b). Esses riboswitches foram encontradas a montante de genes de síntese e degradação do c-di-GMP. E também, a montante de genes conhecidos ou previstos que estão relacionados a motilidade, quimiotaxia, aderência e outros processos que comumente são alvos desse segundo mensageiro.³⁶

Com essa diversidade de efetores o c-di-GMP é capaz de regular processos celulares ao nível de transcrição, tradução e pós-tradução.

Figura 8 - Estruturas de alguns efetores do c-di-GMP. (a) PelD citosólica (4DN0) com c-di-GMP ligado ao GGDEF degenerado, domínio GAF acima; (b) Riboswitch Vc2 (de *V. cholerae*) com c-di-GMP ligado (vermelho); (c) YcgR (5Y6F) com c-di-GMP ligado no domínio PilZ, domínio YcgR-N à esquerda; (d) Complexo BcsA-BcsB com c-di-GMP ligado ao domínio PilZ de BcsA, em destaque região transmembrana, C-terminal de BcsA e polissacarídeo nascente (celulose).

Fonte: (a) elaborada pelo autor; (b) SMITH *et al.*³⁷; (c) elaborada pelo autor; (d) MORGAN; MCNAMARA; ZIMMER..³⁸

1.7 Respostas fisiológicas da sinalização por c-di-GMP

Os primeiros fenótipos descobertos associados a sinalização por c-di-GMP foram a diferenciação celular de *C. crescentus* e a formação de biofilme de *G. xylinus*, *Salmonella enterica*, *V. cholerae*, e *P. aeruginosa*. Posteriormente, também foram identificados fenótipos relacionados a virulência em *V. cholerae*, estilo de vida predatório em proteobactéria, desenvolvimento de heterocisto em cianobactéria, sobrevivência a estresse nutricional em micobactérias, entre outros.²¹ Para essa introdução, focaremos em dois dos principais fenótipos regulados pelo c-di-GMP, virulência bacteriana e a formação de biofilme.

Alguns fenótipos que afetam a virulência e são associados a sinalização por c-di-GMP são: aderência as células do hospedeiro, invasão das células do hospedeiro, infecção intracelular, secreção de fatores de virulência e citotoxicidade.²¹ Estudos em *Clostridium difficile* mostraram como o c-di-GMP pode ser importante nos processos de virulência. Durante a infecção, esse organismo passa do estado de vida livre para a adesão a superfície em células da mucosa intestinal. Essa transição é orientada por 16 riboswitches regulados por c-di-GMP, e que controlam a expressão de flagelos, adesinas, toxinas TcdA e TcdB, essas que são os principais fatores de virulência de *C. difficile*.¹⁹ Além desse exemplo, outros estudos mostraram que o c-di-GMP está relacionado com a virulência em vários patógenos animais e vegetais.²¹

A transição do estilo de vida livre para o biofilme é controlada universalmente pelo c-di-GMP. De forma geral, baixos níveis de c-di-GMP estão associados a motilidade de células individuais, e concentrações elevadas desse dinucleotídeo cíclico promove a adesão a superfície e formação de biofilme. Esse processo ocorre em vários estágios que envolvem etapas regulatórias complexas. As etapas da colonização da superfície envolvem, controle do flagelo, motilidade de superfície, produção de adesinas e de componentes da matriz do biofilme; e são ativadas de forma sequencial. Essa ativação sequencial pode ser alcançada com níveis crescentes de c-di-GMP, com a ação de diferentes DGCs e PDEs (com diferentes níveis de inibição), e com efetores que possuam afinidades ao c-di-GMP gradativamente menores.¹⁹ As principais etapas são discutidas a seguir.

A montagem e regulação da atividade do flagelo é regulada fortemente pelo c-di-GMP, que controla a expressão de genes, montagem e função motora do flagelo. Por exemplo, em *E. coli* o aumento dos níveis de c-di-GMP resulta numa obstrução da função motora do flagelo pelo efector YcgR ligado a c-di-GMP, que interage com a estrutura interna do flagelo. Para

bloquear a ação de YcgR a bactéria co-expressa a fosfodiesterase PdeH e genes flagelares (figuras 8c e 9a).¹⁹

Após o contato com a superfície, organelas como pili do tipo IV são responsáveis pela aderência e motilidade em superfície, essa estrutura é regulada pelo c-di-GMP e foi observada em *C. crescentus*, *V. cholerae* e *P. aeruginosa*. Em seguida ocorre a produção de componentes da matriz extracelular.¹⁹

Os principais componentes da matriz do biofilme em *E. coli* são fibras de curli e celulose. Durante a formação do biofilme, após a expressão induzida por RpoS, os níveis de c-di-GMP aumentam decorrentes da ação de DgcE e outras DGCs, e a regulação negativa ocorre por PdeH. Níveis globais aumentados de c-di-GMP estimulam o par DgcM e PdeR que funcionam como coativadores do fator de transcrição MlrA; esse que ativa a expressão do fator de transcrição CsgD; o qual induz a transcrição de genes de curli que culminarão na produção de fibras de curli. CsgD também induz a transcrição do gene *dgcC*, que codifica a DGC que estimula a síntese de c-di-GMP, o qual se liga ao complexo BcsA-BcsB, que realiza a produção de celulose (figuras 8d e 9b).^{19,39}

Os mecanismos de dispersão do biofilme ainda são pouco compreendidos. Um deles foi descoberto em *Pseudomonas Fluorescens* e envolve a adesina LapA, relacionada a adesão a superfície e estabilização do biofilme. O c-di-GMP em altos níveis se liga à LapD que interage e imobiliza a protease LapG, presente no periplasma. Com a diminuição dos níveis de c-di-GMP pela ação fosfodiesterase de RapA, o c-di-GMP se desliga de LapD que altera sua conformação e libera LapG para clivar a adesina LapA, enfraquecendo o biofilme. RapA é expressa em resposta a diminuição da concentração de fosfato pelo sistema de controle de fosfato Pst-PhoR-PhoB (figura 9c).¹⁹

Figura 9 - Algumas respostas fisiológicas mediadas por c-di-GMP na transição vida livre-biofilme.
 (a) Regulação do flagelo em *E. coli*. (b) Produção de fibra de curli e celulose em *E. coli*. (c) Clivagem de adesina em *P. fluorescens*.

Fonte: Adaptada de JENAL; REINDERS; LORI..¹⁹

1.8 Proteínas com GGDEF-EAL

Cerca de um terço das proteínas conhecidas que possuem GGDEF também possuem EAL, e dois terços das que possuem EAL também possuem GGDEF, e são observados na ordem GGDEF-EAL na orientação a partir do N-terminal do polipeptídeo.

Dentre elas, algumas proteínas possuem um dos domínios sem atividade catalítica mas ainda capaz de se ligar ao substrato e que pode desempenhar outras funções como a regulação do domínio justaposto que possui atividade.²¹ Por exemplo, a PdeA de *Caulobacter crescentus* possui os domínios PAS-GGDEF-EAL mas possui apenas a atividade fosfodiesterase, essa que é fortemente estimulada pela ligação de GTP ao domínio GGDEF (que no caso possui um resíduo não conservado, GEDEF).¹³ Foi observado que em proteínas GGDEF-EAL 40% dos GGDEF são degenerados, possuindo mutações previstas para prejudicar a atividade DGC.⁴⁰

Outra provável função desses domínios, que não realizam mais catálise, é a participação na interação proteína-proteína ou proteína-RNA.²¹

Para as proteínas contendo GGDEF-EAL com ambos os domínios enzimaticamente ativos, é possível que eles sejam regulados diferencialmente por sinais ambientais e/ou intracelulares, de modo que, em determinados momentos, uma das atividades seja predominante.²¹ Por exemplo, a proteína ScrC de *Vibrio parahaemolyticus* possui os domínios GGDEF-EAL com capacidade catalítica e um domínio sensor no periplasma. Ela é expressa a partir do operon ScrABC com ScrA e ScrB controlando a alternância da atividade DGC e PDE de ScrC.⁴¹⁻⁴²

Também existe o caso em que GGDEF e EAL não são catalíticos, como observado em FimX. Essa proteína de *Pseudomonas aeruginosa* é composta por REC-PAS-GGDEF-EAL com os dois últimos domínios inativos, contendo aminoácidos não conservados (GDSIF e EVL). Porém o domínio EAL manteve a capacidade de se ligar com alta afinidade ao c-di-GMP e foi proposto que FimX é um receptor de c-di-GMP que está envolvido nos processos de mobilidade independente de flagelo, aderência, formação de biofilme.³⁰

As principais proteínas investigadas nesse trabalho de mestrado são PA0575 e PA0285 de *P. aeruginosa*, ambas possuem os domínios GGDEF e EAL e domínios sensores PAS. Todas as proteínas de *P. aeruginosa* com PAS-GGDEF-EAL são apresentadas na figura 11. A proteína PA0575 possui conservado os resíduos dos domínios GGDEF e EAL necessários a atividade enzimática, e também possui conservado os resíduos RxxD do sítio inibitório de GGDEF. Essa proteína possui quatro domínios PAS e um domínio periplasmático que foi descoberto se ligar a L-arginina.⁴³ A deleção do gene ortólogo PA14_07500 (99% de identidade de sequência com PA0575) de *Pseudomonas aeruginosa* PA14 reduz a mobilidade de natação e a mobilidade de superfície (swarming) desse organismo.⁴⁴ Outro estudo com PA14_07500 mostrou que essa proteína em *P. aeruginosa* PA14 está relacionada a condições redox e morfogênese de colônia, na presença de fenazina (oxidante) PA14_07500 degrada o c-di-GMP inibindo a produção da matriz extracelular.⁴⁵ Os domínios GGDEF e EAL de PA0575 tiveram suas estruturas resolvidas por Mantoni e colaboradores. A partir de estudos bioquímicos, biofísicos e estruturais com construções de PA0575 sem os domínios PAS esses autores propuseram um modelo em que GGDEF regula a atividade do EAL dependente de ligação ao GTP. Nesse modelo, a ligação de GTP ao GGDEF do dímero de PA0575 promove a alternância da conformação em que os EALs estão separados para a conformação em que os EALs estão próximos, permitindo sua interação e a catálise do c-di-GMP (figura 10).⁴⁶

Figura 10 - Modelo proposto para PA0575 de ativação da atividade PDE dependente de GTP. A ligação do GTP ao GGDEF promove a alternância da conformação em que os EALs estão separados (OFF) para a conformação em que eles estão próximos (ON) e podem interagir para realizar a catálise.

Fonte: MANTONI *et al.*⁴⁶

A proteína PA0285 também possui conservados os resíduos dos domínios GGDEF e EAL (possui ESL) necessários a atividade enzimática. Porém, não possui conservado os resíduos do sítio inibitório de GGDEF. A deleção do gene ortólogo PA_03720 (100% de identidade de sequência com PA0285) reduziu a capacidade de mobilidade de natação da bactéria.⁴⁴ Em outro estudo, a deleção de PA0285 aumentou a formação de biofilme e a produção do exopolissacarídeo Psl, respostas fenotípicas relacionadas aos genes EAL em *P. aeruginosa*.⁴⁷

Figura 11 - Proteínas com PAS-GGDEF-EAL de *P. aeruginosa*. Resíduos necessários para a atividade dos domínios GGDEF e EAL; atividade confirmada experimentalmente destacado em verde; ausência de atividade confirmada experimentalmente destacado em vermelho; predito para ser ativo hachurado em verde. Arquitetura das proteínas.

Fonte: Adaptada de CAI *et al.*⁴⁸

1.9 Interações entre proteínas das vias de sinalização por c-di-GMP

A existência de várias DGCs, PDEs e efetores levanta questões sobre como ocorre a especificidade nessas vias de sinalização, ou seja, como é atingido seletivamente o alvo da via de sinalização a partir da ação de DGCs e PDEs específicas.²¹ Apesar do grande número de DGCs que podem estar em atividade simultânea, estudos demonstram que o c-di-GMP produzido por determinadas DGCs interagem seletivamente com efetores específicos sinalizando especificamente para apenas um ou dois processos fisiológicos. A partir de estudos de vários organismos foram propostos modelos para tentar explicar essa especificidade de sinalização.⁴⁹

No modelo de sinalização global, a ação conjunta de várias DGCs e de algumas PDEs contribuem para o ajuste do nível geral do c-di-GMP no citoplasma, esse nível pode ser

aumentado ou diminuído gradativamente. A especificidade de sinalização nesse modelo ocorre pelas diferentes afinidades de ligação dos efetores ao c-di-GMP. Já no modelo de sinalização local, pela atividade de determinadas DGCs é criado um pool local de c-di-GMP próximo ao efector que se pretende ativar, e PDEs atuam para evitar a livre difusão da molécula sinal pelo citoplasma. Nesse modelo as DGCs e PDEs podem estar próximas ao seu efector ou até mesmo interagindo fisicamente com eles.⁴⁹

Vários estudos tem dado suporte para a ocorrência de sinalização local e interação física entre proteínas de sinalização por c-di-GMP.⁵⁰⁻⁵³ Um estudo com DgcO e PdeO em *E. coli* (anteriormente denominadas DosC e DosP) realizado por Tuckerman e colaboradores demonstrou que essa DGC e PDE (que possuem grupo heme de ligação com oxigênio) formam um complexo com PNPase (efetor) e também com outras proteínas e RNA (figura 12a). Esse complexo corresponde a um degradossomo que é capaz de processar RNA dependente de oxigênio. Esse caso é um exemplo de que complexos macromoleculares podem compartimentalizar a sinalização por c-di-GMP.⁵¹

Um bom exemplo de interação física entre DGC e efetor foi observada por Dahlstrom e colaboradores em estudos com a diguanilato cicase GcbC e o efetor LapD em *P. fluorescens*. Foi observado que essa DGC utiliza interação física para entregar o c-di-GMP diretamente a esse efetor (figura 12b). Os elementos de interação encontrados foram a hélice $\alpha 5$ do GGDEF de GcbC e a hélice $\alpha 2$ do EAL degenerado de LapD. Os autores desse artigo teorizaram que as hélices de interação descritas por eles, talvez, possam ser utilizadas mais amplamente como elementos de interação entre os componentes das vias de sinalização do c-di-GMP.⁵⁰

Figura 12 - Exemplos de sinalização local. (a) Complexo macromolecular (degradossomo) em *E. coli* composto por DGC (DosC), PDE (DosP), efetor (PNPase), outras proteínas e RNA compartimentalizando a sinalização. (b) Interação física na qual a DGC (GcbC) entrega fisicamente o c-di-GMP ao efetor (LapD) em *P. fluorescens*.

Fonte: (a) TUCKERMAN; GONZALEZ; GILLES-GONZALEZ.⁵¹ (b) DAHLSTROM *et al.*⁵⁰

Uma abordagem mais abrangente visando detectar interações físicas com todas as 29 proteínas com GGDEF e/ou EAL de *E. coli* foi realizada por Sarenko e colaboradores utilizando ensaios de duplo híbrido bacteriano. Como resultado eles obtiveram um mapa da rede de interação proteína-proteína com cinco proteínas centrais nessa rede que podem realizar muitas interações e outras proteínas periféricas com menor número de interação (figura 13). Com os dados obtidos propuseram um modelo de sinalização local onde as DGCs fornecem localmente o c-di-GMP a efetores próximos e uma PDE fortemente expressa neutraliza o “escape” do segundo mensageiro, evitando que o c-di-GMP atue inespecificamente.⁵²

Figura 13 - Mapa da rede de interação entre proteínas das vias do c-di-GMP em *E. coli*. Interações físicas entre proteínas com GGDEF e/ou EAL e as respectivas respostas fisiológicas.

Fonte: SARENKO *et al.* ⁵²

Uma abordagem semelhante a anteriormente citada foi realizada por Andrea Cardoso e colaboradores no grupo de pesquisa do professor Marcos Navarro e visou analisar a interação físicas de todas as proteínas com GGDEF, EAL, HD-GYP, PilZ de *P. aeruginosa*. Através de ensaios de duplo híbrido bacteriano foi possível montar um abrangente mapa da rede de interações de proteínas (figura 14).⁵³ Apesar desse mapa da rede de interações ter fornecido importantes informações em nível sistêmico das potenciais interações entre enzimas envolvidas nas vias de sinalização por c-di-GMP em *P. aeruginosa*, as interações identificadas ainda precisam ser confirmadas por outra técnica experimental e estudadas em termos dos determinantes estruturais de reconhecimento molecular e regulação funcional.

Figura 14 - Mapa da rede de interação entre proteínas das vias do c-di-GMP em *P. aeruginosa*. Interações físicas entre proteínas com GGDEF, EAL, HD-GYP, PilZ.

Fonte: CARDOSO; NAVARRO.⁵³

2 OBJETIVOS

Para obter mais informações que auxiliem no entendimento do funcionamento de proteínas com os domínios catalíticos GGDEF e/ou EAL e que já apresentaram evidências de interação,⁵³ pares de proteínas que interagem fortemente de acordo com ensaios de duplo híbrido (figura 14) vem sendo estudados em nosso grupo.⁵⁴ Nesse trabalho de mestrado, os pares PA0575-PA0285 e PA0169-PA3825 foram selecionados para estudos estruturais e funcionais. Os objetivos principais do trabalho consistiram na confirmação direta da interação entre esses pares de proteínas, a identificação dos determinantes estruturais e a determinação das atividades catalíticas das proteínas interagentes.

Nesse sentido, os seguintes objetivos específicos foram traçados para a condução do trabalho:

- Análises das sequências de PA0575, PA0285, PA0169 e PA3825 para determinar limites de construções das proteínas (domínios isolados ou múltiplos domínios) adequados para produção heteróloga (ausência de sequências preditas como transmembranares);
- Sub-clonagem das construções selecionadas em vetores de expressão. Produção de amostras puras e homogêneas das construções por meio de sistema de expressão heteróloga em *E. coli*, seguido de purificação por cromatografia de afinidade por íon metálico imobilizado (IMAC) e cromatografia de exclusão molecular (SEC);
- Confirmação *in vitro* da interação entre proteínas completas ou construções dos pares PA0575-PA0285 e PA3825-PA0169, por meio de ensaios de *crosslinking* químico;
- Determinação das constantes de dissociação entre os pares de interação confirmados, por meio de ensaios de MST (termoforese em microescala);
- Análise do estado oligomérico em solução e determinação dos domínios envolvidos na oligomerização das proteínas completas ou construções, por meio de SEC-MALS (cromatografia de exclusão molecular acoplada a espalhamento de luz de múltiplos ângulos);
- Ensaios de atividades enzimáticas DGC e PDE por meio da detecção dos produtos reacionais por RP-HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa);
- Determinação das estruturas cristalográficas, por meio de ensaios de cristalização e cristalografia de raios X.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho das construções

As construções foram planejadas a partir dos genes PA0575, PA0285, PA3825 e PA0169 de *Pseudomonas aeruginosa*. As sequências codificantes dos genes foram consultadas na base de dados do site pseudomonas.com⁵⁵ e os domínios proteicos foram localizados com o auxílio do Pfam.⁵⁶ Com o objetivo de obter construções mais estáveis e solúveis foram evitadas interrupções em estruturas secundárias regulares por meio de predições no PSIPRED⁵⁷⁻⁵⁸ e evitadas regiões trans-membranares por meio de predições no servidor TMHMM.⁵⁹⁻⁶⁰ Os parâmetros físico-químicos foram calculados pela ferramenta ProtParam.⁶¹

3.2 Clonagem

As sequências de DNA foram obtidas por amplificação de DNA pela reação em cadeia da polimerase (do inglês, *polymerase chain reaction*, PCR) a partir de vetores contendo os genes de interesse obtidos no estudo para mapeamento de interações de proteínas realizado por Andrea Cardoso e colaboradores.⁵³ A sequência dos genes desses vetores foi obtida do genoma de *P. aeruginosa* PA14. No apêndice dessa dissertação encontram-se as sequências dos *primers* utilizados para amplificação e clonagem. Devido ao alto conteúdo de GC (guanina e citosina) do genoma de pseudomonas (66%),⁶²⁻⁶³ diversas polimerases e combinações de aditivos⁶⁴ (glicerol, etilenoglicol, DMSO, BSA) foram testadas para superar problemas como baixas taxas de amplificações ou amplificações inespecíficas.

A PCR com maior eficiência ocorreu com 1 ng de DNA plasmidial; 1U de polimerase Q5 High-Fidelity (*New England Biolabs*, NEB) ou Phusion High-Fidelity; (NEB) tampão da enzima contendo Mg^{2+} ; 0,2 mM de dNTP; 0,5 μ M de *primers*, 5% de glicerol; 5% de DMSO; 0,5 mg/mL de BSA; e água destilada deionizada para um volume final de 25 μ L. A programação utilizada em termociclador C1000 ou T100 (BioRad) foi: desnaturação inicial de 3 minutos a 98 °C; 7 ciclos de desnaturação a 98 °C por 10 segundos, hibridização por 30 segundos com aumento na temperatura de 1°C por ciclo partindo de 62 °C até 67 °C, e extensão a 72°C por 30 segundos por kb; 30 ciclos de desnaturação a 98 °C por 10 segundos, hibridização a 67 °C por 30 segundos, e extensão a 72 °C por 30 segundos por kb; extensão final a 72 °C por 5 minutos.

Os produtos da reação em cadeia da polimerase (*amplicons*) foram corados por solução de brometo de etídio e separados por eletroforese em gel de agarose 1% a 140V em tampão TAE. Os *amplicons* que estavam com o tamanho esperado seguiram para purificação com o *kit* Wizard SV Gel (Promega).

Para a inserção do *amplicon* no vetor foram utilizadas as técnicas de clonagem tradicional por restrição, clonagem por SLiCE (do inglês, *seamless ligation cloning extract*)⁶⁵ ou por *Gibson Assembly*⁶⁶ (figura 15). Para tanto, os *primers* para PCR foram desenhados com uma região de homologia com o vetor de 15 pares de bases e sítios de restrição para BamHI e HindIII, requisitos necessários as técnicas de clonagem utilizadas.⁶⁵⁻⁶⁶

Figura 15 - Etapas de algumas técnicas de clonagem utilizadas. Clonagem tradicional com enzimas de restrição. Clonagem por Gibson Assembly.

Fonte: Adaptada de BERTERO; BROWN. VALLIER.⁶⁷

O vetor pET-SUMO foi escolhido pela expressão da proteína de interesse ocorrer fusionada a proteína de alta solubilidade SUMO, com objetivo de aumentar o rendimento da purificação. Esse vetor possui a sequência para expressão de seis histidinas utilizada para purificação em resina de afinidade.⁶⁸

Para a clonagem por enzimas de restrição foi feita a digestão de 1 µg de vetor pET-SUMO com 1 unidade das enzimas BamHI-HF (NEB) e HindIII-HF (NEB), utilizando o tampão CutSmart, durante a noite toda (*overnight*) a 37 °C. Seguido de desnaturação das enzimas a 80 °C por 20 minutos e purificação com o *kit* Wizard SV Gel (Promega). A digestão dos insertos seguiu o mesmo procedimento porém com 200 ng do *amplicon* e foram incubadas por 2 horas. Para a reação de ligação foi utilizado uma proporção de 1:3, 1:5, 1:7 (vetor : inserto) com 50 ng do vetor clivado, 1 unidade da enzima T4 DNA ligase (Thermo Scientific), tampão para enzima, e água destilada deionizada para completar 10 µL; incubado por 1 hora e 30 minutos no gelo.

Na técnica de clonagem por SLiCE foi utilizado 1 µL de extrato⁶⁵ obtido de DH5α, tampão para T4 DNA Ligase (Thermo Scientific), proporção de 1:3, 1:5, 1:7 (vetor : inserto) com 50 ng do vetor clivado e água destilada deionizada para completar 10 µL; incubado 1 hora a 37 °C.

O protocolo utilizado para o Gibson *Assembly* foi realizado com 5 µL de Master Mix⁶⁶, proporção de 1:3, 1:5, 1:7 (vetor : inserto) com 50 ng do vetor clivado e água destilada deionizada para completar 10 µL; incubado 1 hora a 50 °C.

Após a montagem do vetor foi realizado a transformação em DH5α competentes, obtidas através do método de Inoue,⁶⁹ da seguinte forma: incubado por 15 minutos no gelo 50 µL de solução com células competentes; 1 minuto e 30 segundos a 42 °C; 5 minutos no gelo; adicionado 300 µL de meio LB ou SOC; incubado de 45 minutos a 1 hora e 30 minutos a 37 °C, sob agitação a 250 rpm; plaqueado em meio LB sólido com 50 µg/mL de canamicina e incubado 37 °C, *overnight*.

As colônias provenientes do processo de transformação foram cultivadas em 5 mL de meio LB a 37 °C, *overnight*, sob agitação de 250 rpm, e foi realizado a extração do plasmídeo através de miniprep com kit comercial (Cellco Biotec). Para verificar a presença do inserto no vetor foi realizado a restrição de 300 ng do plasmídeo com 0,5 unidade de BamHI-HF (NEB) e HindIII-HF (NEB) a 37 °C por 2 horas, seguido por eletroforese. As amostras que possuíam o inserto no tamanho esperado foram enviadas para sequenciamento.

3.3 Expressão e Lise

Após verificado por sequenciamento a ausência de mutações que alterassem a sequência de aminoácidos das construções, foi feita a transformação em BL21 (DE3) competentes (método de cloreto de cálcio) utilizando o mesmo protocolo de transformação para DH5 α . A expressão nessa cepa foi realizada da seguinte maneira:

- Inoculado uma única colônia em 5 mL de LB com 50 $\mu\text{g/mL}$ de canamicina e incubado a 37 °C, *overnight*, sob agitação de 250 rpm;
- Transferido para 1 L de LB com 50 $\mu\text{g/mL}$ de canamicina e multiplicação a 37 °C, 150 rpm, até densidade óptica em 600 nm entre 0,5 e 0,8;
- Adicionado IPTG para 0,1mM;
- Incubado *overnight* a 18 °C;
- Peletado células a 4500 rpm por 30 minutos a 4 °C;
- Ressuspendido em 20 mL de tampão de extração;
- Lisado ou armazenado a -80 °C.

Para retirar a proteína do meio intracelular o protocolo de lise celular utilizado foi:

- Adicionado lisozima para 2 mg/mL, manter 30 minutos no gelo;
- Submetido ao sonicador utilizando gelo por 7 minutos ON, pulso 30s ON / 30s OFF, amplitude de 20 ou 25 %;
- Centrifugado a 12000g por 30 minutos a 4 °C;
- Coletado sobrenadante.

3.4 Purificação de proteínas

A purificação das construções foi realizada por cromatografia de afinidade por íon metálico imobilizado (com resina de cobalto) e cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200 10/300 GL (General Electric, GE). O tampão utilizado foi Hepes 25 mM, NaCl 300 mM, pH 8,0, para algumas construções também foi adicionado 10% de glicerol. De maneira geral, as seguintes etapas foram utilizadas:

- Ao sobrenadante proveniente da lise foi adicionado imidazol para 10 mM;
- Adicionado o sobrenadante na coluna de afinidade passando por filtro Qualy, foi utilizado 4 mL de resina de cobalto por 1 L de cultura;

- Lavado duas vezes (2x) com 3 volumes de coluna (VC) de tampão de extração com 10 mM de imidazol;
- Lavado novamente com 1x 3VC de tampão de extração sem imidazol;
- Realizado a eluição da construção com SUMO com 10 mL de tampão com 0,5M de imidazol;
- Realizado a dessalinização das 10 mL de eluição com coluna HiPrep 26/10 *desalting* (GE);
- Medida a absorbância em 280 nm para estimar concentração;
- Adicionado SUMO-protease e incubado *overnight* a 8 °C;
- Lavada a coluna com 10VC de H₂O destilada deionizada;
- Equilibrado com 10 VC de tampão de extração sem imidazol;
- Adicionado as 15 mL da proteína clivada da SUMO na coluna de afinidade novamente;
- Coletado a construção, agora sem a SUMO;
- Adicionado de 1 a 2 VC de tampão sem imidazol;
- Concentrado em concentrador Amicon (Merck Millipore) para cromatografia de exclusão com Superdex 200 10/300 GL (GE);
- Centrifugado a amostra para remover precipitado (16000g por 10 min a 4 °C) e aplicado na coluna de exclusão;
- Coletado frações, retirado alíquotas para eletroforese e estimado concentrações;
- Realizado a eletroforese em gel de poliacrilamida com as amostras desnaturadas (do inglês, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) para análise das frações a serem concentradas e monitoramento das principais etapas da cromatografia de afinidade;
- Concentrado frações, alíquotado e congelado em nitrogênio líquido para armazenar a -80 °C.

Para algumas construções a clivagem para separar da SUMO foi realizada na coluna de afinidade, eliminando as etapas de dessalinização e segunda afinidade.

3.5 Buscas por condições de cristalização

Com o objetivo de obter cristais para ensaios de cristalografia de raios X foi realizada a triagem das condições de cristalização utilizando a técnica de difusão em gota sentada. O volume da gota foi de 0,3 µL e o reservatório continha 50 µL de solução para cristalização; foi

montado em sistema automatizado Crystal Gryphon em placas de 96 poços; e armazenado a 18 °C. Os kits para triagem de condições utilizados foram Index HT (Hampton Research), Morpheus I e II (Molecular Dimensions), JCSG-plus (Molecular Dimensions) e Pact (Molecular Dimensions).

3.6 Estudos de interação por *crosslinking* químico

Com a finalidade de detectar a interação entre as proteínas em estudo e verificar quais domínios estavam envolvidos foi realizada a reação de *crosslinking*. A melhor condição testada foi com 200 µM de DSS; 10, 20 ou 40 µM de cada construção proteica do par testado; incubado a 20 °C por 2 horas; adicionado glicina para 200 mM e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente (bloqueio da reação do DSS com as construções), desnaturado a 95 °C por 10 minutos com tampão com beta-mercaptoetanol; e realizado eletroforese em gel de poliacrilamida de 7, 12 ou 15% ou gel gradiente 4-20% (SDS-PAGE).

3.7 Estudos de interação por termoforese em microescala (MST)

A termoforese em microescala foi utilizada com o objetivo de detectar e quantificar a interação entre as construções. O termo termoforese em microescala se refere ao movimento de moléculas em gradiente microscópico de temperatura e permite a quantificação da interação entre biomoléculas pela detecção termoforética da alteração na conformação, carga e tamanho induzidas pela interação.⁷⁰ Para o experimento uma das construções parceiras foi marcada, ligada covalentemente a molécula comercial fluorescente Cy5-NHS éster (que reage com aminas primárias) (GE). A reação que apresentou melhores resultados de marcação foi feita com 60 µM de Cy5; 20 µM da construção PA0575-PPPPGE; 50 µM da construção PA0575-GGDEF; incubado por 10 minutos em pH 7,0 a temperatura ambiente; houve a remoção da molécula fluorescente livre em coluna dessalinizadora de bancada (NanoTemper); seguido para realização do experimento após quantificação em espectrofotômetro NanoDrop.

O experimento foi realizado no equipamento Monolith NT.115 (NanoTemper) a 25 °C, excitação em 20%, e potência média do MST. As amostras com a construção marcada a 20 nM e 0,05% de Twenn 20 foram testadas para verificar a intensidade da fluorescência e a não aderência a parede interna do capilar (utilizado capilar *standard treated*, Nanotemper). Devido a essa aderência, para a construção PA0575-PPPPGE marcada foi necessário a adição de BSA

para 1 mg/mL. Após esses testes iniciais foi realizada a diluição seriada da proteína não marcada e adicionada a proteína marcada nas condições testadas; por fim, as amostras foram submetidas ao experimento de termoforese em microescala.

3.8 Análise de oligomerização por SEC acoplada a espalhamento de luz (SEC-MALS)

Os experimentos de cromatografia de exclusão molecular acoplada a espalhamento de luz de múltiplos ângulos foram realizadas para determinar em solução a massa molecular das construções. As amostras com 50 μ L, 3 mg/mL, percorreram a 0,5 mL/min o sistema composto por HPLC Waters 600 (cromatografia líquida de alta eficiência), SEC (cromatografia de exclusão molecular) em coluna Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE), detector óptico 2487 (Waters) em 280 nM, detector de espalhamento miniDAWN TREOS (3 ângulos) (Wyatt) e refratômetro T-rEX (Wyatt).

3.9 Produção e purificação de c-di-GMP

A produção do c-di-GMP foi realizada a partir de GTP com a enzima WspR, foi utilizado 10 μ M da enzima (purificada em nosso laboratório), 500 μ M de GTP e 10 μ M de $MgCl_2$ em tampão Hepes 25 mM, NaCl 300 mM, pH 8,0. A reação ocorreu a temperatura ambiente em plataforma oscilante, *overnight*. Em seguida, foi feita a desnaturação da enzima a 95 °C por 10 minutos e centrifugado por 20 minutos a 16000g. O produto da reação foi concentrado 10x em sistema Savant speed vac (Thermo Quest). A purificação foi realizada em coluna de fase reversa Gemini 5 μ m C18 110A 250 x 10 mm (Phenomenex) utilizando o sistema AKTA (GE) com tampão de acetato de amônio 100 mM, pH 6,0 e gradiente de metanol; foi utilizado c-di-GMP analisado por espectrometria de massas para verificar qual pico correspondia ao c-di-GMP. O protocolo foi adaptado a partir de Zahringer⁷¹ e Navarro.⁷²

3.10 Análise de atividade enzimática por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Para verificar a capacidade de conversão enzimática, as construções foram incubadas com GTP e/ou c-di-GMP e o produto de sua atividade foi analisado por cromatografia líquida

de alta eficiência (do inglês, *high performance liquid chromatography*, HPLC) em fase reversa. A reação ocorreu com 1 μM da construção, 100 μM de GTP, e/ou 16 μM de c-di-GMP, 5 mM de MgCl_2 , 5 mM de MnCl_2 em tampão Hepes 25 mM, NaCl 300 mM, pH 8,0 em um volume total de 120 μL ; foram incubadas a temperatura ambiente por diferentes tempos, 10 minutos, 45 minutos, 2 horas e 30 minutos e *overnight*; seguido de desnaturação a 95 °C por 10 minutos; centrifugado por 10 minutos, 16000g; e armazenado a -20 °C. Alternativamente, somente para PA0575-GE, também foi utilizado para reação de atividade 2 μM da construção, 200 μM de GTP, e/ou 32 μM de c-di-GMP. Os produtos da reação foram analisados em HPLC Waters 600 em fase reversa com coluna Gemini 3 μM C18 110A 150 x 2.0 mm (Phenomenex) e detector óptico 2487 (Waters) em 280 nM, foi utilizado tampão de acetato de amônio 100 mM, pH 6,0 e gradiente de metanol. Foi utilizado c-di-GMP e pGpG analisado por espectrometria de massas para verificar qual pico correspondia ao c-di-GMP e ao pGpG. O protocolo foi adaptado a partir de Zahringer⁷¹ e Navarro.⁷²

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desenho das construções

As sequências codificantes dos genes das proteínas investigadas nesse trabalho foram amplificadas do genoma de *P. aeruginosa* PA14. São os genes PA14_07500, PA14_03720, PA14_014530, PA14_02110 que são ortólogos dos genes de *P. aeruginosa* PA01 PA0575, PA0285, PA3825, PA0169, respectivamente. Esses genes ortólogos apresentam alto grau de identidade de sequência (99% a 100%). Devido ao alto grau de identidade e ao maior volume de estudos envolvendo a estirpe PA01, foi adotado a nomenclatura de seus genes para esse trabalho.

A proteína PA0575 possui 1245 resíduos de aminoácidos com os domínios citosólicos PAS-PAS-PAS-PAS-GGDEF-EAL, uma hélice transmembrana na região que compreende os resíduos 268 a 290, e um domínio periplasmático VFT que se liga a L-arginina.⁴³ O domínio PAS adjacente ao GGDEF é um domínio de ligação ao FAD.⁴⁵ O domínio GGDEF possui os resíduos dos aminoácidos necessários à atividade DGC, e possui conservado o sítio inibitório RxxD. O domínio EAL também possui os resíduos necessários a atividade PDE. Logo, tanto o GGDEF quanto o EAL são preditos para serem ativos, porém somente a atividade PDE foi confirmada experimentalmente.⁴⁶ A arquitetura dessa proteína e os resíduos importantes de GGDEF e EAL podem ser observados na figura 11 (pag. 36) e na figura 16. Essa proteína foi relacionada a morfogênese de colônia detectando níveis de fenazina.⁴⁵ A partir de dados estruturais e de atividade, foi proposto que PA0575 pode atuar como um sensor de GTP para estimular a atividade PDE.⁴⁶

Com uma arquitetura semelhante a PA0575, a proteína PA0285 possui 760 resíduos, e os domínios citosólicos PAS-PAS-GGDEF-EAL, além de duas regiões compostas por hélices transmembrana entre os resíduos 5 a 24, e 39 a 61. O domínio GGDEF possui os resíduos necessários a atividade DGC, e não possui conservado o sítio inibitório RxxD. O domínio EAL possui os resíduos ESL e outros necessários à atividade PDE (figura 11, pag. 36). As atividades DGC e PDE dessa proteína não foram confirmadas experimentalmente.⁴⁸ Essa proteína se mostrou altamente conservada, presente em 52 genomas analisados de espécies e subespécies do gênero *Pseudomonas*, e a deleção desse gene aumentou a síntese do exopolissídeo Psl e a formação de biofilme, características associadas a atividade do EAL.⁴⁷

A proteína PA3825 possui 526 resíduos, com o domínio EAL no citoplasma e o motivo CSS no periplasma, esse motivo é flanqueado por duas hélices transmembranas compostas pelos resíduos 17 a 34 e 235 a 254. O motivo periplasmático CSS é comumente encontrado associado a proteínas com EAL. Em um estudo em *E. coli* foi observado que o CSS está relacionado a detecção de condições redox no periplasma e a regulação da atividade do EAL.⁷³ O domínio EAL possui os resíduos necessários para atividade, que foi constatada experimentalmente. Um estudo que realizou a deleção desse gene não observou mudanças na capacidade de natação, na mobilidade swarming ou twitching, mobilidades relacionadas a formação de biofilme. Já foi obtida a estrutura cristalografia do seu domínio EAL.⁷⁴

Também denominada de SiaD, a proteína PA0169 possui 235 resíduos e é inteiramente citosólica. Possui somente um domínio, um GGDEF conservado, e também possui conservado o sítio inibitório RxxD. Foi constatado que a superexpressão desse gene aumenta os níveis intracelulares de c-di-GMP e resulta em uma maior formação de biofilme, e a deleção desse gene resultou em efeitos contrários, diminuindo a formação de biofilme.⁷⁵ A formação de biofilme com o envolvimento da atividade de SiaD também ocorre em células de *P. aeruginosa* cultivadas em condições de estresse causado pelo detergente SDS.⁷⁶ Um recente estudo propôs uma rede de sinalização envolvendo as proteínas do operon siaABCD, no qual a atividade DGC de SiaD é estimulada por uma interação proteína-proteína com SiaC, essa interação ocorre quando SiaC está desfosforilada. As outras proteínas desse operon, a kinase SiaB e a fosfatase SiaA, estão envolvidas no controle da fosforilação de SiaC.⁷⁷

As construções proteicas utilizadas nesse trabalho de mestrado foram planejadas com informações sobre os domínios, hélices transmembranas e estruturas secundárias, juntamente com o conhecimento do funcionamento desses domínios e tendo em mente os objetivos desse trabalho. Para evitar complicações com a solubilidade das construções as regiões transmembranares foram evitadas por conta da natureza hidrofóbica desse tipo de estrutura.⁷⁸

Como o GGDEF necessita de um domínio acessório em seu N-terminal para promover a dimerização, que é um fator necessário a sua atividade,²⁰ foram planejadas construções com os domínios PAS-GGDEF para verificar a atividade DGC de PA0575 e PA0285. Construções contendo somente o GGDEF foram planejadas para servir de controle nos ensaios de atividade, como também, visando a cristalização para estudos estruturais. Construções com o EAL isolado foram planejadas para verificar o estado de oligomerização desse domínio isolado e a atividade PDE.²⁶ Para verificar a hipótese de aumento da atividade PDE na presença de GTP, foram planejadas construções contendo GGDEF-EAL para PA0575 e PA0285.^{46,79} Como PA3825 é

uma proteína transmembrana e possui apenas dois domínios, foram planejadas duas construções, uma contendo o domínio citosólico e outra com o domínio periplasmático. Apesar de PA0169 possuir apenas um domínio, para análise da importância da sua região N-terminal na dimerização e interação proteína-proteína, foi planejada uma construção que abrange a proteína toda e outra isolando o GGDEF.

De maneira geral, os domínios isolados também foram planejados para facilitar a cristalização visando estudos estruturais. Como mencionado, o mapa das interações proteína-proteína de *P. aeruginosa* obtido pelo nosso grupo forneceu as informações sobre os pares de interação aqui analisados. Como os dados para construção do mapa foram obtidos *in vivo* e com construções citosólicas inteiras,⁵³ as várias construções isolando os domínios também tiveram como objetivo, além de estudos de atividade e estruturais, rastrear os domínios envolvidos nessas interações e confirmá-las *in vitro*, utilizando proteínas purificadas.

Após o planejamento, os limites das construções foram determinados com o uso de ferramentas computacionais. Para obter construções mais estáveis e solúveis, com base em predições no PSIPRED⁵⁷⁻⁵⁸ e TMHMM,⁵⁹⁻⁶⁰ foram evitados cortes em estruturas secundárias do tipo hélice alfa e folha beta, e não incluído nas construções as regiões transmembranares presentes em PA0575, PA0285 e PA3825. Os domínios foram localizados e classificados pelo Pfam.⁵⁶ As construções são apresentadas na figura 16. E os parâmetros físico-químicos calculados no ProtParam⁶¹ são apresentados na tabela 1.

Figura 16 - Proteínas em estudo, as construções planejadas, regiões transmembranares, domínios e limites.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos das construções calculados utilizando o ProtParam.

Proteína	Construção	Amplicon (pb)	Limites (aminoácido)	Número de aminoácidos	Massa (kDa)	Ponto Isoelétrico	Absortividade Molar (M-1.cm-1)	Absortividade (g.L-1)
PA0169	F	705	1; 235	235	27	9,25	18450	0,689
	G	510	66; 235	170	19	6,3	15470	0,814
PA3825	CSS	582	40; 233	194	22	5,56	19940	0,924
	E	780	259; 517	260	29	4,97	19940	0,695
PA0285	PP	654	101; 318	218	25	8,01	46410	1,84
	G	453	337; 487	151	17	4,99	2980	0,178
	E	807	492; 760	269	30	5,43	29450	0,98
	PPG	1161	101; 487	387	44	5,98	49390	1,121
	GE	1272	337; 760	424	47	5,25	35410	0,748
	PPGE	1980	101; 760	660	75	5,77	81820	1,096
PA0575	PPPP	1539	296; 808	513	58	5,5	74370	1,279
	G	471	814; 967	157	17	5,65	4470	0,256
	E	813	970; 1240	271	30	4,89	25440	0,842
	PPPPG	2025	296; 967	675	76	5,56	78840	1,034
	GE	1281	814; 1240	427	48	5,12	29910	0,628
	PPPPGE	2835	296; 1240	945	106	5,33	104280	0,981
	SBP	705	026; 256	235	26	5,05	40910	1,571

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2 Clonagem

A obtenção das sequências a serem clonadas foi realizada por amplificação do DNA através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Inicialmente, a PCR foi realizada com DNA genômico de *Pseudomonas aeruginosa* PA14, porém devido a dificuldades com eficiência e especificidade da reação, provavelmente relacionadas ao alto conteúdo de GC do genoma desse organismo (66%),⁶²⁻⁶³ foi utilizado como DNA molde, vetores de duplo híbrido contendo os genes desejados (também provenientes de PA14) do estudo de mapeamento de interação entre proteínas realizado em nosso laboratório por Andrea Cardoso e colaboradores.⁵³ Persistindo os problemas de amplificação, foram testados diferentes polimerases, aditivos e programações no termociclador, para depois de dezenas de testes, finalmente encontrar uma condição que amplificasse com a eficiência e a especificidade necessárias. A figura 17 mostra algumas sequências amplificadas após a otimização da PCR.

A inserção dos *amplicons* (inserto) no vetor pET-SUMO clivado foi realizada utilizando três técnicas de clonagens. Inicialmente foi utilizado clonagem por SLiCE, funcionando com oito insertos, mas se mostrou ineficiente para os outros. Posteriormente, foi utilizado *Gibson Assembly*, e foi possível clonar três construções, porém também se mostrou ineficiente para os demais insertos. Por fim, as seis construções restantes foram clonadas por restrição. Utilizando essas três técnicas foi possível clonar as dezessete construções propostas. A inserção do *amplicon* no vetor foi verificada por dupla restrição e exemplos são mostrados na figura 17. Os insertos com tamanho esperado foram verificados por sequenciamento e não possuíam mutação não-sinônima.

Figura 17 - Amplificação por PCR e verificação das etapas da clonagem. (a) produtos da reação em cadeia da polimerase (*amplicons*) após otimização da reação; (b) verificação da presença do inserto no vetor, por dupla restrição por BamHI e HindIII; ambos após eletroforese em gel de agarose 1% e corados por solução de brometo de etídio.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3 Purificação de proteínas

Após verificada a superexpressão das construções (figura 18), que ocorreu a overnight a 18 °C, foi realizada a purificação por cromatografia de afinidade por íon metálico imobilizado e cromatografia de exclusão molecular.

Figura 18 - Superexpressão de algumas construções observadas em gel 12% de SDS-PAGE.
Valores de massa correspondem a soma da massa da construção e da massa da proteína de alta solubilidade SUMO (12 kDa).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Das dezessete construções clonadas, apenas PA0575-PPPP não foi levada até a etapa de purificação. O protocolo de expressão, lise e purificação foi semelhante para todas as construções, e a clivagem da SUMO foi realizada preferencialmente na coluna de afinidade, por evitar a necessidade de dessalinização e segunda afinidade. Os rendimentos por litro de cultura das purificações de cada construção, após cromatografia de exclusão molecular, podem ser observados na tabela 2.

Tabela 2 - Etapas realizadas e rendimentos na produção das construções.

Proteína	Construção	Clonagem	Expressão	Purificação	Rendimento (mg por 1 L de cultura)
PA0169	F	✓	✓	*	~ 0
	G	✓	✓	*****	2,7
PA3825	CSS	✓	✓	*	~ 0
	E	✓	✓	*****	5,2
PA0285	PP	✓	✓	*	~ 0
	G	✓	✓	*****	2,4
	E	✓	✓	*****	6,2
	PPG	✓	✓	*	0,07
	GE	✓	✓	*	0,17
	PPGE	✓	✓	*	0,04
	PPPP	✓	✓	-	-
PA0575	G	✓	✓	*****	2,1
	E	✓	✓	*****	14
	PPPPG	✓	✓	***	0,8
	GE	✓	✓	***	1,1
	PPPPGE	✓	✓	***	1,4
	SBP	✓	✓	*****	5,4

-	etapa não realizada
✓	etapa concluída
*****	etapa concluída com rendimento igual ou superior a 2,00 mg por litro de cultura
***	etapa concluída com rendimento entre 0,50 e 1,99 mg por litro de cultura
*	etapa concluída com rendimento igual ou inferior a 0,49 mg por litro de cultura

Fonte: Elaborada pelo autor.

O rendimento igual ou superior a 2 mg por litro de cultura foi considerado alto, por produzir amostra suficiente para a realização da maioria dos experimentos com apenas um litro de cultura. E, abaixo de 0,5 mg por litro de cultura foi considerado baixo, pela dificuldade ou impossibilidade de realizar os ensaios. O baixo rendimento de algumas construções ocorreu, provavelmente, pela insolubilidade das construções nos tampões de extração testados, e/ou pela

instabilidade da construção em solução. Pois, foi observada a presença de grande quantidade da proteína na fração insolúvel, junto com os fragmentos celulares. A figura 19 mostra, em gel de poliácridamida, amostras das etapas da purificação de duas construções, com alto e baixo rendimento.

Figura 19 - Verificação nas etapas de purificação. (a) Eletroforese (SDS-PAGE) de amostras após cromatografia de afinidade, com clivagem em solução, de PA0285-E, construção com rendimento considerado alto, seta indica menor quantidade de proteína na fração insolúvel (PI) comparada a solúvel (Sb); (b) SDS-PAGE de amostras após cromatografia de afinidade, com clivagem na coluna, de PA0285-GE, construção com rendimento considerado baixo, seta indica grande quantidade de proteína na fração insolúvel (PI) comparada a fração solúvel (Sb); (c) SDS-PAGE de frações coletadas durante a cromatografia de exclusão molecular (SEC) de PA0285-E; (d) Cromatograma da SEC de PA0285-E mostrando o pico coletado. **Abreviações:** M – marcador de peso molecular, In – induzido, PI – pellet, Sb – sobrenadante, NL – não ligado, L – lavagem, CI – clivagem com SUMO-protease, E – eluição com 0,5 M de imidazol, F – frações coletadas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Com o objetivo de aumentar a solubilidade das construções, foram testadas as adições dos seguintes compostos ao tampão padrão adotado (HEPES 25 mM, NaCl 300 mM, pH 8) para as seguintes concentrações finais do tampão: 10% de glicerol; 0,5% de CHAPS; 0,5% de

Triton X-100; 50 mM de arginina e 50 mM de ácido glutâmico; 5 mM de beta-mercaptoetanol. Destes, somente a adição do glicerol conseguiu aumentar o rendimento e/ou a estabilidade em solução, e foi utilizado nas construções com rendimento considerado médio ou baixo. Também foi testado lise em *french pressure*, como alternativa para aumentar o rendimento, porém, nas condições testadas, não foi bem sucedido.

Devido ao atraso decorrente de complicações nas clonagens e purificações, os trabalhos realizados com PA0169 e PA3825 foram finalizados na etapa de purificação. Logo, os experimentos descritos a seguir foram realizados somente com PA0575 e PA0285.

4.4 Buscas por condições de cristalização de construções de PA0575 e PA0285

Com o objetivo de resolver as estruturas por cristalografia de raios X, foi realizado a triagem com kits comerciais das condições de cristalização para as construções de maiores rendimentos. Foram utilizados o kits Index HT e Morpheus para PA0575-PPPPGE (3,5 e 14 mg/mL), PA0575-E (20 mg/mL), PA0575-SBP com e sem 5 mM de L-arginina⁴³ (12 mg/mL) e PA0285-E (14 mg/mL); resultando em cristais (muito pequenos) apenas para PA0575-E, domínio que teve sua estrutura recentemente resolvida.⁴⁶ Nova tentativa foi realizada com os kits Morpheus II, JCSG-plus e PACT para PA0285-E (7,5 mg/mL), PA0575-SBP (12,8 mg/mL) e PA0285-E (4,6 mg/mL) + PA575-G (2 mg/mL); porém não houve a formação de cristais.

4.5 Estudos de interação de PA0575 e PA0285 por *crosslinking* químico

A técnica de *crosslinking* químico foi utilizada com o objetivo de detectar *in vitro* a interação entre PA0575 e PA0285, e rastrear entre quais domínios a interação ocorre. Essa interação já foi observada *in vivo* com construções citosólicas inteiras dessas proteínas em experimentos de duplo híbrido bacteriano conduzidos anteriormente em nosso laboratório que deram origem a um mapeamento de rede de interações de proteínas.⁵³

Nos ensaios de *crosslinking químico* é utilizado uma pequena molécula com grupos reativos nas extremidades (*crosslinker*) para ligar covalentemente moléculas próximas, então, os produtos são visualizados por SDS-PAGE.⁸⁰ Os *crosslinkers* utilizados foram EGS (*ethylene*

glycol bis (succinimidyl succinate)) e DSS (*disuccinimidyl suberate*) ambos com grupos NHS éster nas extremidades (grupo amino reativo) e braço espaçador de 16,1 Å e 11,4 Å, respectivamente. Ambos foram testados com PA0575-PPPPGE e nos dois casos foi possível visualizar os oligômeros dessa construção, então, foi escolhido o DSS, por possuir um braço espaçador menor, que reduz as chances de ligações inespecíficas.⁸¹

Após otimização das condições experimentais, foi realizado a reação de *crosslinking* entre PA0575-PPPPGE e PA0285-E e foi possível observar a presença de uma banda condizente com a soma das massas dessas duas construções, que não havia nas reações de *crosslinking* das construções sozinhas (controle). Esse resultado não foi observado para a reação entre PA0575-PPPPGE e PA0285-G (figura 20).

Figura 20 - Resultados de *crosslinking* de PA0575-PPPPGE contra PA0285-E e PA0285-G. (a) SDS-PAGE em gel gradiente 4-20% de amostras da reação de *crosslinking*, seta indica provável banda de interação; (b) SDS-PAGE em gel 7% de amostras da mesma reação aplicada em (a), melhor visualização da provável banda de interação.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Com esse resultado há indícios de que a interação ocorre entre a porção citoplasmática da PA0575 e o domínio EAL da PA0285. Para verificar qual domínio da PA0575 está envolvido na interação, foi feita a reação de *crosslinking* com PA0285-E contra PA0575-G e PA0575-PPPPG, apresentado na figura 21.

Figura 21 - Resultados de *crosslinking* de PA0285-E contra PA0575-G e PA0575-PPPPG. (a) SDS-PAGE em gel gradiente 4-20% de amostras da reação de *crosslinking*, setas indicam prováveis bandas de interação; (b) SDS-PAGE em gel 7% de amostras da mesma reação aplicada em (a), melhor visualização das prováveis bandas de interação.

Fonte: Elaborada pelo autor.

É possível observar duas prováveis bandas de interação entre PA0285-E e PA0575-G, e entre PA0285-E e PA0575-PPPPG, mostrando então, que provavelmente, a interação ocorre entre os domínios EAL e GGDEF de PA0285 e PA0575, respectivamente. A interação entre esses domínios é inédita para essas proteínas, porém já foi relatada na literatura envolvendo outras DGCs e PDEs ou DGCs e efetores.^{49,52}

Procurando evidências de interação entre outros domínios, foram realizado novas reações de *crosslinking*, utilizando os domínios PA285-E contra PA0575-G e PA0575-E; e PA285-G contra PA0575-G e PA0575-E (figura 22). Os resultados foram coerentes com os anteriores e não mostraram outras bandas que podem ser relacionadas a interação, além das identificadas anteriormente.

Figura 22 - Resultados de *crosslinking* de PA0285-E contra PA0575-G e PA0575-E; PA0285-G contra PA0575-G e PA0575-E. (a) SDS-PAGE em gel 12% de amostras da reação de *crosslinking*, seta indica provável banda de interação; (b) SDS-PAGE em gel 12% de amostras da reação de *crosslinking*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A duas construções citosólicas completas PA0575-PPPPGE e PA0285-PPGE também foram testadas para verificar interação (figura 23a). E, após várias tentativas, com diferentes concentrações de proteína e *crosslinker*, não foi possível observar bandas que podem ser relacionadas a interação; o que pode ser explicado pela dificuldade de visualização, decorrente da presença de várias bandas, que também estão presentes nos controles, na área em que se espera visualizar a banda de interação.

Como última verificação foi realizada a reação com PA0575-G contra PA0285-PPGE com o resultado mostrado na figura 23b,c. Novamente é possível observar uma banda com a soma das construções sozinhas, com o tamanho esperado para o complexo PA0575-G + PA0285-PPGE.

Figura 23 - Resultados de *crosslinking* de PA0575-PPPPGE contra PA0285-PPGE e PA0285-PPG; PA0285-PPGE contra PA0575-E. (a) SDS-PAGE em gel 7% de amostras da reação de *crosslinking*; (b) SDS-PAGE em gel gradiente 4-20% de amostras da reação de *crosslinking*, seta indica provável banda de interação; (c) SDS-PAGE em gel 7% de amostras da mesma reação aplicada em (a), melhor visualização da provável banda de interação.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Portanto, após análise sistemática por *crosslinking*, o conjunto de resultados aponta para a interação envolvendo o EAL de PA0285 e o GGDEF de PA0575, não sendo possível visualizar evidências de interação entre os outros domínios por meio dessa técnica, com as amostras e condições testadas.

A interação física entre os domínios GGDEF ativo e EAL degenerado já foi observada entre DGC e efetor, e ajuda a explicar como ocorre a especificidade na sinalização por c-di-GMP. Uma vez que, o c-di-GMP produzido por determinada DGC pode ser entregue fisicamente a um efetor específico, evitando que esse segundo mensageiro atue indesejadamente sobre outros efetores.⁴⁹ Também foi observada, a interação entre GGDEF e EAL de DGC e PDE, que os resultados de *crosslinking* químico desse trabalho mostram ser o caso de PA0575 e PA0285.⁵² Essa interação, entre DGC e PDE, também contribui para a especificidade da sinalização, e, nesses casos acredita-se, que essas enzimas se regulem e atuem em conjunto, para regular os níveis de c-di-GMP para um efetor específico, que deve estar fisicamente próximo.⁵² Esse efetor também pode estar em um complexo com a DGC e a PDE.⁵¹

As interações entre DGCs e PDEs podem ocorrer envolvendo pares independentes, como também, para algumas respostas fisiológicas, é possível a existência de uma rede hierárquica de interação de proteínas, envolvendo várias DGCs e PDEs.⁵²⁻⁵³

4.6 Estudos de interação de PA0575 e PA0285 por MST.

Após o rastreamento da interação por *crosslinking* que levou até os domínios GGDEF de PA0575 e EAL de PA0285, foi utilizada a técnica de termoforese em microescala (MST) em busca de mais uma evidência *in vitro* dessa interação e também para quantificá-la. Foram utilizadas as construções PA0575-PPPPGE, PA0575-G e PA0285-E, não foi possível utilizar a construção inteira citosólica PA0285-PPGE devido ao seu baixo rendimento após purificação.

A construção PA0575-G marcada com Cy5-NHS éster foi utilizada no experimento com a concentração constante de 20 nM, contra PA0285-E em 16 diferentes concentrações preparadas por diluição seriada com a maior concentração de 419 μ M. A figura 24 mostra os dados obtidos no experimento de MST de PA0575-G contra PA0285-E. O experimento foi realizado em quadruplicata ($n = 4$), não houve a adesão de proteínas na parede do capilar, a amplitude da resposta foi alta (45) e a constante de dissociação (K_d) obtida foi de 41 μ M (± 2).

Figura 24 - Resultados do MST de PA0575-G contra PA0285-E. (a) curva de ligação com K_d de 41 μ M (± 2); (b) sobreposição dos sinais de MST, intensidade da fluorescência de cada amostra no decorrer do experimento; (c) sobreposição dos perfis de fluorescência do capilar mostrando a ausência de adsorção da proteína a parede interna.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Do mesmo modo o ensaio de MST foi realizado para a construção PA0575-PPPPGE marcada e testada contra PA0285-E, também preparada por diluição seriada com concentração maior de 419 μM . Os resultados são mostrados na figura 25. Foi realizado em triplicata ($n = 3$), inicialmente houve a adesão de proteínas a parede do capilar mas foi resolvido com adição de BSA, a amplitude de resposta foi boa (17) e a constante de dissociação foi de 36 μM (± 6).

Figura 25 - Resultados do MST de PA0575-PPPPGE contra PA0285-E. (a) curva de ligação com K_d 36 μM (± 6); (b) sobreposição dos sinais de MST, intensidade da fluorescência de cada amostra no decorrer do experimento; (c) sobreposição dos perfis de fluorescência do capilar mostrando a ausência de adsorção da proteína a parede interna.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A sobreposição das curvas de ligação de MST pode ser observada na figura 26.

Figura 26 - Sobreposição das curvas de ligação de PA0575-G contra PA0285-E, e PA0575-PPPPGGE contra PA0285-E.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Portanto, os resultados obtidos por MST foram coerentes com os do *crosslinking* químico, fornecendo mais uma evidência *in vitro* da interação entre o EAL de PA0285 e o GGDEF de PA0575. E foi obtido para essa interação um K_d em torno de 40 μ M. Logo, com a afinidade de interação da ordem de micromolar, a interação entre PA0575 e PA0285 pode ser classificada como uma interação proteína-proteína transiente fraca.^{82,83} Interações transitientes são esperadas para sinalização intracelular decorrente da necessidade de que a interação entre as proteínas envolvidas seja reversível. É importante observar, que embora a interação tenha sido considerada fraca *in vitro*, ela pode ter uma maior afinidade *in vivo*, decorrente da influência das condições do ambiente físico-químico intracelular local, como a presença de íons e/ou nucleotídeos (como o c-di-GMP). O fato de PA0575 e PA0285 estarem ancoradas à membrana também pode favorecer a interação, contribuindo para a co-localização e aumento da concentração local dessas proteínas, e auxiliando na promoção de um encontro adequado para interação.⁸² Também pode existir influência dos outros domínios de PA0285 na afinidade de interação, pois para o experimento de MST foi utilizado somente o domínio EAL de PA0285.

4.7 Análise de oligomerização de PA0575 e PA0285 por SEC-MALS

Com o objetivo de analisar as populações oligoméricas em solução, e relacioná-las com a capacidade de atividade enzimática, foi realizado a cromatografia de exclusão molecular acoplada a espalhamento de luz (SEC-MALS). Esse experimento foi realizado com todas as construções de PA0575, exceto a PA0575-PPPP (que não foi levada para etapa de purificação). E, apenas a construção com rendimento suficiente de PA0285, a PA0285-E. Os cromatogramas podem ser observados na figura 27. E, os valores calculados de massa são apresentados na tabela 3.

Nos resultados observamos que PA0575-PPPPGE e PA0575-PPPPG são majoritariamente diméricas em solução, estado esperado para proteínas com PAS-GGDEF cataliticamente ativas.^{19,22} As demais construções, que não possuem domínios PAS, são majoritariamente monoméricas, logo, pode ser afirmado que a dimerização da proteína PA0575 ocorre na região dos PAS. O que está de acordo com a literatura, pois o domínio PAS é conhecido por promover a dimerização de várias proteínas,²⁹ inclusive aquelas compostas pelos domínios PAS-GGDEF em tandem.²⁰

As construções de PA0575 e PA0285 que possuem o domínio catalítico EAL, foram observadas majoritariamente monoméricas. Os domínios EALs podem ser observados em solução como monômeros ou dímeros.²¹ Porém, foi demonstrado que após a ligação com o substrato (c-di-GMP) o EAL pode ter a afinidade de dimerização bastante aumentada, deslocando o equilíbrio para a formação de dímeros, estado necessário para a atividade fosfodiesterase.²⁶

O domínio periplasmático SBP de PA0575 foi observado na forma monomérica. Foi descoberto recentemente que ele se liga a L-arginina, e identificado como um domínio VFT (Venus flytrap). Utilizando modelagem por homologia foi proposto que a conformação do domínio VFT de PA0575 é composta por dois subdomínios moveis conectados que podem assumir uma conformação aberta ou fechada para a interação com o ligante.⁴³

Figura 27 - Cromatogramas de SEC-MALS de construções de PA0575 e PA0285-E. Estados oligoméricos observados a partir dos sinais normalizados de espalhamento de luz (LS) que estão representados por linha vermelha, índice de refração diferencial (dRI) que estão representados por linha preta e os valores de massa calculada (em Da), referentes aos picos, que estão representados por pontos pretos.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 3 - Massas calculadas de PA0575 e PA0285-E por SEC-MALS.

Proteína	Construção	Monômero (kDa)		Dímero (kDa)	
		Esperado	Obtido	Esperado	Obtido
PA0575	PPPPGE	106	111,2 ($\pm 0,7$)	212	206,8
	PPPPG	76	74,2 ($\pm 0,3$)	152	144,8
	GE	48	54,4 ($\pm 0,1$)	96	85 ($\pm 0,7$)
	E	30	39,1 ($\pm 0,04$)	60	48,3 ($\pm 0,3$)
	G	17	17,1 ($\pm 0,1$)	-	-
	SBP	26	24,3 ($\pm 0,02$)	-	-
PA0285	E	30	29 ($\pm 0,03$)	60	52,5 ($\pm 1,1$)

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.8 Análise de atividade enzimática de PA0575 e PA0285 por HPLC

As construções com domínios catalíticos foram testadas para a capacidade de conversão do seu substrato, e os produtos foram analisados por HPLC em fase reversa. A principal reação utilizada foi 1 μ M da construção, 100 μ M de GTP, e/ou 16 μ M de c-di-GMP, alternativamente, somente para PA0575-GE também foi utilizado 2 μ M da construção, 200 μ M de GTP, e/ou 32 μ M de c-di-GMP. PA0575-PPPPGE mostrou atividade de diguanilato ciclase (DGC) e de fosfodiesterase (PDE) convertendo GTP para c-di-GMP e este para pGpG (figura 28). Também foi possível observar a atividade DGC de PA0575-PPPPG (figura 29c). A atividade diguanilato ciclase não foi observada para as construções sem os PAS, PA0575-G e PA0575-GE (figura 29b e 30a,c), e que foram observadas majoritariamente monoméricas em experimentos de SEC-MALS. Esse resultado é esperado para domínios GGDEF monoméricos, decorrente da necessidade de dois GGDEFs para coordenar dois GTPs na síntese do c-di-GMP.²¹ Esse conjunto de resultados somados ao resultados de oligomerização confirmam a importância e a dependência dos domínios PAS para a atividade DGC de PA0575.

As construções PA0575-E e PA0575-GE, observadas majoritariamente monoméricas, mostraram atividade fosfodiesterase (figuras 29a e 30b,c), convertendo c-di-GMP em pGpG. Como a atividade PDE é dependente da formação de dímeros, essa atividade observada pode ser explicada pela formação de dímeros decorrente da interação com o substrato.²⁶

A atividade DGC para PA0575 aqui apresentada é inédita e não havia sido detectada por Mantoni e colaboradores em um estudo de PA0575 com construções contendo somente os

domínios GGDEF-EAL ou EAL.⁴⁶ Essa ausência de atividade pode ser justificada pela falta dos domínios PAS nas construções por eles utilizadas, uma vez que a atividade DGC é dependente da formação de dímeros,²² e o domínio GGDEF isolado se mostra incapaz de dimerizar, necessitando de um domínio acessório ou outro elemento estrutural em seu N-terminal com essa capacidade.²⁰ A atividade PDE também foi observada por Mantoni e colaboradores e é justificada pela capacidade do EAL em formar dímeros independentemente de outros domínios acessórios²⁵⁻²⁶ e inclusive a partir da interação com o substrato.²⁶

Outro ponto investigado por Mantoni e colaboradores foi uma maior atividade PDE decorrente da presença de GTP. Nesse trabalho de mestrado foi observado uma maior atividade PDE nos ensaios com 200 μ M de GTP com a construção de PA0575 contendo somente os domínios GGDEF-EAL (figura 30).⁴⁶ Esse efeito, do GTP na atividade fosfodiesterase, também foi observado em estudos com RbdA^{79,84} e foi proposto que o GTP pode atuar como um ativador alostérico de PDE, ou seja, o GTP ao se ligar ao GGDEF altera a conformação da proteína para uma forma que favorece a atividade PDE. Nesse modelo a atividade DGC é ausente⁸⁵ ou não preferencial⁷⁹ e o GGDEF funciona principalmente como um sensor para os níveis de GTP, teoricamente para evitar o esgotamento desse nucleotídeo. A atividade DGC seria evitada evitando a orientação adequada dos GGDEFs com GTP ligado necessária para a síntese de c-di-GMP.⁷⁹ A ativação alostérica por GTP da atividade PDE também foi proposto por Mantoni e colaboradores para PA0575.⁴⁶ Entretanto, é importante salientar, a respeito de PA0575, que o modelo proposto para ativação alostérica de PDE por ligação do GTP ao GGDEF, não considera a atividade DGC, que foi demonstrada nesse trabalho de mestrado ser presente em PA0575. E também não considera a atuação dos domínios PAS, que são conhecidos por reconhecerem diversos sinais²⁹ e serem responsáveis por alterações na estrutura quaternária de PA0575, como foi observado nos estudos de oligomerização desse trabalho de mestrado. Outra questão a ser considerada, observado os altos níveis intracelulares do GTP, da ordem de milimolar⁸⁶, e que geralmente os GGDEFs possuem um Km da ordem de micromolar, parece pouco provável a atuação do GGDEF como sensor de GTP, uma vez que, o GGDEF estaria em condição de saturação de substrato, tornando questionável sua utilidade como sensor.⁸⁷

Portanto, mais informações são necessárias sobre a totalidade de sinais que PA0575 detecta, com seus quatro domínios sensores citoplasmáticos e um domínio sensor periplasmático, e como esses sinais alteram a conformação da proteína, para serem propostos modelos mais abrangentes e integrados, que fornecerão uma melhor compreensão da regulação da atividade dos domínios catalíticos dessa proteína. Além da regulação da atividade por

captação de sinais por domínios sensores, existe também a interação entre proteínas⁵²⁻⁵³, que pode ter papel relevante na regulação de PA0575⁵³, adicionando mais um desafio para a compreensão da regulação da atividade dessa proteína.

Figura 28 - Análise dos produtos da atividade de PA0575-PPPPGE observado em HPLC de fase reversa. (a) Padrão com 100 μ M de GTP e 16 μ M de c-di-GMP; (b) Consumo de GTP com produção de c-di-GMP e pGpG, decorrente da atividade DGC e PDE de PA0575-PPPPGE; (c) Consumo de c-di-GMP com produção de pGpG, decorrente da atividade PDE de PA0575-PPPPGE; (d) Consumo de GTP e c-di-GMP com produção de c-di-GMP e pGpG decorrente da atividade DGC e PDE de PA0575-PPPPGE.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 29 - Análise dos produtos da atividade de PA0575-E, PA0575-G e PA0575-PPPPG observado em HPLC em fase reversa. (a) Consumo de c-di-GMP com produção de pGpG, decorrente da atividade PDE de PA0575-E. (b) Ausência de atividade DGC de PA0575-G, nas condições testadas. (c) Consumo de GTP com produção de c-di-GMP, decorrente da atividade DGC de PA0575-PPPPG.

Fonte: Elaborada pelo autor.

1 μM de proteína, 100 μM de GTP; 16 μM de c-di-GMP

2 μM de proteína, 200 μM de GTP; 32 μM de c-di-GMP

Figura 30 - Análise dos produtos da atividade de PA0575-GE observado em HPLC em fase reversa.

(a) Ausência de atividade DGC de PA0575-GE, nas condições testadas. (b) Consumo de c-di-GMP com produção de pGpG, decorrente da atividade PDE de PA0575-GE. (c) Ausência de atividade DGC de PA0575-GE, nas condições testadas; e consumo de c-di-GMP com produção de pGpG, decorrente da atividade PDE de PA0575-GE, indícios de maior atividade PDE na reação com 100 μM de GTP (comparação entre (b) e (c)). **Reação com duas vezes mais proteína, GTP e c-di-gmp.** (d) Ausência de atividade DGC de PA0575-GE, nas condições testadas; (e) Consumo de c-di-GMP com produção de pGpG, decorrente da atividade PDE de PA0575-GE; (f) Ausência de atividade DGC de PA0575-GE, nas condições testadas; e consumo de c-di-GMP com produção de pGpG, decorrente da atividade PDE de PA0575-GE, maior atividade PDE na reação com 200 μM de GTP (comparação entre (e) e (f)).

Fonte: Elaborada pelo autor.

As construções PA0285-PPGE e PA0285-PPG não mostraram atividade DGC, nas condições testadas, (figuras 31a e 32c) apesar de terem conservados os aminoácidos do domínio GGDEF necessários para atividade.²⁰ No gel de *crosslinking* dessas duas construções (figura 23, pag. 63, 31c e 32c), é possível observar uma formação muito baixa de dímeros, o que pode ajudar a justificar a muito baixa ou ausente atividade DGC.^{19,22} PA0285-G e PA0285-GE, como esperado,²² não mostraram atividade DGC (figura 32b e 33a,c).

A atividade PDE foi observada em todas as construções de PA0285 que possuem o domínio EAL, PA0285-PPGE, PA0285-E e PA0285-GE (figuras 31b, 32a e 33b,c). Os dados sobre a atividade PDE de PA0285 são inéditos. Não é possível afirmar que ocorra uma maior

atividade PDE na presença de GTP com os resultados das reações de atividade de PA0285-GE com 100 μ M de GTP (figura 33).

Figura 31 - Análise dos produtos da atividade de PA0285-PPGE observado em HPLC em fase reversa. (a) Ausência de atividade DGC de PA0285-PPGE, nas condições testadas. (b) Consumo de c-di-GMP com produção de pGpG, decorrente da atividade PDE de PA0285-PPGE. (c) Muito baixa formação de dímeros de PA0285-PPGE, observado por meio de *crosslinking* químico.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 32 - Análise dos produtos da atividade de PA0285-E, PA0285-G e PA0285-PPG observada em HPLC em fase reversa. (a) Consumo de c-di-GMP com produção de pGpG, decorrente da atividade PDE de PA0285-E (b) Ausência de atividade DGC de PA0285-G, nas condições testadas. (c) Ausência de atividade DGC de PA0285-PPG, nas condições testadas. (d) Muito baixa formação de dímeros de PA0285-PPG, observado por meio de *crosslinking* químico.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 33 - Análise dos produtos da atividade de PA0285-GE observado em HPLC em fase reversa.

(a) Ausência de atividade DGC de PA0285-GE, nas condições testadas. (b) Consumo de c-di-GMP com produção de pGpG, decorrente da atividade PDE de PA0285-GE. (c) Ausência de atividade DGC de PA0285-G, nas condições testadas; e consumo de c-di-GMP com produção de pGpG, decorrente da atividade PDE de PA0285-GE. A partir da comparação entre (b) e (c) não é possível afirmar que exista uma maior atividade PDE na presença de 100 μ M de GTP.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5 CONCLUSÕES

Por meio de ensaios de *crosslinking* químico foi possível constatar que os domínios envolvidos na interação entre PA0575 e PA0285 são o GGDEF de PA0575 e o EAL de PA0285. A interação entre esses domínios é inédita para essas proteínas e pode contribuir para a regulação dos níveis locais de c-di-GMP, decorrente de uma potencial influência nas atividades enzimáticas dessas proteínas. Dessa forma, essa interação pode contribuir para a especificidade da via de sinalização.^{49,52}

Com experimentos de termoforese em microescala (MST) foi possível determinar que a constante de dissociação (Kd) para interação entre o GGDEF de PA0575 e o EAL de PA0285 é de aproximadamente 40 μ M. Valor que classifica essa interação proteína-proteína como transiente e fraca. O ambiente intracelular e o fato de PA0575 e PA0285 estarem ancorados à membrana podem contribuir favoravelmente para essa interação.⁸² Logo, embora a interação seja classificada como fraca *in vitro* ela pode ser significativa para a via de sinalização em *P. aeruginosa*.

Utilizando SEC-MALS foi possível analisar os estados oligoméricos das construções de PA0575 e constatar que a dimerização dessa proteína ocorre na região dos domínios PAS.

A análise dos produtos da atividade enzimática (HPLC-RP) mostrou que PA0575 possui atividade DGC e PDE. A atividade DGC dessa proteína foi observada apenas para construções que possuem PAS-GGDEF, logo, com capacidade de formar dímeros, estado necessário a atividade DGC.²⁶ A proteína PA0285 mostrou somente atividade PDE. A atividade DGC muito baixa ou ausente de PA0285 pode ser explicada pela muito baixa formação de dímeros das construções com PAS-GGDEF, observada nos ensaios de *crosslinking* químico. As informações sobre a atividade DGC de PA0575 e sobre a atividade e oligomerização de PA0285 são inéditas.

Os resultados obtidos nesse trabalho contribuem para um melhor entendimento do funcionamento das proteínas com GGDEF-EAL PA0575 e PA0285. Com futuros estudos, principalmente *in vivo* e de biologia estrutural, espera ser compreendido por completo o funcionamento dessas proteínas, e o contexto geral de sinalização no qual elas estão inseridas. Por exemplo, espera ser elucidado quais são os sinais de entrada, como ocorre a regulação da atividade pela atuação dos domínios sensores e também pela interação entre proteínas, a participação em redes de interação de proteínas e o funcionamento delas, quais efetores envolvidos e a regulação deles, as consequentes respostas fisiológicas, entre outros.

REFERÊNCIAS

- 1 VERT, M. *et al.* Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC recommendations 2012). **Pure and Applied Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 377–410, 2012.
- 2 FLEMMING, H-C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix, **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623-633, 2010.
- 3 SCHACHTER, B. Slimy business - the biotechnology of biofilms. **Nature Biotechnology**, v.21, n. 4, p. 361-365, 2003.
- 4 KOO, H. *et al.* Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 361, 2017.
- 5 KARATAN, E.; WATNICK, P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 73, n. 2, p. 310–347, 2009.
- 6 FLEMMING, H. C. *et al.* Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 563, 2016.
- 7 FLEMMING, H. C.; WUERTZ, S. Bacteria and archaea on earth and their abundance in biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 247–260, 2019.
- 8 EHRLICH, H. L. Geomicrobiology: its significance for geology. **Earth Science Reviews**, v. 45, n. 1–2, p. 45–60, 1998.
- 9 RÖMLING, U.; BALSALOBRE, C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. **Journal of Internal Medicine**, v. 272, n. 6, p. 541–561, 2012.
- 10 VAN ACKER, H.; VAN DIJCK, P.; COENYE, T. Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 6, p. 326, 2014.
- 11 FLEMING, D.; RUMBAUGH, K.. Approaches to dispersing medical biofilms. **Microorganisms**, v. 5, n. 2, p. 15, 2017.
- 12 MADIGAN, M.; MARTINKO, J.; BENDER, K. **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre: Artmed, 2016.
- 13 SCHIRMER, T.; JENAL, U. Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signalling. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 10, p. 724, 2009.
- 14 HENGGE, R. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 263, 2009.
- 15 DUERIG, A. *et al.* Second messenger-mediated spatiotemporal control of protein degradation regulates bacterial cell cycle progression. **Genes and Development**, v. 23, n. 1, p. 93–104, 2009.
- 16 COTTER, P. A.; STIBITZ, S. c-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 17-23, 2007.
- 17 ROSS, P. *et al.* Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic

diguanylic acid. **Nature**, v. 325, n. 6101, p. 279–281, 1987.

18 RÖMLING, U.; GALPERIN, M. Y. Discovery of the Second Messenger Cyclic di-GMP. In: SAUER, K. (eds) **Methods in molecular biology**. New York: Humana Press, 2017, p. 1–8

19 JENAL, U.; REINDERS, A.; LORI, C. Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 271, 2017.

20 SCHIRMER, T. C-di-GMP synthesis: structural aspects of evolution, catalysis and regulation. **Journal of Molecular Biology**, v. 428, n. 19, p. 3683–3701, 2016.

21 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.

22 WASSMANN, P. *et al.* Structure of BeF₃--modified response regulator PleD: implications for diguanylate cyclase activation, catalysis, and feedback inhibition. **Structure**, v. 15, n. 8, p. 915–927, 2007.

23 ZÄHRINGER, F. *et al.* Structure and signaling mechanism of a zinc-sensory diguanylate cyclase. **Structure**, v. 21, n. 7, p. 1149–1157, 2013.

24 BARENDT, T. R. M. *et al.* Structure and mechanism of a bacterial light-regulated cyclic nucleotide phosphodiesterase. **Nature**, v. 459, n. 7249, p. 1015–1018, 2009.

25 WINKLER, A. *et al.* Characterization of elements involved in allosteric light regulation of phosphodiesterase activity by comparison of different functional BlrP1 states. **Journal of Molecular Biology**, v. 426, n. 4, p. 853–868, 2014.

26 SUNDRIYAL, A. *et al.* Inherent regulation of EAL domain-catalyzed hydrolysis of second messenger cyclic di-GMP. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 10, p. 6978–6990, 2014.

27 CHOU, S. *et al.* (ed.). **Microbial cyclic di-nucleotide signaling**. Berlin: Springer Verlag, 2020.

28 JENAL, U.; MALONE, J. Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. **Annual Review of Genetics**, v. 40, n. 1, p. 385–407, 2006.

29 MÖGLICH, A.; AYERS, R. A.; MOFFAT, K. Structure and signaling mechanism of Per-ARNT-Sim domains. **Structure**, v. 17, n. 10, p. 1282–1294, 2009.

30 NAVARRO, M. V. A. S. *et al.* Structural analysis of the GGDEF-EAL domain-containing c-di-GMP receptor FimX. **Structure**, v. 17, n. 8, p. 1104–1116, 2009.

31 WHITNEY, J. C. *et al.* 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. 23582–23593, 2012.

32 GALPERIN, M. Y.; CHOU, S. Structural conservation and diversity of PilZ-related domains. **Journal of Bacteriology**, v. 202, n. 4, p. e00664-19, 2020.

33 CHOU, S.; GALPERIN, M. Y. Diversity of cyclic di-GMP-binding proteins and mechanisms. **Journal of Bacteriology**, v. 198, n. 1, p. 32–46, 2016.

34 WILKSCH, J. J. *et al.* MrkH, a novel c-di-GMP-dependent transcriptional activator, controls *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation by regulating type 3 fimbriae expression.

PLoS Pathogens, v. 7, n. 8, p. e1002204, 2011.

35 MATSUYAMA, B. Y. *et al.* Mechanistic insights into c-di-GMP-dependent control of the biofilm regulator FleQ from *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 2, p. E209–E218, 2016.

36 TAMAYO, R. Cyclic diguanylate riboswitches control bacterial pathogenesis mechanisms. **PLoS Pathogens**, v. 15, n. 2, p. e1007529, 2019.

37 SMITH, K. D. *et al.* Structural and biochemical determinants of ligand binding by the c-di-GMP riboswitch. **Biochemistry**, v. 49, n. 34, p. 7351–7359, 2010.

38 MORGAN, J. L. W.; MCNAMARA, J. T.; ZIMMER, J. Mechanism of activation of bacterial cellulose synthase by cyclic di-GMP. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 21, n. 5, p. 489–496, 2014.

39 LINDENBERG, S. *et al.* The EAL domain protein YciR acts as a trigger enzyme in a c-di-GMP signalling cascade in *E. coli* biofilm control. **EMBO Journal**, v. 32, n. 14, p. 2001–2014, 2013.

40 SESHASAYEE, A. S. N.; FRASER, G. M.; LUSCOMBE, N. M. Comparative genomics of cyclic-di-GMP signalling in bacteria: post-translational regulation and catalytic activity. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 18, p. 5970, 2010.

41 BOLES, B. R.; MCCARTER, L. L. *Vibrio parahaemolyticus* scrABC, a novel operon affecting swarming and capsular polysaccharide regulation. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 21, p. 5946–5954, 2002.

42 TRIMBLE, M. J.; MCCARTER, L. L. Bis-(3'-5')-cyclic dimeric GMP-linked quorum sensing controls swarming in *Vibrio parahaemolyticus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 44, p. 18079–18084, 2011.

43 PAIARDINI, A. *et al.* A novel bacterial l-arginine sensor controlling c-di-GMP levels in *Pseudomonas aeruginosa*. **Proteins: structure, function and bioinformatics**, v. 86, n. 10, p. 1088–1096, 2018.

44 HA, D. G.; RICHMAN, M. E.; O'TOOLEA, G. A. Deletion mutant library for investigation of functional outputs of cyclic diguanylate metabolism in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 11, p. 3384–3393, 2014.

45 OKEGBE, C. *et al.* Electron-shuttling antibiotics structure bacterial communities by modulating cellular levels of c-di-GMP. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 26, p. E5236–E5245, 2017.

46 MANTONI, F. *et al.* Insights into the GTP-dependent allosteric control of c-di-GMP hydrolysis from the crystal structure of PA0575 protein from *Pseudomonas aeruginosa*. **FEBS Journal**, v. 285, n. 20, p. 3815–3834, 2018.

47 WEI, Q. *et al.* Diguanylate cyclases and phosphodiesterases required for basal-level c-di-GMP in *Pseudomonas aeruginosa* as revealed by systematic phylogenetic and transcriptomic analyses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85, n. 21, p. e01194-19, 2019.

48 CAI, Y. *et al.* Differential impact on motility and biofilm dispersal of closely related phosphodiesterases in *Pseudomonas aeruginosa*. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2020.

- 49 DAHLSTROM, K. M.; O'TOOLE, G. A. A symphony of cyclases: specificity in diguanylate cyclase signaling. **Annual Review of Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 179–195, 2017.
- 50 DAHLSTROM, K. M. *et al.* Contribution of physical interactions to signaling specificity between a diguanylate cyclase and its effector. **mBio**, v. 6, n. 6, p. e01978-15, 2015.
- 51 TUCKERMAN, J. R.; GONZALEZ, G.; GILLES-GONZALEZ, M. A. Cyclic di-GMP activation of polynucleotide phosphorylase signal-dependent RNA processing. **Journal of Molecular Biology**, v. 407, n. 5, p. 633–639, 2011.
- 52 SARENKO, O. *et al.* More than enzymes that make or break cyclic Di-GMP—local signaling in the interactome of GGDEF/EAL domain proteins of Escherichia coli. **mBio**, v. 8, n. 5, p. e01639-17, 2017.
- 53 CARDOSO, A. R. **Mapeamento global das interações proteicas nas vias de sinalização mediadas por c-di-GMP de Pseudomonas aeruginosa**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.
- 54 SILVA, E. E. D. **Estudos sobre a regulação dos transdutores de sinal PA0847 e HsbD de Pseudomonas aeruginosa e sobre sistemas GGDEF e EAL em tandem**. 2018. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.
- 55 WINSOR, G. L. *et al.* Enhanced annotations and features for comparing thousands of Pseudomonas genomes in the Pseudomonas genome database. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D646–D653, 2016.
- 56 EL-GEHALI, S. *et al.* The Pfam protein families database in 2019. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D427–D432, 2019.
- 57 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.
- 58 BUCHAN, D. W. A.; JONES, D. T. The PSIPRED protein analysis workbench: 20 years on. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. W1, p. W402–W407, 2019.
- 59 KROGH, A. *et al.* 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.
- 60 SONNHAMMER, E. L.; VON HEIJNE, G.; KROGH, A. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *In*: CONFERENCE ON INTELLIGENT SYSTEMS FOR MOLECULAR BIOLOGY, 6., 1998, Montréal. **Proceedings[...]**. Montréal: ISMB, 1998. p. 175-182.
- 61 GASTEIGER, E. *et al.* Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. *In*: WALKER, J. M. (ed.). **The proteomics protocols handbook**. Totowa: Humana Press, 2005. p. 571–608.
- 62 GENOME. **Pseudomonas aeruginosa (ID 187)**. 2017. Disponível em: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Pseudomonas aeruginosa%5BOrganism%5D&cmd=DetailsSearch](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Pseudomonas+aeruginosa%5BOrganism%5D&cmd=DetailsSearch). Acesso em: 15 jan. 2020.
- 63 KLOCKGETHER, J. *et al.* Pseudomonas aeruginosa genomic structure and diversity.

Frontiers in Microbiology, v. 2, n. 150, p. 1-18, 2011.

64 KRAMER, M. F.; COEN, D. M. Enzymatic amplification of DNA by PCR: standard procedures and optimization. **Current Protocols in Cell Biology**, v. 10, n. 1, p. A.3F.1-A.3F.14, 2001.

65 ZHANG, Y.; WERLING, U.; EDELMANN, W. Seamless ligation cloning extract (SLiCE) cloning method. *In*: LALA, R.; VALLAS, S.(ed.) **DNA cloning and assembly methods**. Totowa: Humana Press, 2014. p. 235-244.

66 GIBSON, D. G. *et al.* Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. **Nature Methods**, v. 6, n. 5, p. 343–345, 2009.

67 BERTERO, A.; BROWN, S.; VALLIER, L. Methods of cloning. *In*: JALALI, M.; SALDANHA, F. Y. L. JALALI, M. (ed.). **Basic science methods for clinical researchers** New York: Academic Press, 2016.

68 BUTT, T. R. *et al.* SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. **Protein Expression and Purification**, v. 43, n. 1, p. 1-9, 2005.

69 SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harboc Laboratory Press, 2000.

70 JERABEK-WILLEMSSEN, M. *et al.* Molecular interaction studies using microscale thermophoresis. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 9, n. 4, p. 342, 2011.

71 ZÄHRINGER, F.; MASSA, C.; SCHIRMER, T. Efficient enzymatic production of the bacterial second messenger c-di-GMP by the diguanylate cyclase YdeH from *E. coli*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 163, n. 1, p. 71-79, 2011.

72 DE, N. *et al.* Determinants for the activation and autoinhibition of the diguanylate cyclase response regulator WspR. **Journal of Molecular Biology**, v. 393, n. 3, p. 619–633, 2009.

73 HERBST, S. *et al.* Transmembrane redox control and proteolysis of PdeC, a novel type of c-di- GMP phosphodiesterase . **The EMBO Journal**, v. 37, n. 8, p. e97825, 2018.

74 BELLINI, D. *et al.* Dimerisation induced formation of the active site and the identification of three metal sites in EAL-phosphodiesterases. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.

75 BHASME, P. *et al.* Evaluation and characterization of the predicted diguanylate cyclase-encoding genes in *Pseudomonas aeruginosa*. **MicrobiologyOpen**, v. 9, n. 3, p. e975, 2020.

76 KLEBENSBERGER, J. *et al.* SiaA and SiaD are essential for inducing autoaggregation as a specific response to detergent stress in *Pseudomonas aeruginosa*. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 12, p. 3073–3086, 2009.

77 CHEN, G. *et al.* The SiaA/B/C/D signaling network regulates biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. **EMBO Journal**, v. 39, n. 6, p. 160–161, 2020.

78 NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2014.

79 LIU, C. *et al.* Insights into biofilm dispersal regulation from the crystal structure of the PAS-GGDEF-EAL region of RbdA from *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 200, n. 3, p. e00515-17, 2018.

80 WONG, S. S. **Chemistry of protein conjugation and cross-linking**. Boca Raton: CRC

Press, 1991.

81 HERMANSON, G. T. **Bioconjugate techniques**. 2nd ed. New York: Academic Press, 2008.

82 NOOREN, I. M. A.; THORNTON, J. M. Diversity of protein-protein interactions. **EMBO Journal**, v. 22, n. 14, p. 3486-3492, 2003.

83 PERKINS, J. R. *et al.* Transient protein-protein interactions: structural, functional, and network properties. **Structure**, v. 18, n. 10, p. 1233-1243, 2010.

84 AN, S.; WU, J.; ZHANG, L. H. Modulation of pseudomonas aeruginosa biofilm dispersal by a cyclic-di-gmp phosphodiesterase with a putative hypoxia-sensing domain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 24, p. 8160–8173, 2010.

85 CHRISTEN, M. *et al.* Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 35, p. 30829–30837, 2005.

86 BUCKSTEIN, M. H.; HE, J.; RUBIN, H. Characterization of nucleotide pools as a function of physiological state in Escherichia coli. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 2, p. 718-726, 2008.

87 HENGGE, R. Trigger phosphodiesterases as a novel class of c-di-GMP effector proteins. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: biological sciences**, v. 371, n. 1707, p. 20150498, 2016.

APÊNDICE A

Tabela 04 - *Primers* utilizados para amplificação e clonagem.

Referência	Sequência	Tamanho (bases)
LDP01:PA0169_001F	AACAGATTGGTGGATCCGTGCGGCTGGAGCGCATC	35
LDP33:PA0169_060F	AACAGATTGGTGGATCCTCGATCCGCGACCCGCTG	35
LDP02:PA0169_066F	AACAGATTGGTGGATCCACCGGCCTGCCAACCG	34
LDP03:PA0169_235R	TGCGGCCGCAAGCTTCTAGCGCGCTGGAGCCG	32
LDP04:PA3825_040F	AACAGATTGGTGGATCCAGCCTCCAGGAGACGTCCG	36
LDP05:PA3825_043F	AACAGATTGGTGGATCCGAGACGTCCGAGCAGGCAGC	37
LDP06:PA3825_259F	AACAGATTGGTGGATCCGTCGCCTCGCCCAGCAG	34
LDP07:PA3825_220R	TGCGGCCGCAAGCTTCTAGAAGCCCGACAGCACACGC	37
LDP08:PA3825_233R	TGCGGCCGCAAGCTTCTAGTTCTGCGAGCGAATCGATCGC	40
LDP09:PA3825_499R	TGCGGCCGCAAGCTTCTACATCGGCCGGCCGATCAG	36
LDP10:PA3825_512R	TGCGGCCGCAAGCTTCTATTCCTGCACAGTCAGGCTGGA	39
LDP34:PA3825_520R	TGCGGCCGCAAGCTTCTATGCGACGACGGAAGCCC	35
LDP11:PA3825_526R	TGCGGCCGCAAGCTTCTAGCCTCGGTCCGCCGG	33
LDP12:PA0285_059F	AACAGATTGGTGGATCCTACCTCTACCTGGTACGCCAGTTC	41
LDP13:PA0285_101F	AACAGATTGGTGGATCCACCGACCGGATGTTCTGTCTCG	38
LDP14:PA0285_194F	AACAGATTGGTGGATCCGACATCACCTGCAGCGGC	36
LDP15:PA0285_337F	AACAGATTGGTGGATCCACCGGCCTGCCAACCG	34
LDP16:PA0285_492F	AACAGATTGGTGGATCCACCCGCGTGCTGACCGC	34
LDP17:PA0285_195R	TGCGGCCGCAAGCTTCTAGATGTCGCGGGCCACGC	35
LDP18:PA0285_318R	TGCGGCCGCAAGCTTCTAGCTCAGGTCTGGAGAACACCCC	39
LDP19:PA0285_487R	TGCGGCCGCAAGCTTCTAGGCGTTACGCCCGCTGT	35
LDP20:PA0285_760R	TGCGGCCGCAAGCTTCTAGTCTTCCGGCAGCGC	33
LDP29:PA0575_026F	GAACAGATTGGTGGATCCACGCCCGAGGAACGGGC	35
LDP30:PA0575_038F	GAACAGATTGGTGGATCCAGCATCCGCCTGGGCATGG	37
LDP21:PA0575_296F	GAACAGATTGGTGGATCCGAGGTGAGTCGCCGGCG	35
LDP22:PA0575_298F	GAACAGATTGGTGGATCCAGTCGCCGGCGGCAATTG	36
LDP23:PA0575_302F	GAACAGATTGGTGGATCCCAATTGGAGCGCGAACTGCG	38
LDP24:PA0575_814F	GAACAGATTGGTGGATCCACCGGCCTGCCAATCG	35
LDP25:PA0575_970F	GAACAGATTGGTGGATCCACCCGCGAACTGACCTACCTG	39
LDP31:PA0575_256R	GAGTGCGGCCGCAAGCTTAGCCGACCCAGGGGGCCT	36
LDP32:PA0575_260R	GAGTGCGGCCGCAAGCTTAGTCGAGCAGGCCGCCGA	36
LDP26:PA0575_808R	GAGTGCGGCCGCAAGCTTAGGCCTGGTAGTCGAGCCG	37
LDP27:PA0575_967R	GAGTGCGGCCGCAAGCTTACTCGATGCGGCTGCGGC	36
LDP28:PA0575_1240R	GAGTGCGGCCGCAAGCTTAGGGAGCGCCAATCGGCTG	37

Observações: a temperatura média de hibridização é de 67 °C; a clonagem foi realizada com o vetor pet-SUMO.

Fonte: Elaborada pelo autor.