

SUMÁRIA SOUSA E SILVA

Estudos estruturais da proteína PelD de *Pseudomonas aeruginosa*: um receptor de c-di-GMP responsável pela produção de exopolissacarídeos e formação de biofilmes

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.

SÃO CARLOS - SP

2013

Título: Estudos estruturais da proteína PelD de *Pseudomonas aeruginosa*: um receptor de c-di-GMP responsável pela produção de exopolissacarídeos e formação de biofilmes

RESUMO

Os microrganismos podem apresentar-se tanto em forma de vida livre como aderidos a uma superfície ou interface ar-líquido, formando comunidades complexas e dinâmicas conhecidas como biofilmes. Nos últimos anos, com o avanço das pesquisas em nível molecular, foi identificado que a maioria das bactérias utilizam guanosina monofosfato (3'-5')-cíclica dimérica (c-di-GMP) como um segundo mensageiro. De forma geral, essa molécula controla a sinalização celular, virulência, comunicação entre células e a expressão de proteínas relacionadas com o fenótipo de biofilmes, em resposta à sua concentração intracelular. Sua síntese e degradação são controladas respectivamente por diguanilto ciclases (DGCs) contendo domínio GGDEF e fosfodiesterases (PDEs) que possuem os domínios EAL ou HD-GYP. Em *Pseudomonas aeruginosa* (PA14) foi identificada uma nova classe de receptor específico para c-di-GMP, a proteína transmembranar PelD, cuja porção citoplasmática contém os domínios GAF e GGDEF degenerado. Sua modulação através desse dinucleotídeo controla a produção de exopolissacarídeos pelos componentes do conservado *operon pel* e influencia diretamente na capacidade de formação de biofilmes. Devido à escassez de dados a respeito dos eventos moleculares do mecanismo de sinalização mediado por c-di-GMP, este trabalho teve como objetivo principal a caracterização biofísica/estrutural da proteína PelD, bem como o reconhecimento de interação entre este ligante e a porção citoplasmática da proteína. Diversas construções solúveis de PelD foram clonadas e expressas, sendo que uma delas foi cristalizada com sucesso e teve sua estrutura determinada por iodo-SAD. O modelo final apresentou os dois domínios com enovelamentos característicos das famílias GAF e GGDEF, sendo a interface interdomínios composta majoritariamente por resíduos hidrofóbicos. Visando uma compreensão das bases moleculares de reconhecimento e ativação de PelD por c-di-GMP, uma estrutura em complexo com o ligante foi resolvida. Como esperado, o dinucleotídeo foi encontrado no sítio inibitório do domínio GGDEF, onde o motivo R³⁶⁷xxD³⁷⁰ e o resíduo R⁴⁰² são responsáveis pela maior parte das interações com c-di-

GMP. No entanto, nenhuma grande mudança estrutural foi observada entre as formas apo e holo de PelD, ao contrário de outros sistemas efetores tal como LapD e domínios PilZ. Apenas uma molécula de c-di-GMP foi encontrada no sítio, contrastando com a forma dimérica intercalada normalmente ligada aos sítios inibitórios de domínios GGDEF, tais como em PleD e WspR. Estudos de ITC confirmaram a estequiometria 1:1 em solução. Isso mostra a versatilidade dos diversos receptores já identificados até o momento, frente à ligação desse dinucleotídeo. Estudos de bioinformática identificaram uma potencial região de *coiled-coil* na hélice juxtamembrana de PelD, resíduos 115-160. De modo geral, os resultados aqui apresentados não só contribuirão para o entendimento dos mecanismos de regulação das vias de sinalização mediadas por c-di-GMP como, em longo prazo, poderão levar ao desenvolvimento de agentes contra infecções bacterianas.

Palavras-chave: Biofilmes bacterianos. *Pseudomonas aeruginosa*. C-di-GMP. PelD

INTRODUÇÃO

Na maior parte da história da microbiologia, os microrganismos foram caracterizados como células livremente suspensas e descritos com base nas características de crescimento em meios de cultura nutricionalmente ricos. (1) A descoberta de um fenômeno microbiológico, descrita pela primeira vez por van Leeuwenhoek, que os microrganismos juntam-se e crescem universalmente em superfícies expostas, conduziram a estudos que revelaram microrganismos associados em superfícies (biofilmes) e que exibiam um fenótipo distinto no que diz respeito à taxa de transcrição de genes e do seu crescimento. (2) Estes biofilmes microbianos têm demonstrado induzir mecanismos específicos para fixação a uma superfície inicial de desenvolvimento, estrutura da comunidade e dos ecossistemas envolvidos. Além disso, os biofilmes apresentam grande importância para a saúde pública devido ao seu papel em certas doenças infecciosas e importância em uma variedade de infecções relacionadas a dispositivos médicos. (3) Uma melhor compreensão de processos de biofilme deve proporcionar novas e eficazes estratégias de controle do biofilme.

O biofilme consiste de colônias de bactérias inseridas em uma matriz polimérica extracelular por elas mesma produzida. (4) Essa estrutura estabelecida do biofilme compreende células microbianas e exopolissacarídeos (EPS), que apresenta uma arquitetura definida, e fornece um ambiente ideal para a troca de material genético entre as células. A mesma constitui ainda como forma de proteção que permite ao microrganismo sobreviver em ambientes adversos. Além disso, as células também podem comunicar através do sistema de *quorum sensing*, que por sua vez pode afetar processos do biofilme, como o desprendimento. (4-5)

Estima-se que mais de 90% dos microrganismos vivem sob a forma de biofilmes e praticamente não existe nenhuma superfície que não possa ser ou vir a ser colonizada por bactérias. (5-6) Quanto a sua composição, a mesma é dependente das condições do meio como: temperatura, composição do meio, pressão, pH e oxigênio (3-6) e não é necessariamente uniforme, podendo até englobar partículas sólidas (argilas, areias, partículas orgânicas) provenientes do meio onde está imerso. (7-8)

Dos microrganismos frequentemente encontrados no biofilme, as bactérias apresentam-se como o grupo predominante. As elevadas taxas de reprodução, grande capacidade de adaptação e de produção de substâncias e estruturas extracelulares, são as principais características que fazem das bactérias organismos com grandes capacidades de produção de biofilme. (9-10) *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Staphylococcus*, são os gêneros mais comuns de bactérias produtoras de biofilme ainda que umas apresentem, naturalmente, uma maior aptidão que outras. A família de bactérias mais pesquisada, em termos de adesão a superfícies pertence à *Pseudomonadaceae*, sendo o gênero *Pseudomonas* o mais estudado. (3)

A bactéria patogênica *Pseudomonas aeruginosa* por sua vez, produz uma matriz extracelular, os exopolissacarídeos (EPS) que têm despertado grande interesse em aplicações industriais e na área médica, (11) como também têm sido considerados como um problema, interferindo nos mecanismos imunológicos contra infecções bacterianas. (12-13,14) Apesar dos EPS serem os componentes da matriz extracelular mais estudado, existe uma grande variedade de EPS que ainda permanece não caracterizada. Por exemplo, o exopolissacarídeo produzido durante a formação de biofilmes por um conjunto de genes presentes em *Pseudomonas aeruginosa*, não apresenta estrutura e composição conhecida. (15-18)

Nos últimos anos, com o avanço das pesquisas em nível molecular, foi identificado que a maioria das bactérias inclusive *Pseudomonas aeruginosa*, utilizam guanosina monofosfato (3'-5')-cíclica dimérica (c-di-GMP) como um segundo mensageiro.(19-23) De forma geral, essa molécula controla a sinalização celular, virulência, comunicação entre células e a expressão de proteínas relacionadas com o fenótipo de biofilmes, em resposta à sua concentração intracelular. Sua síntese e degradação são controladas respectivamente por diguanilto ciclases (DGCs) contendo domínio GGDEF e fosfodiesterases (PDEs) que possuem os domínios EAL ou HD-GYP. (24-25) Em *Pseudomonas aeruginosa* (PA14) foi identificada uma nova classe de receptor específico para c-di-GMP, a proteína transmembranar PelD, cuja porção citoplasmática contém os domínios GAF e GGDEF degenerado. (26-28) Sua modulação através desse dinucleotídeo controla a produção de exopolissacarídeos pelos componentes do conservado *operon pel* e influencia diretamente na capacidade de formação de biofilmes. (29-30)

Devido à escassez de dados a respeito dos eventos moleculares do mecanismo de sinalização mediado por c-di-GMP, este trabalho teve como objetivo principal realizar a caracterização estrutural da proteína PelD de *Pseudomonas aeruginosa* (PA14) para compreender seu mecanismo de ativação por c-di-GMP. Para tanto foi necessário determinar protocolos de expressão e purificação para as construções solúveis da porção citoplasmática da proteína transmembranar PelD de *Pseudomonas aeruginosa* (PA14), cristalizar e resolver a estrutura da mesma com e sem o ligante c-di-GMP e por fim realizar estudos em solução com PelD para investigar suas formas oligoméricas e afinidade por c-di GMP.

CONCLUSÕES

O trabalho aqui apresentado teve como foco o estudo biofísico e estrutural de construções solúveis da proteína PelD de *Pseudomonas aeruginosa* (PA14), com e sem o dinucleotídeo c-di-GMP. Nossa contribuição para tanto se baseou na determinação dos protocolos de clonagem, expressão e purificação, bem como o estudo estrutural de interação de PelD com c-di-GMP. E também foi realizada a determinação de parâmetros termodinâmicos frente à ligação com o c-di-GMP, utilizando técnicas analíticas e físico-químicas.

Concluiu-se, portanto através das estruturas cristalográficas de PelD que a mesma apresenta os domínios GAF e GGDEF degenerado na sua porção citoplasmática, assim como previsto por bioinformática e também que apenas uma molécula de c-di-GMP liga-se ao domínio GGDEF degenerado. Sendo que, essa estequiometria foi confirmada pela técnica de ITC, onde a mesma mostrou-se de 1:1.

Devido a grande complexidade nas vias de sinalização mediadas por c-di-GMP, esse trabalho contribuiu significativamente para o entendimento do processo de sinalização relacionado ao polissacarídeo pel, pois a proteína PelD é essencial para sua formação.

REFERÊNCIAS

- 1 TORTORA, G. J. F.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 8 ed. Porto Alegre: Artemed, 2005. 894 p.
- 2 GEST, H. The discovery of microorganisms revisited. *Features*, v. 70, n. 6, p. 269-274, 2004.
- 3 ROMEO, T. (ed.) *Bacterial biofilms: current topics in microbiology and immunology*. Berlin: Springer Verlag, 2008. (Current Topics in Microbiology and Immunology, v. 322).
- 4 COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.; LAPPIN-SCOTT, H.M. Microbial biofilms. In: *Annual Review of Microbiology*, v. 49, p. 711-745, 1995. DOI: 10.1146/annurev.mi.49.100195.003431.
- 5 COSTERTON, J. W; LEWANDOWSKI, Z. The biofilm lifestyle. *Advances in Dental Research*, v. 11, n. 1, p. 192-195, 1997.
- 6 O'TOOLE, G.; KAPLAN; H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*, v. 54, p. 49-79, 2000. DOI: 10.1146/annurev.micro.54.1.49
- 7 PLAKUNOV, Y. A. N. V. K. Biofilm - “City of Microbes” or an analogue of multicellular organisms? *Microbiology*, v. 76, n. 2, p. 149–163, 2007.
- 8 BRANDA, S. S.; VIK, A.; FRIEDMAN, L.; KOLTER, R. Biofilms: the matrix revisited. *TRENDS in Microbiology*, v. 13, n. 1, p. 20-26, 2005.
- 9 DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, v. 8, n. 9, p. 881-890, 2002.
- 10 ALEXANDER, M. Microbial communities and interactions: a prelude. In: HURST, C.J. (Ed.) *Manual of environmental microbiology*. Washington: AMS Press, 1997. p. 5-13.
- 11 VU, B.; CHEN, M.; CRAWFORD, R. J.; IVANOVA, E. P. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules*, v. 14, n. 7, p. 2535-2554, 2009.
- 12 MELCHIOR, M. B.; VAARKAMP, H.; FINK-GREMMELS, J. Biofilms: a role in recurrent mastitis infections? *Veterinary Journal*, v. 171, n. 3, p. 398-407, 2006.
- 13 XAVIER, J. B.; PICIOREANU, C.; ALMEIDA, J. S.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. *Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes*. *Boletim de Biotecnologia: biomatemática-modelação da estrutura de biofilmes*. Disponível em: < www.biofilmes.bt.tudelft.nl/pdf/2002_jxavier_biofilmes.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2012.

- 14 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.
- 15 ANJULI-MEHROTRA, M. D. Bacterial biofilms. *Pediatric Asthma, Allergy & Immunology*, v. 20, n. 3, p. 191-195, 2007.
- 16 MADIGAN, M. T. et al. *Microbiologia de Brock*. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160 p.
- 17 VAN HOUTDT, R.; MICHIELS, C. W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of Applied Microbiology*, v. 109, n. 4, p. 1117-1131, 2010.
- 18 ELIAS, S.; BANIN, E. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 36, n. 5, p. 990-1004, 2012.
- 19 JENAL, U.; MALONE, J. Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annual Review of Genetics*, v. 40, p. 385-407, 2006.
- 20 D'ARGENIO, D. A.; MILLER, S. I. Cyclic di-GMP as a bacterial second messenger. *Microbiology*, v. 150, p. 2497-2502, 2004. DOI 10.1099/mic.0.27099-0.
- 21 HENGGE, R. Principles of c-di-GMP signaling in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, v. 7, n. 4, p. 263-273, 2009.
- 22 SONDERMANN, H.; SHIKUMA, N. J.; YILDIZ, F. H. You've come a long way: c-di-GMP signaling. *Current Opinion in Microbiology*, v. 15, n. 2, p. 140-146, 2012.
- 23 CHRISTEN, B.; CHRISTEN, M.; PAUL, R.; SCHMID, F.; FOLCHER, M.; JENOE, P.; MEUWLY, M.; JENAL, U. Allosteric control of cyclic-di-GMP signaling. *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 42, p. 32015-32024, 2006.
- 24 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.
- 25 SONDERMANN, H.; SHIKUMA, N. J.; YILDIZ, F. H. You've come a long way: c-di-GMP signaling. *Current Opinion in Microbiology*, v. 15, n. 2, p. 140-146, 2012.
- 26 LEE, V. T.; MATEWISH, J. M.; KESSLER, J. L.; HYODO, M.; HAYAKAWA, Y.; LORY, S. A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Molecular Microbiology*, v. 65, n. 6, p. 1474-1484, 2007.
- 27 FRANKLIN, M. J.; NIVENS, D. E.; WEADGE, J. T.; HOWELL, P. L. Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, alginate, Pel, and Psl. *Frontiers in Microbiology: cellular and infection microbiology*, v. 2, p. 167, 2011. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00167.
- 28 FRIEDMAN, L.; KOLTER, R. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Molecular Microbiology*, v. 51, n. 3, p. 675-690, 2004.

29 WHITNEY, J. C.; COLVIN, K. M.; MARMONT, L. S.; ROBINSON, H.; PARSEK, M. R.; HOWELL, P. L. Structure of the cytoplasmic region of PelD, a degenerate diguanylate cyclase receptor that regulates exopolysaccharide production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 287, n. 28, p. 23582-23593, 2012.

30 LI, Z.; CHEN, J. H.; HAO, Y.; NAIR, S. K. Structures of the PelD cyclic diguanylate effector involved in pellicle formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Biological Chemistry*, v. 287, n. 36, p. 30191-30204, 2012.