

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**Ciências**  
**ULisboa**

**Biologia Estrutural e Molecular de uma Proteína de Virulência  
de *Chlamydia trachomatis***

Catarina Neves Simões

**Mestrado em Microbiologia Aplicada**

Dissertação orientada por:  
Professor Doutor Luís Jaime Mota  
Professora Doutora Mónica Vieira Cunha



# **Biologia Estrutural e Molecular de uma Proteína de Virulência de *Chlamydia trachomatis***

**Catarina Neves Simões**

**2021**

O trabalho apresentado nesta dissertação de mestrado foi realizado na NOVA School of Science and Technology | FCT NOVA, da Universidade NOVA de Lisboa, numa parceria entre o Departamento de Ciências da Vida e o Departamento de Química. O projeto foi desenvolvido sob a orientação do Professor Doutor Luís Jaime Mota e coorientação do Doutor Cristiano Mota. A Professora Doutora Mónica Vieira Cunha foi a orientadora interna designada no âmbito do Mestrado em Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

## Agradecimentos

As minhas primeiras palavras de agradecimento são dirigidas ao Professor Doutor Luís Jaime Mota (Departamento de Ciências da Vida, FCT NOVA) e ao Doutor Cristiano Mota (Departamento de Química, FCT NOVA) pela orientação deste trabalho, exigência e oportunidade de aprendizagem em áreas de investigação muito atuais. O estudo desenvolvido, aqui apresentado, foi apoiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia através dos projetos UIDP/04378/2020 e UIDB/04378/2020, da Unidade de Investigação em Biociências Moleculares Aplicadas (UCIBIO), e do projeto LA/P/0140/2020 do Laboratório Associado Instituto para a Saúde e a Bioeconomia (i4HB).

Agradeço à Professora Doutora Mónica Vieira Cunha (FCUL) por assegurar a orientação interna desta dissertação, bem como a revisão sumária do documento escrito; e, em particular, à Professora Doutora Lélia Chambel (FCUL), pela disponibilidade no esclarecimento de dúvidas sobre a redação da tese.

A todos os colegas dos laboratórios em que tive oportunidade de trabalhar, e em especial às colegas do DCV (FCT NOVA), um “muito obrigado” por me receberem bem, por me acompanharem bem e por toda a simpatia que demonstraram. Um agradecimento especial à Maria Luís que sempre me ajudou de forma muito competente.

Agradeço ainda às minhas colegas de trabalho por me terem permitido dedicar de forma mais vinculada a este projeto e, por último, à minha família que sempre me apoiou.

## Resumo

*Chlamydia trachomatis* é um agente bacteriano de infecções em humanos, principalmente associadas ao sistema ocular e trato genital, com repercussão na saúde pública. Apresenta um ciclo de vida intracelular obrigatório, replicando-se no interior de um vacúolo, denominado de inclusão. Durante o seu ciclo de desenvolvimento, a bactéria produz várias proteínas (Incs) que são transportadas para a membrana da inclusão por um sistema de secreção de tipo III (T3SS), contribuindo para a sua virulência. Neste trabalho, estudámos a proteína IncM de *C. trachomatis*, que está envolvida na inibição da citocinese de células hospedeiras, com o objetivo geral de caracterizá-la para melhor compreender a sua função. Excluída a hipótese inicial de que a IncM poderia coordenar grupos hemo, trabalhámos na otimização das condições de purificação de IncM para posterior análise estrutural, por cristalografia de raios X, e na caracterização de estirpes de *C. trachomatis* mutantes, produzindo ortólogos de diferentes serovares de *C. trachomatis* e espécies de *Chlamydia*. Os resultados mais relevantes foram a clivagem da cauda de histidinas localizada no N-terminal da IncM recombinante, com trombina, e a evidência de que a interferência de IncM na divisão de células hospedeiras é conservada. Finalmente, baseado na possível homologia estrutural de IncM com proteínas eucarióticas da família bicaudal D (BICD), construíram-se estirpes de *C. trachomatis* produzindo IncM mutantes e analisou-se se as regiões mutadas seriam relevantes na inibição da citocinese de células infetadas, o que abriu também portas a novos estudos sobre a possível interação de IncM com o citosqueleto e/ou complexo de Golgi. Nesta última abordagem, a construção e caracterização de uma estirpe de *C. trachomatis* que produz uma proteína IncM mutante sem um dos seus quatro domínios “coiled-coil” contribuiu para suportar a ideia de que a localização de IncM na membrana da inclusão é importante para a sua função.

**Palavras-chave:** patogénese bacteriana; *Chlamydia trachomatis*; proteínas Inc; expressão e purificação de proteínas; divisão celular.

## Abstract

*Chlamydia trachomatis* serovars are obligate intracellular human pathogens, causing mainly ocular and genital infections with effects on public health, that replicate within a vacuole termed an inclusion. Throughout the *C. trachomatis* developmental cycle, several bacterial proteins (Incs) are delivered into the inclusion membrane by a type III secretion system (T3SS), contributing to the virulence of this pathogen. In this project, we studied the molecular and structural biology of *C. trachomatis* IncM, which is involved in inhibition of host cells cytokinesis, to better understand its function. Once excluding that IncM could bind the heme group, first we worked on optimizing the purification conditions of IncM for further structural analysis by X-ray crystallography; and then, on the characterization of mutant *C. trachomatis* strains producing orthologs of different *C. trachomatis* serovars and *Chlamydia* species. The most relevant results were the cleavage of the N-terminal histidine tail of recombinant IncM protein, with thrombin, and the evidence that IncM interference in host cell division is conserved. Finally, based on possible structural homology with eukaryotic proteins of bicaudal D family (BICD), we constructed *C. trachomatis* strains producing mutant IncM proteins and it was analyzed whether the mutated regions would be relevant in the inhibition of infected cells cytokinesis, also opening the door to future new studies about the relationship between IncM and cytoskeleton and/or Golgi apparatus. In this last approach, the construction and characterization of a strain of *C. trachomatis* that produces a mutant IncM protein without one of its four “coiled-coil” domains helped to support the idea that the location of IncM in the inclusion membrane is important for its function.

**Keywords:** bacterial pathogenesis; *Chlamydia trachomatis*; Inc proteins; protein expression and purification; cell division.

# Índice

	Página
<b>Agradecimentos</b> .....	II
<b>Resumo</b> .....	III
<b>Abstract</b> .....	IV
<b>Índice</b> .....	V
<b>Lista de Figuras</b> .....	VII
<b>Lista de Tabelas</b> .....	VIII
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	IX
<b>1. Introdução</b> .....	1
1.1. <i>Chlamydiae</i> .....	1
1.2. <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	3
1.3. Ciclo de desenvolvimento de <i>C. trachomatis</i> .....	4
1.4. Sistema de secreção de tipo III (T3SS) .....	5
1.5. Proteínas transportadas para o exterior da inclusão .....	7
1.6. Proteínas inseridas na membrana da inclusão (Incs) .....	8
1.7. Biologia estrutural de proteínas Inc .....	9
1.8. Proteína IncM de <i>C. trachomatis</i> .....	11
1.9. A possível ligação de IncM ao hemo .....	12
1.10. O hemo .....	14
1.11. Objetivos .....	17
<b>2. Materiais e Métodos</b> .....	18
2.1. Manipulação e crescimento de estirpes de <i>Escherichia coli</i> .....	18
2.2. Plasmídeos, oligonucleótidos e manipulação de DNA .....	18
2.3. Caracterização da ligação do hemo <i>b</i> à IncM .....	18
2.4. Produção de IncM de larga escala e purificação .....	19
2.5. Clivagem da cauda de histidinas da IncM e otimização .....	20
2.6. Linhagens de células de mamíferos .....	20
2.7. Manutenção e manipulação de estirpes de <i>C. trachomatis</i> .....	20
2.7.1. Infecção de células HeLa 229 .....	21
2.7.2. Transformação de <i>C. trachomatis</i> .....	21
2.7.3. Isolamento de clones de <i>C. trachomatis</i> (ensaio em placa) .....	21
2.7.4. Quantificação de partículas infecciosas .....	22
2.8. Preparação de lisados celulares e reinfeção de células HeLa 229 .....	22
2.9. Anticorpos e marcadores de fluorescência .....	23
2.10. <i>Immunoblotting</i> .....	23
2.11. Microscopia de imunofluorescência .....	23
2.12. Análise estatística .....	24
<b>3. Resultados</b> .....	25
<b>3.1 – Possível ligação de IncM de <i>C. trachomatis</i> ao hemo</b> .....	25

3.1.1. Produção de IncM “wild type” e variantes em <i>E. coli</i> .....	25
3.1.2. IncM de <i>C. trachomatis</i> não liga o hemo <i>b</i> .....	28
3.1.3. Purificação de IncM e otimização das condições para análise estrutural por cristalografia de raios X .....	32
<b>3.2 – Pesquisa de aminoácidos em IncM importantes para a sua função</b> .....	36
3.2.1. Alinhamento entre proteínas IncM de diferentes serovares de <i>C. trachomatis</i> e espécies de <i>Chlamydia</i> .....	36
3.2.2. Caracterização de estirpes de <i>C. trachomatis</i> que produzem IncM de diferentes serovares de <i>C. trachomatis</i> e espécies de <i>Chlamydia</i> .....	39
3.2.3. A capacidade de IncM induzir a multinucleação é conservada entre serovares de <i>C. trachomatis</i> e espécies de <i>Chlamydia</i> .....	43
3.2.4. Possível homologia estrutural entre IncM e proteínas eucarióticas da família bicaudal D .....	46
3.2.5. Construção de estirpes de <i>C. trachomatis</i> que produzem proteínas IncM mutantes, baseado na possível homologia estrutural com proteínas da família BICD .....	48
3.2.6. Caracterização das estirpes de <i>C. trachomatis</i> que produzem IncM(A343V), IncM(TA342VV) e IncM( $\Delta$ CC2 <sub>324-391</sub> ) .....	50
<b>4. Discussão de Resultados</b> .....	54
4.1. A proteína IncM de <i>C. trachomatis</i> não liga o hemo .....	54
4.2. Otimização do protocolo da purificação de IncM .....	55
4.3. Inibição da citocinese de células hospedeiras por <i>Chlamydia</i> e papel da IncM .....	55
4.4. Regiões e aminoácidos de IncM importantes para a sua função .....	56
4.5. Trabalho futuro .....	57
<b>5. Conclusões</b> .....	59
<b>Referências</b> .....	60
<b>Anexos</b> .....	64

## Lista de Figuras

Figura	Página
1.1	Árvore filogenética da Família <i>Chlamydiaceae</i> ..... 2
1.2	Ciclo de desenvolvimento de <i>C. trachomatis</i> ..... 4
1.3	Sistema de secreção de tipo III (T3SS) em <i>C. trachomatis</i> ..... 6
1.4	Proteínas de <i>C. trachomatis</i> inseridas na membrana da inclusão (Incs) ..... 8
1.5	Representação estrutural e topologia da proteína IncA de <i>C. trachomatis</i> ..... 10
1.6	Ensaio para a purificação, caracterização e cristalização de IncM ..... 13
1.7	Estrutura química e exemplos da ligação do ferro em hemos ..... 14
3.1.1	Representação da estrutura primária e topologia de IncM de <i>C. trachomatis</i> ..... 26
3.1.2	Estratégia usada para a mutagenese dirigida de <i>incM</i> ..... 27
3.1.3	Construção de plasmídeos derivados de pET28b+ codificando IncM mutantes ... 28
3.1.4	Produção de IncM e variantes a partir de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ..... 29
3.1.5	Espectros UV-visível para membranas solubilizadas, na forma oxidada e na forma reduzida ..... 30
3.1.6	Purificação de IncM e variantes por IMAC em coluna HisTrap FF de íons níquel 31
3.1.7	Solubilização de membranas em diferentes detergentes e determinação do rácio trombina:IncM para a clivagem da cauda de histidinas ..... 32
3.1.8	Purificação de IncM por IMAC após digestão com trombina ..... 33
3.1.9	Purificação de IncM por SEC após passagem numa coluna S200 ..... 34
3.1.10	Clivagem da cauda de histidinas com trombina ..... 35
3.2.1	Alinhamento de sequências de IncM de diferentes serovares de <i>C. trachomatis</i> 37
3.2.2	Alinhamento de sequências de IncM de diferentes espécies de <i>Chlamydia</i> ..... 38
3.2.3	Produção de IncM e homólogos. Comparação entre o crescimento de diferentes estirpes de <i>C. trachomatis</i> ..... 40
3.2.4	Localização de IncM e homólogos em células HeLa 299 infetadas com <i>C. trachomatis</i> ..... 41
3.2.5	Comparação do fenótipo de multinucleação de células hospedeiras para infeções com diferentes estirpes de <i>C. trachomatis</i> ..... 45
3.2.6	Representação esquemática de proteínas BICD ..... 47
3.2.7	Estratégia usada para a mutagenese dirigida de <i>incM</i> na construção das estirpes de <i>C. trachomatis</i> IncM <sub>A343V</sub> , IncM <sub>TA342VV</sub> e IncM <sub>ΔCC2(324-391)</sub> ..... 48
3.2.8	Construção de plasmídeos derivados de pSVP247 codificando IncM mutantes .. 49
3.2.9	Produção de IncM(A343V), IncM(TA342VV) e IncM(ΔCC2 <sub>324-391</sub> ) de <i>C. trachomatis</i> ..... 50
3.2.10	Localização de IncM(A343V), IncM(TA342VV) e IncM(ΔCC2 <sub>324-391</sub> ) em células HeLa 229 infetadas com <i>C. trachomatis</i> ..... 52
3.2.11	Multinucleação de células infetadas com estirpes de <i>C. trachomatis</i> produzindo IncM(A343V), IncM(TA342VV) ou IncM(ΔCC2 <sub>324-391</sub> ) ..... 53

## Lista de Tabelas

<b>Tabela</b>		<b>Página</b>
1.1	Distribuição de ligandos axiais para hemos de tipos <i>b</i> e <i>c</i> .....	15
A.1	Estirpes de <i>Escherichia coli</i> usadas neste trabalho .....	64
A.2	Plasmídeos utilizados neste trabalho .....	65
A.3	Oligonucleótidos utilizados neste trabalho .....	68
A.4	Estirpes de <i>Chlamydia trachomatis</i> usadas neste trabalho .....	70

## Lista de Abreviaturas

ATCC	American Type Culture Collection
BICD	Proteínas da família bicaudal D
BICDR1	“Bicaudal D-related 1”
BICDR2	“Bicaudal D-related 2”
BLAST	“Basic local alignment search tool”
CC	“Coiled-coil”
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol
DDM	n-Dodecyl $\beta$ -maltoside
DMEM	“Dulbecco’s modified of Eagle’s medium”
EB	“Elementary body”
ECACC	European Collection of Cell Culture
FBS	“Fetal bovine serum”
FPLC	“Fast protein liquid chromatography”
FT	“Flow through”
GGTase	“Geranilgeraniltransferase”
HBSS	“Hank’s balanced salt solution”
HIP1R	“Huntingtin-interacting protein-1 related”
HIV	“Human immunodeficiency virus”
IFUs	“Inclusion forming units”
IMAC	“Immobilized metal-ion affinity chromatography”
Incs	“Inclusion membrane proteins”
LA	“Lysogeny broth agar”
LB	“Lysogeny broth”
LGV	Linfogranuloma venéreo
LIC 1	“Light intermediate chain 1”
MCL	“Myeloid cell leukemia”
MOI	“Multiplicity of infection”
MOMP	“Major outer membrane protein”
mRNA	RNA mensageiro
NPS	“Nitrogen, phosphorus and sulfur solution”
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	“Phosphate-buffered saline”
PDB	Protein Data Bank
pDNA	DNA plasmídico
PX	“Phox” (fosfatidilinositol-3-monofosfato)
RB	“Reticulate body”
rRNA	RNA ribossomal
S200	Superdex 200
SDS-PAGE	“Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis”
SEC	“Size-exclusion chromatography”
SLD1	“SNARE like domain 1”
SLD2	“SNARE like domain 2”
SNARE	“Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor”

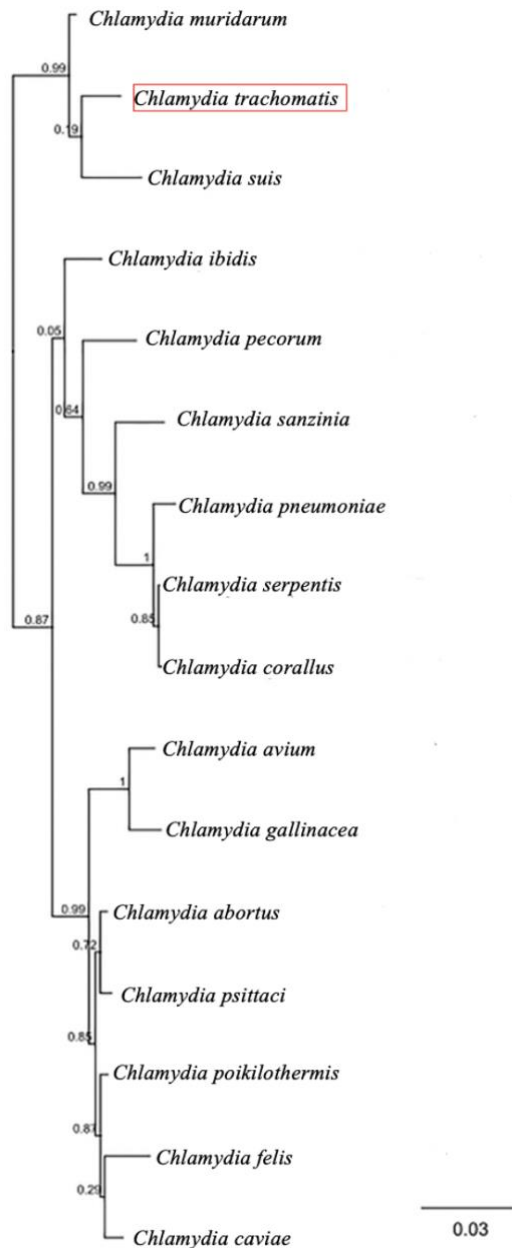
SNX	“Sorting nexin”
SPG	“Sucrose-phosphate-glutamate”
T2SS	“Type II secretion system”
T3SS	“Type III secretion system”
T5SS	“Type V secretion system”
T25	Frasco com uma área de superfície de 25 cm <sup>2</sup>
T75	Frasco com uma área de superfície de 75 cm <sup>2</sup>
2HA	Duplo epítipo de hemaglutininas de <i>Influenza</i>
6xHis	Cauda de hexahistidinas

# 1. Introdução

## 1.1. *Chlamydiae*

Os membros do Filo *Chlamydiae*, compreendendo uma Classe (*Chlamydia*) e uma Ordem (*Chlamydiales*), formam um grupo de bactérias Gram-negativas caracterizadas pelo crescimento intracelular obrigatório em células eucarióticas de vertebrados, invertebrados e organismos unicelulares, como amibas [1]. Na generalidade, as *Chlamydiae* têm genomas substancialmente reduzidos que carecem de muitas enzimas metabólicas, o que torna estas bactérias dependentes do hospedeiro em muitos processos biológicos [2].

A Ordem *Chlamydiales* inclui a família *Chlamydiaceae* e oito famílias adicionais, filogeneticamente relacionadas com base na sequência de genes que codificam para o RNA ribossomal (rRNA) 16S [3]. *Chlamydiaceae* é a família mais caracterizada e inclui atualmente 16 espécies, das quais três infetam humanos: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae* e *Chlamydia psittaci*. *C. trachomatis* está principalmente associada a infeções genitais e oculares (tracoma) [1]; *C. pneumoniae* a infeções respiratórias, resultando em pneumonias atípicas [4], e *C. psittaci* a infeções respiratórias nas aves, podendo a sua transmissão em humanos ocorrer por inalação de aerossóis, contendo bactérias provenientes de fezes de aves doentes [5]. Os parentes mais próximos de *C. trachomatis* são encontrados nas espécies de *Chlamydia* que infetam ratos (*C. muridarum*) e suínos (*C. suis*; Figura 1.1) [5], embora outras espécies classificadas no mesmo género tenham sido isoladas de diversos animais. *C. muridarum* é o agente de pneumonia em camundongos [6] e *C. suis* o agente de conjuntivite, enterite e pneumonia em suínos [4, 6]. *C. avium*, *C. ibidis* e *C. gallinacea* são a principal causa de infeções do trato respiratório em aves [4] e as espécies *C. abortus* e *C. pecorum*, responsáveis por infeções em ruminantes [5]. *C. abortus* está na etiologia do aborto ovino, podendo, no entanto, infetar outros animais de produção doméstica [6]. Esporadicamente, esta espécie tem a capacidade de colonizar a placenta humana, com risco de causar aborto ou trabalho de parto prematuro em mulheres grávidas que tenham contactado, previamente, com animais doentes [6]. *C. caviae* tem como hospedeiro exclusivo o porquinho-da-índia [6] e, tal como *C. muridarum*, são utilizados como modelos de infeção do trato genital por *Chlamydia* spp. [4]. Finalmente, *C. felis* promove infeções em gatos, com potencial risco zoonótico para o contágio humano [6]. Mais recentemente, foram identificadas as espécies *C. serpentis*, *C. poikilothermis*, *C. corallus* e *C. sanzinia* em serpentes e tartarugas [4].



**Figura 1.1 – Árvore filogenética da família *Chlamydiaceae*.** A imagem foi retirada de um artigo sobre o desenvolvimento de vacinas para *Chlamydiae*, que apresenta uma análise filogenética de diferentes espécies da família *Chlamydiaceae*, baseada na comparação de sequências de DNA que codificam para rRNA 16S [4]. Atualmente, a família *Chlamydiaceae* inclui 16 espécies, das quais três infetam humanos: *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* e *C. psittaci*. *C. trachomatis* tem como único hospedeiro o Homem. Os seus parentes mais próximos foram isolados de ratos (*C. muridarum*) e suínos (*C. suis*). Casos de transmissão zoonótica foram reportados para as espécies *C. psittaci*, *C. abortus*, *C. felis*, *C. caviae* e *C. suis*. Adaptado de [4].

A maioria das proteínas produzidas por *Chlamydia* spp. é comum entre espécies, o que reflete a conservação genética e as restrições evolutivas, impostas por um ciclo de vida intracelular e desenvolvimento bifásico, característicos destas bactérias [1, 2]. As espécies de *Chlamydia* produzem um grande número de proteínas de virulência, estimando-se que representem, de entre as excretadas, cerca de 10 % das proteínas codificadas no seu genoma [2]. A maioria dessas proteínas é transportada para a célula hospedeira através de um sistema de secreção de tipo III (T3SS), presente em todas as *Chlamydiae* e em várias bactérias Gram-negativas, patogénicas para animais e plantas [2, 7]. Para além

do T3SS, existem outros sistemas de secreção especializados no transporte de outras proteínas: no caso de *C. trachomatis*, para a superfície bacteriana (sistema de secreção tipo V – T5SS) e lúmen da inclusão (sistema de secreção tipo II – T2SS) [1].

## 1.2. *Chlamydia trachomatis*

O genoma de *C. trachomatis* compreende um cromossoma de 1,04 Mb [2, 8] e um plasmídeo altamente conservado de 7,5 kb (codificando para as glicoproteínas pGPs 1 – 8 e dois pequenos RNAs [1]), presente em várias cópias (7 – 10) dentro da célula [8]. Pode ocorrer recombinação genética entre estirpes de *C. trachomatis* contribuindo para a diversidade da espécie [6, 8], muito embora as evidências indiquem que este fenómeno seja limitado em *Chlamydiae* [2, 6]. Estirpes que infetam diferentes subgrupos numa população alvo são geneticamente distintas [6, 8].

*C. trachomatis* subdivide-se em três biovars: ocular, urogenital e linfogranuloma venéreo (LGV). As estirpes que causam tracoma ocular compreendem os serovares A a C; as estirpes responsáveis por patologia do trato genital incluem os serovares D a K e as estirpes que causam LGV são representadas pelos serovares L1 a L3. As *C. trachomatis* de serovar A – K infetam células epiteliais oculares e genitais; as estirpes dos serovares L1 – L3 são transmitidas sexualmente e, para além de infetarem células epiteliais, multiplicam-se em nódulos linfáticos, sendo capazes de infetar macrófagos [1, 2]. Por essa razão, resultam numa forma de doença urogenital ou anorretal invasiva, apesar de menos comum [1, 2]. As estirpes que causam infeção urogenital (serovares D – K) são as mais prevalentes [1].

Geralmente, o que é usado para diferenciar estirpes de diferentes biovars é a principal proteína da membrana externa (“major outer membrane protein” – MOMP) e, por isso, a serotipagem baseia-se na caracterização de MOMP, através da utilização de anticorpos monoclonais [6, 8]. Este método tem vindo, no entanto, a ser substituído por técnicas de tipagem molecular, fundamentadas na sequenciação do gene *ompA* que codifica para MOMP [6, 8]. As técnicas de tipagem molecular têm maior poder de resolução na deteção e discriminação de estirpes, uma vez que prescindem de culturas celulares para as infeções bacterianas e da necessidade de um painel disponível de anticorpos monoclonais – dois fatores que afetam a sensibilidade dos testes baseados na serologia [6, 8].

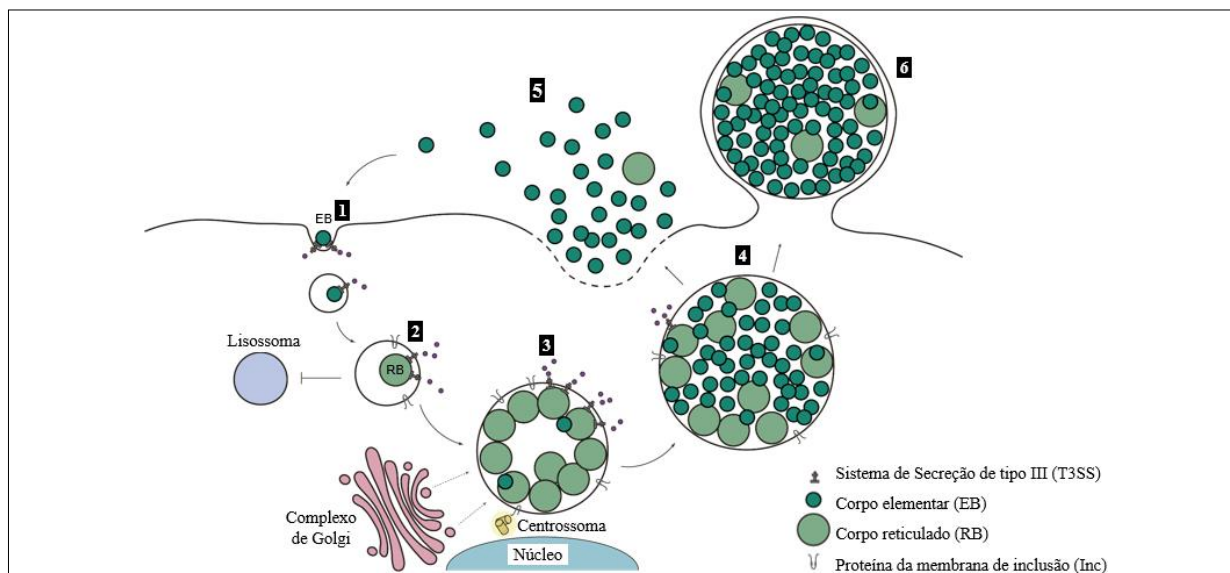
O tracoma é uma doença ocular resultante de infeção por *C. trachomatis*, de serovares A – C, sendo responsável pela cegueira irreversível ou deficiência visual de cerca de 2,8 milhões de pessoas em 43 países do mundo – onde se prevê que a doença é endémica – segundo os dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), para o ano de 2020 [9]. A doença transmite-se por contacto direto ou indireto de secreções oculares e/ou nasais de pessoas infetadas. É considerado um problema de saúde pública e a estratégia de eliminação em vigor passa unicamente pela administração de antibióticos; os cuidados de higiene pessoal, como a limpeza facial e as melhorias das condições ambientais, atuam na prevenção da transmissão da doença [10]. Por outro lado, as infeções genitais causadas por *C. trachomatis*, de serovares D – K, fazem parte do grupo de doenças sexualmente transmissíveis com maior incidência mundial. A OMS estima que, em 2016, ocorreram cerca de 376 milhões de novos casos de doenças sexualmente transmissíveis, dos quais 127 milhões estão associados a infeção por *C. trachomatis* [11, 12]. Dados mais recentes preveem que estes valores se mantenham elevados [12]. Atualmente, *C. trachomatis* é o agente mais comum de uretrite não gonocócica com uma prevalência mundial de 1 – 6 % [8]. Admite-se que 80 % [4] destas doenças sexualmente transmissíveis sejam assintomáticas ou acompanhadas de sintomatologia leve, dificultando o diagnóstico da doença e podendo evoluir para

doença inflamatória pélvica, infertilidade e gravidez ectópica nas mulheres [2], ou epididimite e prostatite nos homens [8]. Estes indivíduos infetados, não sintomáticos, atuam como reservatório para a transmissão de infecções [8]. Há dados que indicam que a infecção por *C. trachomatis* pode facilitar a transmissão do vírus da imunodeficiência humana (“human immunodeficiency vírus – HIV) e está associada ao cancro cervical [2]. O risco de transmissão vertical é também elevado. O tratamento, quando possível, recorre ao uso de antibióticos [2].

### 1.3. Ciclo de desenvolvimento de *C. trachomatis*

As *Chlamydiae* [13] partilham um ciclo de desenvolvimento bifásico, alternando entre duas formas morfológica e funcionalmente distintas: corpo elementar (“elementary body” – EB), célula mais pequena (0,3 µm de diâmetro), infecciosa, não replicativa; e corpo reticulado (“reticulate body” – RB), célula maior (1 µm de diâmetro), não infecciosa, replicativa [1, 2]. O corpo elementar consegue sobreviver algum tempo em condições adversas, próprias do ambiente extracelular [2]. A sua parede celular é composta por uma rede de proteínas, estabilizada por ligações dissulfeto, formando o complexo de membrana externa [2], que constitui uma barreira física à pressão osmótica interna da célula [2]. Apesar de não replicativo, alguns estudos indicam que o corpo elementar tem elevada atividade metabólica e de biossíntese, dependendo de D-glucose-6-fosfato como fonte de energia [2].

O ciclo de desenvolvimento de *C. trachomatis* (Figura 1.2) tem sido muito estudado e é preconizado com base na infecção de culturas celulares, tendo a duração aproximada de 48 – 72 horas, consoante a estirpe. O desenvolvimento intracelular ocorre dentro de um vacúolo, designado de inclusão [1].



**Figura 1.2 – Ciclo de desenvolvimento de *C. trachomatis*.** *C. trachomatis* apresenta um ciclo de desenvolvimento bifásico alternando entre duas formas distintas: corpo elementar (EB) e corpo reticulado (RB). Primeiro, a bactéria na forma de EB, adere à célula hospedeira, formando uma inclusão nascente por invaginação da membrana celular (entre 0 – 2 horas após infecção) (1). Depois, a produção de proteínas de virulência (substratos de T3SS) pelas formas EB de *C. trachomatis* induz rearranjos no citoesqueleto da célula hospedeira, promovendo a internalização de EBs num vacúolo, designado de inclusão. No interior da inclusão, ocorre a diferenciação de EBs em RBs e são ativadas vias de sinalização do hospedeiro (2). A inclusão migra em direção ao núcleo da célula (entre 2 – 6 horas após infecção), interagindo com compartimentos celulares ricos em nutrientes. Ao longo do trajeto, a fusão lisossomal é inibida. Segue-se a replicação exponencial de RBs (entre 6 – 24 horas após infecção) (3) e a diferenciação assíncrona de RBs em EBs (entre 24 – 48 horas após infecção) (4), com posterior libertação de EBs/RBs por lise celular (5) ou extrusão da inclusão a partir da célula hospedeira (entre 48 – 72 horas após infecção) (6). Adaptado de [14].

Numa primeira fase, a bactéria, na forma de EB, adere à célula hospedeira, formando uma inclusão nascente por invaginação da membrana celular (Figura 1.2). Depois, as proteínas de virulência do T3SS de *C. trachomatis*, pré-sintetizadas no ciclo anterior e armazenadas nos EBs, são injetadas através da membrana da célula infetada para induzir rearranjos do citosqueleto que promovem a internalização de EBs num vacúolo, ativando vias de sinalização do hospedeiro (entre 0 – 2 horas, após infecção) [2]. No interior deste vacúolo, há diferenciação das formas EB em RB e a inclusão migra para o centro da célula, aproximando-se do núcleo (entre 2 – 6 horas, após infecção). Durante o processo da diferenciação entre formas bacterianas, a quantidade de complexos proteicos da membrana externa diminui, proporcionando a fluidez membranar necessária para a replicação exponencial de RBs (entre 6 – 24 horas, após infecção) [1, 2]. A inclusão contendo *C. trachomatis* é então transportada, ao longo de microtúbulos, para o centróssoma da célula, permitindo, durante o trajeto, a fusão homotípica e a interação com compartimentos ricos em nutrientes [2]. Este transporte é dependente de dineína [1].

Os RBs são especializados na aquisição de nutrientes que utilizam para o processo de replicação, com produção aumentada de ATP sintases, proteínas ribossomais e transportadores de nucleótidos [2]. Pensa-se que o contacto próximo com fragmentos do complexo de Golgi em torno da inclusão (Figura 1.2), corpos multivesiculares e retículo endoplasmático liso são algumas formas da bactéria adquirir lípidos [2]. O contacto com produtos de degradação de proteínas que resultam da digestão lisossomal permite, por sua vez, a aquisição de aminoácidos [2]. Deste modo, assume-se que a sobrevivência intracelular de *C. trachomatis* depende da capacidade da inclusão evitar a via endocítica e, simultaneamente, promover a fusão homotípica e o contacto com outros compartimentos celulares, de forma a proporcionar nutrientes às bactérias (Figura 1.2) [2].

A replicação exponencial de RBs ocorre próximo da região perinuclear, resultando no tamanho aumentado da inclusão (Figura 1.2), e é seguida de diferenciação assíncrona de RBs em EBs (entre 24 – 48 horas, após infecção). Finalmente, a libertação de RBs/EBs por lise celular ou extrusão da inclusão a partir da célula hospedeira (entre 48 – 72 horas, após infecção; Figura 1.2), marca o fim do ciclo de desenvolvimento de *C. trachomatis*. Na lise celular, há permeabilização antecipada da membrana da inclusão, culminando na morte da célula infetada; na extrusão, por sua vez, toda a inclusão é ejetada e a célula eucariótica permanece intacta [1, 2]. Alguns artigos publicados sugerem que a extrusão de *C. trachomatis* pode facilitar o contacto futuro da bactéria com células dendríticas e macrófagos [1].

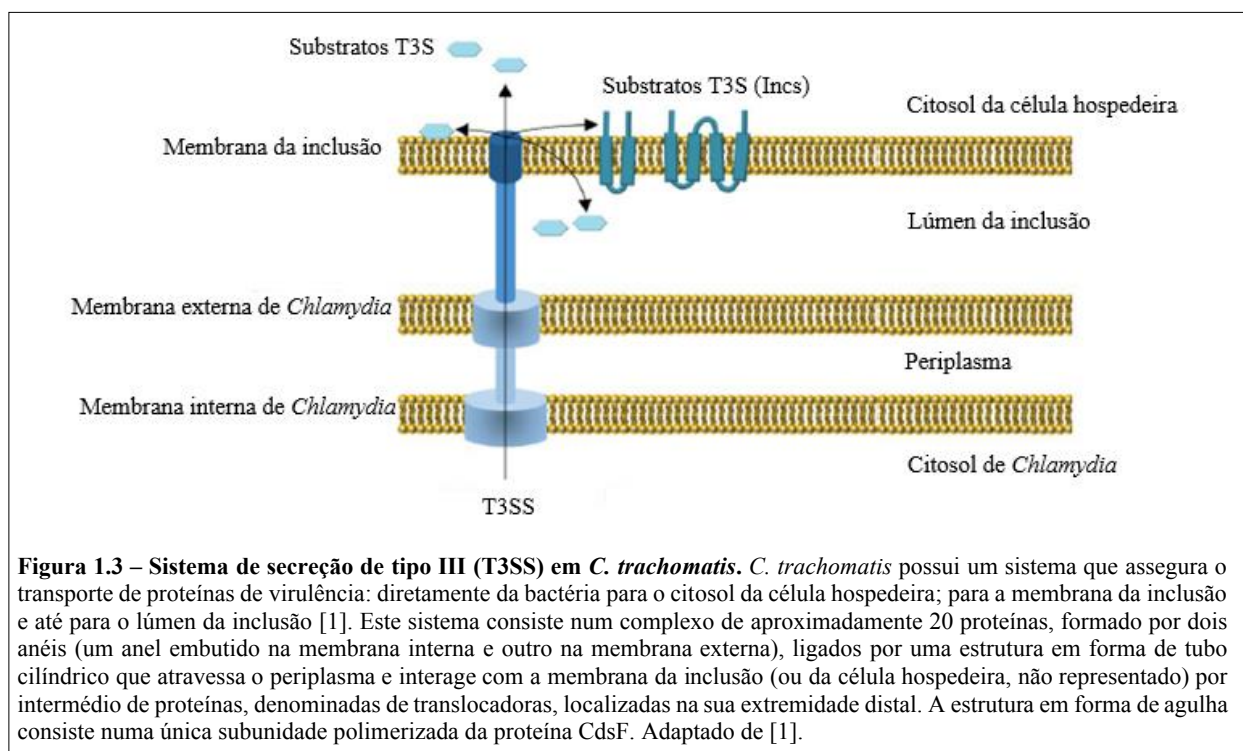
Determinadas condições de *stress*, como por exemplo o uso de antibióticos, privação de nutrientes ou libertação de citocinas que recrutam células do sistema imunológico do hospedeiro, geram formas aberrantes de RBs, reversíveis [1, 2]. Desconhece-se, no entanto, se estas formas persistentes de chlamydiae ocorrem *in vivo* [2].

#### **1.4. Sistema de secreção de tipo III (T3SS)**

Ao longo do ciclo de desenvolvimento de *C. trachomatis*, a bactéria produz diferentes proteínas de virulência que assumem diversas funções no ciclo celular [2]. Este processo requer a produção sincronizada de fatores específicos da fase de desenvolvimento em que a bactéria se encontra, bem como a regulação transcricional também acoplada ao T3SS [2]. Este sistema de transporte permite a *C. trachomatis* subverter a biologia da célula hospedeira [7]. Os T3SS estão presentes em diversas bactérias patogénicas Gram-negativas [15], sendo essenciais para a interação bacteriana com células

eucarióticas [1, 13]. Representam uma exaptação flagelar, manifestada pela perda de genes relacionados com a mobilidade da bactéria, e aquisição de componentes que permitem a secreção de proteínas e sua translocação para membranas de células hospedeiras [7]. Os genes que codificam para componentes estruturais centrais desta estrutura injetora são conservados entre *Chlamydiae* [7].

No geral, o complexo que constitui o T3SS é composto por mais de 20 proteínas que, entre si, formam anéis oligoméricos, embutidos no interior das membranas, interna e externa, da bactéria, e são conectados por uma estrutura em forma de tubo cilíndrico que se estende ao longo do periplasma [15]. Por analogia com outras bactérias possuindo T3SS, no caso de *C. trachomatis*, existirá uma estrutura em forma de agulha helicoidal, que consiste numa subunidade polimerizada de uma única proteína, designada genericamente de CdsF, cujo comprimento é regulado [7]. CdsF liga-se ao anel embutido na membrana externa e tem associadas, à sua extremidade distal, proteínas denominadas de translocadoras para, assim, interagir com uma terceira membrana – a membrana da célula hospedeira [15]. Nos T3SS de *Chlamydia* spp., a proteína que está localizada na base deste complexo, junto da membrana interna da bactéria, e que controla a injeção de substratos na célula hospedeira, é designada de CopN [1, 7]. Ao contrário de outros T3SS, *C. trachomatis* possui dois potenciais conjuntos de proteínas translocadoras CopB/CopD e CopB2/CopD2, que poderão funcionar em alturas distintas do ciclo de desenvolvimento [7] e talvez em membranas diferentes – membrana plasmática da célula hospedeira e membrana da inclusão (Mota L., dados não publicados). A estrutura das proteínas de translocação e a forma como interagem com a membrana do hospedeiro permanecem, no entanto, por definir [15].



**Figura 1.3 – Sistema de secreção de tipo III (T3SS) em *C. trachomatis*.** *C. trachomatis* possui um sistema que assegura o transporte de proteínas de virulência: diretamente da bactéria para o citosol da célula hospedeira; para a membrana da inclusão e até para o lúmen da inclusão [1]. Este sistema consiste num complexo de aproximadamente 20 proteínas, formado por dois anéis (um anel embutido na membrana interna e outro na membrana externa), ligados por uma estrutura em forma de tubo cilíndrico que atravessa o periplasma e interage com a membrana da inclusão (ou da célula hospedeira, não representado) por intermédio de proteínas, denominadas de translocadoras, localizadas na sua extremidade distal. A estrutura em forma de agulha consiste numa única subunidade polimerizada da proteína CdsF. Adaptado de [1].

Na generalidade, a estrutura composta pelo complexo multiproteico nas membranas bacterianas, pela estrutura em forma de agulha à superfície da bactéria e pelas proteínas translocadoras, permite a conceção de um canal que possibilita o transporte de proteínas desde o citosol bacteriano até ao citoplasma da célula hospedeira. No caso de *C. trachomatis*, há evidência de que o seu T3SS permite o transporte de proteínas para o lúmen da inclusão, para a membrana da inclusão (proteínas Inc) e para o citosol da célula infetada [1]. Em *Chlamydiae*, o T3SS permite a injeção direta de proteínas em células

hospedeiras, em duas fases distintas: inicialmente, no contacto do corpo elementar com a membrana plasmática de células eucarióticas, e durante o ciclo intracelular, em que as proteínas são injetadas no citosol de células hospedeiras, podendo depois aceder a outros compartimentos, tais como o núcleo [2].

## 1.5. Proteínas transportadas para o exterior da inclusão

A maioria das proteínas de *C. trachomatis* transportadas para fora da inclusão são substratos de T3SS e foram detetadas no citosol, núcleo ou em associação com a membrana de células hospedeiras [1]. Neste contexto, foram identificadas 24 proteínas, das quais quatro (CT166, CT619, CT712 e CT847) não foram formalmente localizadas na célula eucariótica, embora os estudos realizados sugiram terem um papel efetivo na virulência da bactéria: CT166 que promove alterações no citosqueleto de células hospedeiras; CT619 e CT712 que possuem um domínio DUF542, específico de *Chlamydiaceae* (também presente em CT620, CT621 e CT711) e CT847 que interage com proteínas presentes no citoplasma de células infetadas [1].

Na fase inicial do ciclo de desenvolvimento de *C. trachomatis*, existe um conjunto de proteínas que controlam a entrada da bactéria e a interação da inclusão com a célula hospedeira [1]: CT456/TarP, CT694/TmeA e CT695/TmeB, com mecanismos de ação desconhecidos; CT875/TepP e CT166. A proteína TarP integra um domínio de repetição rico em tirosina, em número variável entre diferentes serovares de *C. trachomatis* e ausente em TarP de outras espécies de *Chlamydia* [1]. Quando TarP é injetada na célula hospedeira, os resíduos de tirosina são fosforilados, promovendo a polimerização de filamentos de actina, junto dos locais de entrada da bactéria [1]. Esta ação promove alterações no citosqueleto da célula infetada e a internalização do corpo elementar num vacúolo, ativando a sinalização do hospedeiro [1]. Por sua vez, TepP é responsável pelo recrutamento de outras proteínas (CRK, CRKL e PI3K) que são intermediárias da ativação da resposta imune inata. A regulação da sinalização da resposta imunológica no início da infeção é, provavelmente, necessária para o crescimento de *C. trachomatis* [1]. TepP é fosforilada em resíduos de tirosina e serina [1]. Associadas a uma fase mais avançada do ciclo de desenvolvimento de *C. trachomatis*, estão um conjunto de outras proteínas excretadas, como CT622, CT868/Cdu1, CT867/Cdu2, CT156/Lda1, CT163/Lda2, CT473/Lda3, CT737/NUE, CT105/CteG, CT847, CT858/CPAF, CT823/HtrA, pGP3, CT311 e CT795 [1].

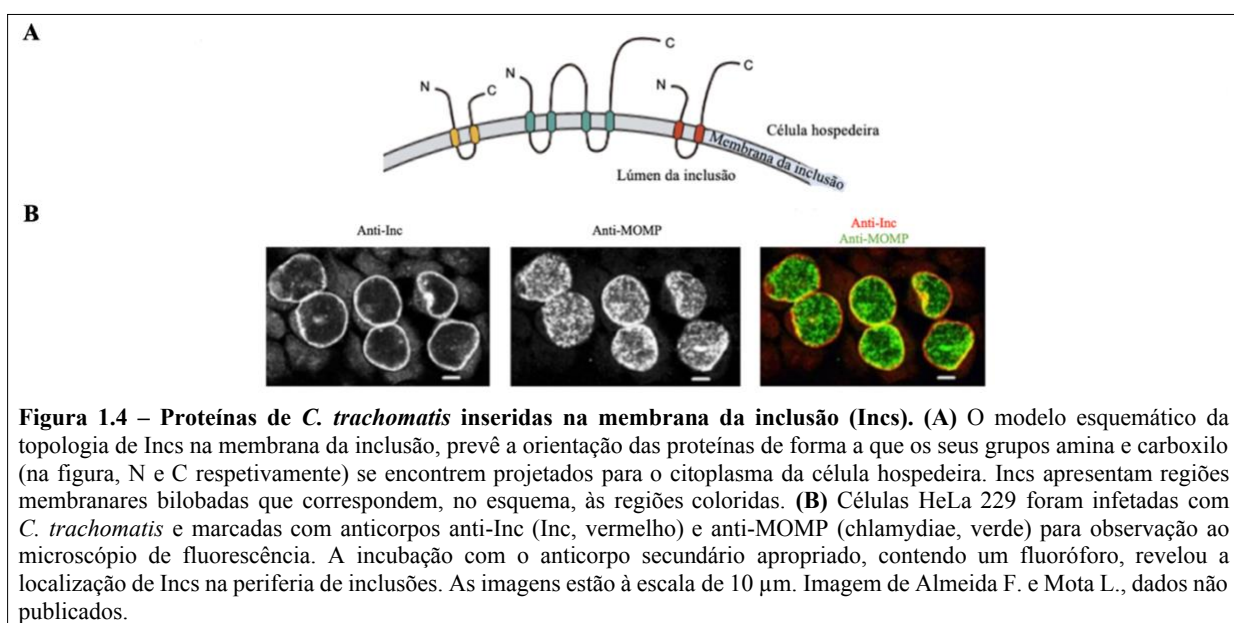
A estrutura de CT622 foi revelada por cristalografia de raios X, apresentando semelhança com GGTases (“geranilgeraniltransferases”) e sintases. Proteínas com atividade de GGTase transferem uma cadeia lipofílica de 20 carbonos para o C-terminal de moléculas alvo, promovendo a associação de proteínas RAB com membranas celulares. Proteínas RAB fazem parte do sistema de transporte e reconhecimento de vesículas e organelos de células eucarióticas, controlando o ancoramento das membranas envolvidas. A ausência de CT622 ou a alteração estrutural da proteína pode resultar em defeitos na invasão de EBs, durante a infeção bacteriana, e/ou anomalias na diferenciação das formas EB em RB [1].

Em *C. trachomatis*, Cdu1 (também conhecida por ChlaDUB1) e Cdu2 (ChlaDUB2) têm uma função análoga a deubiquitinasas, de células eucarióticas. A ubiquitina atua na regulação de proteínas, sendo o seu papel mais evidente o da marcação destas macromoléculas para degradação em proteossomas. Cdu1 e Cdu2 são associadas à redistribuição do complexo de Golgi em torno da inclusão, que se observa durante a infeção por *C. trachomatis* [1]. Cdu1 também previne a morte celular ao estabilizar a proteína MCL1 (“myeloid cell leukemia” – MCL), que regula diretamente a apoptose [1].

As proteínas Lda1 – 3 associam-se a gotículas de lípidos e poderão mediar a interação de *C. trachomatis* com estes organelos. Também é descrita a presença de uma Lda4. [1]. Gotículas de lípidos, além de constituírem uma reserva de energia celular, auxiliam na regulação da resposta imune e são subvertidas por várias bactérias patogênicas, que as usam em seu próprio benefício como fonte de nutrientes [1]. NUE é encontrada no núcleo de células infetadas onde, presumivelmente, tem ação de metilação de histonas, controlando a estrutura da cromatina. Esta proteína é caracterizada pela presença de um domínio SET, encontrado principalmente em metil-transferases de histonas de células eucarióticas [1]. A proteína CteG poderá estar envolvida no controlo do tráfego vesicular da célula hospedeira, tendo sido associada ao complexo de Golgi e à membrana plasmática da célula infetada, na parte inicial e na parte final do ciclo de desenvolvimento de *C. trachomatis*, respetivamente [1]. CT847 poderá atuar como regulador indireto da transcrição, controlando o crescimento de *C. trachomatis* [1]; e CPAF tem sido referida como estando envolvida em diversas funções: quer na diferenciação de RBs em EBs; quer na inibição da citocinese de células hospedeiras; na lise celular, ou ainda, na indução da resposta imune inata do hospedeiro (possivelmente, mediado por CT620, CT621 e CT711). CPAF é produzida como um zimógeno e, presumivelmente, é ativada no lúmen da inclusão após o seu transporte a partir do periplasma bacteriano, dependente de T2SS [1]. Finalmente pGP3, codificado pelo plasmídeo de virulência bacteriano, apresenta semelhanças a citocinas da família de necrose tumoral e pode, por isso, também regular a resposta imune do hospedeiro [1].

## 1.6. Proteínas inseridas na membrana da inclusão (Incs)

Vários estudos indicam que muitas proteínas presentes na membrana da inclusão são de origem bacteriana [13]. Estas proteínas inseridas na membrana da inclusão (“inclusion membrane proteins” – Incs; Figura 1.4) são o grupo mais proeminente de proteínas associadas à virulência de *C. trachomatis*. O genoma de *C. trachomatis* poderá codificar para cerca de 60 Incs, das quais, pelo menos, 37 foram identificadas [14].



Durante o ciclo de vida de *C. trachomatis*, o RNA mensageiro (mRNA) que é produzido para tradução e síntese de Incs, varia. Este conhecimento sugere que estas proteínas desempenham diferentes funções em etapas distintas do desenvolvimento bacteriano, podendo ser temporária a sua presença na membrana da inclusão [1, 13]. As proteínas Inc têm, pelo menos, um domínio hidrofóbico bilobado (Figura 1.4A) e são substratos do T3SS [1]. Os modelos de topologia em membranas de células infetadas preveem que os seus terminais, contendo os grupos funcionais amina ( $-\text{NH}_3$ ) e carboxilo ( $-\text{COOH}$ ), se estendam para o citosol da célula hospedeira [13]. Esta exposição ao hospedeiro faz com que possam apresentar semelhanças com as proteínas da célula eucariótica [13].

A localização de Incs na periferia de células infetadas pode ser revelada por microscopia de imunofluorescência (Figura 1.4B). Estas proteínas medeiam a interação da bactéria com a célula eucariótica, mas partilham um baixo grau de conservação entre variantes da mesma espécie [1, 13]. Uma possível explicação reside no facto de sofrerem forte pressão seletiva, causada pela exposição ao sistema imunológico do hospedeiro, resultando numa elevada taxa de mutação destas regiões genómicas, relativamente ao genoma total da bactéria [3]. O reduzido número de proteínas Inc homólogas entre espécies de *Chlamydia* sugere que este grupo de proteínas possa cumprir funções específicas da espécie [13]. Também é de realçar a possibilidade de Incs, desempenhando funções semelhantes em espécies distintas, apresentarem estruturas primárias significativamente diferentes [13].

As proteínas Inc estão envolvidas em diversas atividades da subversão de funções celulares do hospedeiro em benefício da bactéria, de que são exemplos: o controlo do tráfego vesicular e não vesicular, como forma de impedir a fusão lisossomal e adquirir nutrientes necessários ao crescimento bacteriano (CT119/IncA, CT115/IncD, CT116/IncE, CT005/IncV, CT229/CpoS); o controlo da estabilidade da membrana da inclusão (CT233/IncC, CT229/CpoS, CT383); a regulação do complexo de Golgi (CT813/InaC) e do citosqueleto (CT223/IPAM, CT813/InaC, CT224, CT225, CT850); a morte programada da célula hospedeira (CT229/CpoS); a saída de *Chlamydia* para o exterior da célula infetada (CT101/MrcA, CT228) e a interação com outras proteínas (CT233/IncC, CT383), incluindo Incs (CT117/IncF, CT222) [1, 14].

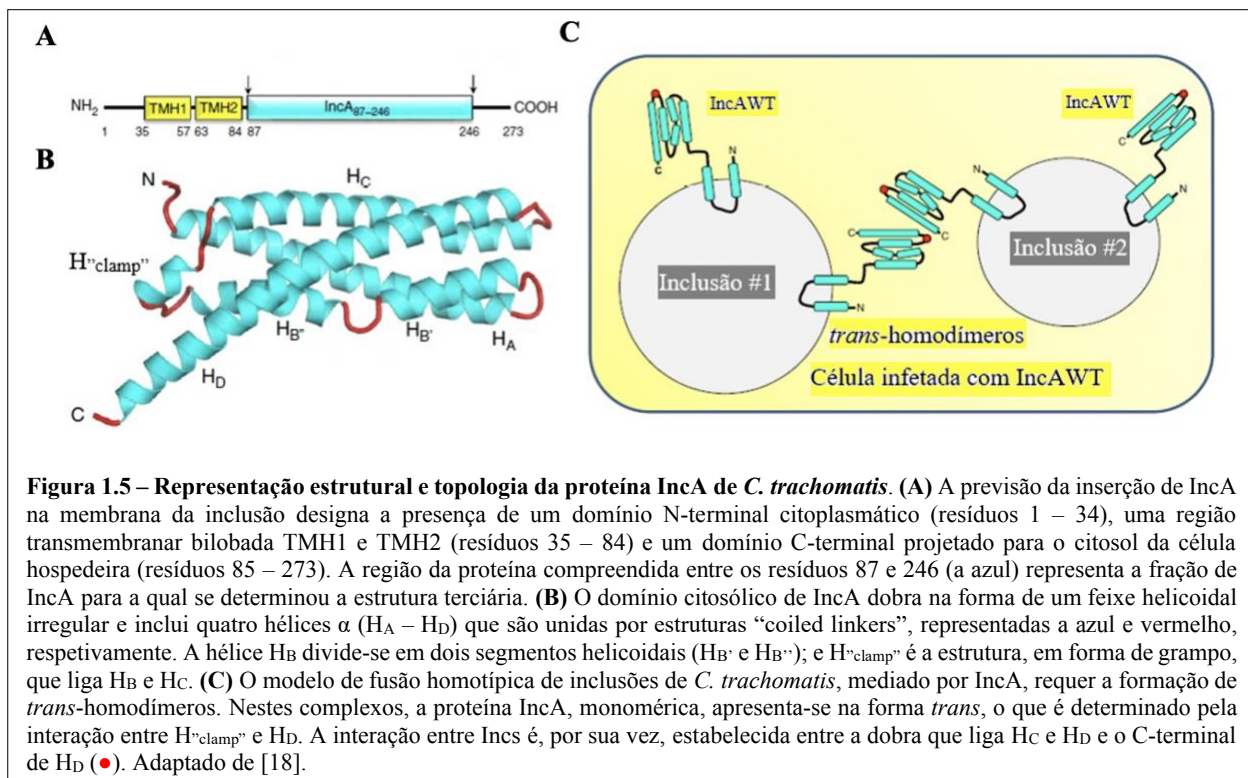
Também foi relatada a concentração de Incs (CT101/MrcA, CT232/IncB, CT233/IncC, CT288/IncM, CT223/IPAM, CT222, CT224, CT228, CT850) em regiões junto da membrana da inclusão, denominadas de microdomínios da inclusão, e em locais de interação entre RBs e a membrana do retículo endoplasmático da célula infetada (CT115/IncD, CT005/IncV) [1, 14, 16]. Microdomínios da inclusão são descritos como plataformas de interação de proteínas com o centróssoma, microtúbulos e citosqueleto da célula hospedeira. São locais enriquecidos em colesterol e cinases da família Src (na sua forma ativa, fosforilada), por sua vez envolvidas em diversos processos biológicos, como o da infeção [1, 16]. Foi reconhecida nas Incs CT223/IPAM, CT224 e CT225, a capacidade de inibirem a citocinese de células hospedeiras – fenómeno que pode favorecer o crescimento de *C. trachomatis* [1]. Apesar deste conhecimento, a função de muitas proteínas Inc permanece ainda indefinida [1].

## 1.7. Biologia estrutural de proteínas Inc

Um problema associado ao estudo de Incs de *C. trachomatis* é a reduzida conservação de genes que codificam para Incs entre espécies de *Chlamydia* quando, controversamente, são identificados homólogos com sequências de aminoácidos significativamente diferentes; ou Incs, apresentando algum grau de similaridade, mas cuja identidade entre regiões hidrofóbicas é baixa [17, 18]. Por esta razão,

reconhece-se a importância de uma análise estrutural nestas proteínas, uma vez que a ausência de relação entre as suas estruturas primárias sugere que as estruturas terciárias possam explicar a similaridade de funções por elas desempenhadas. Neste contexto, também a presença de (um) domínio(s) hidrofóbico(s) representa(m) um obstáculo, na medida em que dificulta(m) a purificação destas proteínas, na forma nativa e solúvel, limitando, conseqüentemente, os estudos *in vitro* para as regiões solúveis. Atualmente, a maioria das Incs não tem estabelecida a sua estrutura tridimensional, à exceção de CT119/IncA e CT116/IncE. Para estas proteínas, a revelação de parte da sua estrutura terciária, em combinação com outras metodologias de estudo, permitiu elucidar vários aspetos relacionados com as suas funções.

IncA é uma proteína de 273 aminoácidos que contém um domínio N-terminal citoplasmático, (resíduos 1 – 34), um domínio transmembranar bilobado (resíduos 35 – 84) e um domínio C-terminal que se projeta para o citoplasma da célula hospedeira (resíduos 85 – 273; Figura 1.5A) [18]. No domínio C-terminal, foi descrita a presença de duas regiões com semelhanças a regiões SNARE (“soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor”) de células eucarióticas, responsáveis pelo processo de fusão de membranas. Estas regiões, na proteína IncA, são denominadas como “SNARE-like” domínio 1 (SLD1) e 2 (SLD2) [17]. Foi constatado que SLD1 e 2 são necessários para a fusão de inclusões no interior de células infetadas e na inibição da fusão com lisossomas [19]. No entanto, a demonstração (não expectável) de que estas regiões são incapazes de inibir a fusão entre membranas de forma independente, sendo necessária a presença de ambas para promover a fusão homotípica de inclusões, foi apontada como um dos aspetos a esclarecer sobre o mecanismo de ação de IncA, levando à investigação da sua estrutura funcional [19].



A recente contribuição da cristalografia de raios X para a resolução do arranjo molecular de quase toda a região citosólica de IncA revelou uma estrutura irregular, termodinamicamente estável, de quatro hélices  $\alpha$  antiparalelas (designadas de  $H_A$  –  $H_D$ ), em que  $H_B$  apresenta dois segmentos curtos helicoidais, separados por uma região dobrável [18]. A alça que une  $H_B$  e  $H_C$  contém uma estrutura helicoidal curta,

em forma de grampo (Figura 1.5B) [18]. A comparação da estrutura terciária de IncA com homólogos estruturais demonstrou que SLD1 e 2 diferem, afinal, das regiões SNARE e assemelham-se a um domínio relacionado com uma proteína envolvida na interação entre actina e complexos revestidos de clatrina (“huntingtin-interacting protein-1 related” – HIP1R) [18]. Clatrina é uma proteína que cobre a superfície de vesículas de células eucarióticas, conferindo-lhes um aspeto franjado, e faz o transporte de material, proveniente da membrana plasmática, entre compartimentos endossomais e em algumas etapas das vias de biossíntese [20]. Ao analisar a fusão de inclusões em células infetadas, com estirpes de *C. trachomatis* geneticamente modificadas, o conhecimento da estrutura tridimensional de IncA permitiu, assim, conceber um modelo de fusão homotípica mediada pela proteína [18]. Neste modelo, a fusão de membranas da inclusão requer a formação de *trans*-homodímeros de IncA, que interagem através do C-terminal de H<sub>D</sub> e determinantes localizados na dobra que liga H<sub>C</sub> e H<sub>D</sub> (Figura 1.5C) [18]. Este estudo revelou também que H<sub>D</sub> estabelece importantes pontos de contacto com o grampo situado entre H<sub>B</sub> e H<sub>C</sub>, assegurando a conformação monomérica estável de IncA (que se apresenta na forma *trans*) antes da fusão de membranas, o que é determinante para a função da proteína [18]. Regiões de IncA envolvidas nestas interações intramoleculares são conservadas entre espécies de *Chlamydia* [18].

A resolução da estrutura cristalina de IncE também ajudou a compreender alguns detalhes relacionados com a sua função. IncE, de 132 aminoácidos [21], interage especificamente com proteínas que controlam a atividade do retrómero na célula hospedeira [22]. Estas proteínas pertencem à família das “sorting nexin” (SNX) e são caracterizadas pela presença de regiões homólogas a domínios de ligação contendo fosfatidilinositol-3-monofosfato (domínios “phox” – PX) [22]. O retrómero é um complexo proteico especializado na reciclagem de componentes associados à membrana dos endossomas, para a membrana plasmática ou rede *trans*-Golgi e retículo endoplasmático, durante o transporte vesicular [22]. A sua função contribui para manter a homeostase lipídica e a integridade da célula [22]. Um conjunto de três proteínas (VPS35, VPS26 e VPS29), filogeneticamente conservadas, formam a estrutura central deste complexo e são responsáveis pelo reconhecimento de proteínas endossomais [22]. O contacto de IncE com os domínios PX de SNX5/6 atua no sentido de diminuir o tráfego endossomal, por inibição do retrómero [22]. Apesar de IncE interagir também com outras proteínas SNX, em conjunto com o complexo envolvido no transporte vesicular (SNX3 e SNX27), foi demonstrado que a depleção de SNX5/6 favorece a infeção por *Chlamydia*, assumindo um papel importante na restrição da invasão bacteriana [22]. A base molecular e a especificidade desta interação seriam, portanto, necessárias e foram esclarecidas através da resolução da estrutura cristalina do complexo PX5:IncE<sub>109–132</sub>, que contém os resíduos 111 – 131 da proteína da inclusão [22]. Na estrutura tridimensional, uma longa hélice dupla em PX5 forma um sulco hidrofóbico onde ocorre a ligação de IncE [22]. O alinhamento de sequências e comparações estruturais mostraram ainda que SNX5/6 contém resíduos extra no domínio PX, relativamente a SNX1 e 2, formando um único grampo helicoidal longo, necessário para a ligação da proteína de *C. trachomatis* [22]. Possivelmente, IncE interage diretamente com SNX5/6, reprimindo a função destas proteínas em células eucarióticas [22]. Este estudo também demonstrou que as regiões de interação entre IncE e os domínios PX de SNX5/6 são altamente conservadas em *Chlamydiaceae* [22], sugerindo que a formação de complexos SNX5/6:IncE é comum entre espécies de *Chlamydia* e pode representar um mecanismo bacteriano importante durante a infeção de células eucarióticas [22].

## 1.8. Proteína IncM de *C. trachomatis*

A proteína IncM (CT288 em *C. trachomatis* D/UW3; CTL0540 em *C. trachomatis* L2/434) tem 564 aminoácidos (563 aminoácidos em IncM de serovar D [23]) e massa molecular de 63 kDa [24]. Faz

parte do conjunto de proteínas de *C. trachomatis* que se encontram inseridas na membrana da inclusão. A previsão da inserção de IncM na membrana da célula hospedeira assume a presença de dois domínios hidrofóbicos bilobados entre os resíduos 36 – 88 e 242 – 291, com os grupos amina e carboxilo voltados para o citosol da célula infetada [13, 14]. A maioria das proteínas Inc identificadas têm apenas um motivo hidrofóbico bilobado, com exceção de CT147, CT288/IncM e CT850 que têm dois [13].

Dados não publicados de um dos laboratórios onde esta tese foi desenvolvida revelam o envolvimento de IncM na capacidade de *C. trachomatis* inibir a citocinese de células hospedeiras, que se apresentam assim multinucleadas [14]. Foi proposto que a multinucleação pode favorecer o desenvolvimento de *C. trachomatis*, uma vez que aumenta a fonte de lípidos derivados do complexo de Golgi [2]. Contudo, existe a evidência de que uma estirpe de *C. trachomatis*, deficiente em IncM, revelou não ter defeito no seu crescimento [14].

Em células infetadas com *C. trachomatis* verificou-se que CCDC146 – uma proteína do centróssoma humano – interage com IncM, mas é recrutada para a periferia da inclusão de forma independente de IncM. No entanto, IncM pode controlar a função de CCDC146 na inclusão [14]. A evidência de que a proteína do centróssoma migra de forma independente de IncM foi demonstrada pelo fenótipo *in vivo* de uma estirpe de *C. trachomatis* mutante *incM* nula (*incM::aadA*) [14]. A estirpe mutante foi construída em laboratório, inativando *incM* pela inserção de um intrão modificado, contendo o gene *aadA* que confere resistência à espectinomicina [14], tendo-se verificado que o crescimento intracelular desta estirpe não é afetado, quando comparado com a sua estirpe parental L2/434 [14]. Através de análises de imunofluorescência, mostrou-se que CCDC146 mantém a sua localização na periferia da inclusão de células hospedeiras, quer por L2/434, quer por *incM::aadA*. [14].

Para além destas observações, alguns estudos referem a concentração de IncM em microdomínios da inclusão [1]. Perturbações na montagem do fuso mitótico e erros no posicionamento e duplicação do centróssoma são apontados como alguns dos danos provocados pela interferência de *C. trachomatis* com o ciclo celular de células infetadas, causando defeitos na mitose e interrupção da citocinese, com observação de células multinucleadas ao microscópio de fluorescência [2]. Esta desordem nas regiões centróssomais de células hospedeiras é presumivelmente atribuída às proteínas Inc, que recrutam e “amarram” os centróssomas na periferia da inclusão [1]. Para além de IncM, outras proteínas de *C. trachomatis* poderão interferir com o processo da mitose celular: CT858/CPAF, CT223/IPAM, CT224, CT225 e CT166 [2]. Por exemplo, é reportado que a produção ectópica de CT223/IPAM, CT224, CT225 e CT166, em células não infetadas, bloqueia a citocinese, embora não sejam claros os seus mecanismos de ação [2]. Apesar destas evidências, a função de IncM permanece ainda por definir [1].

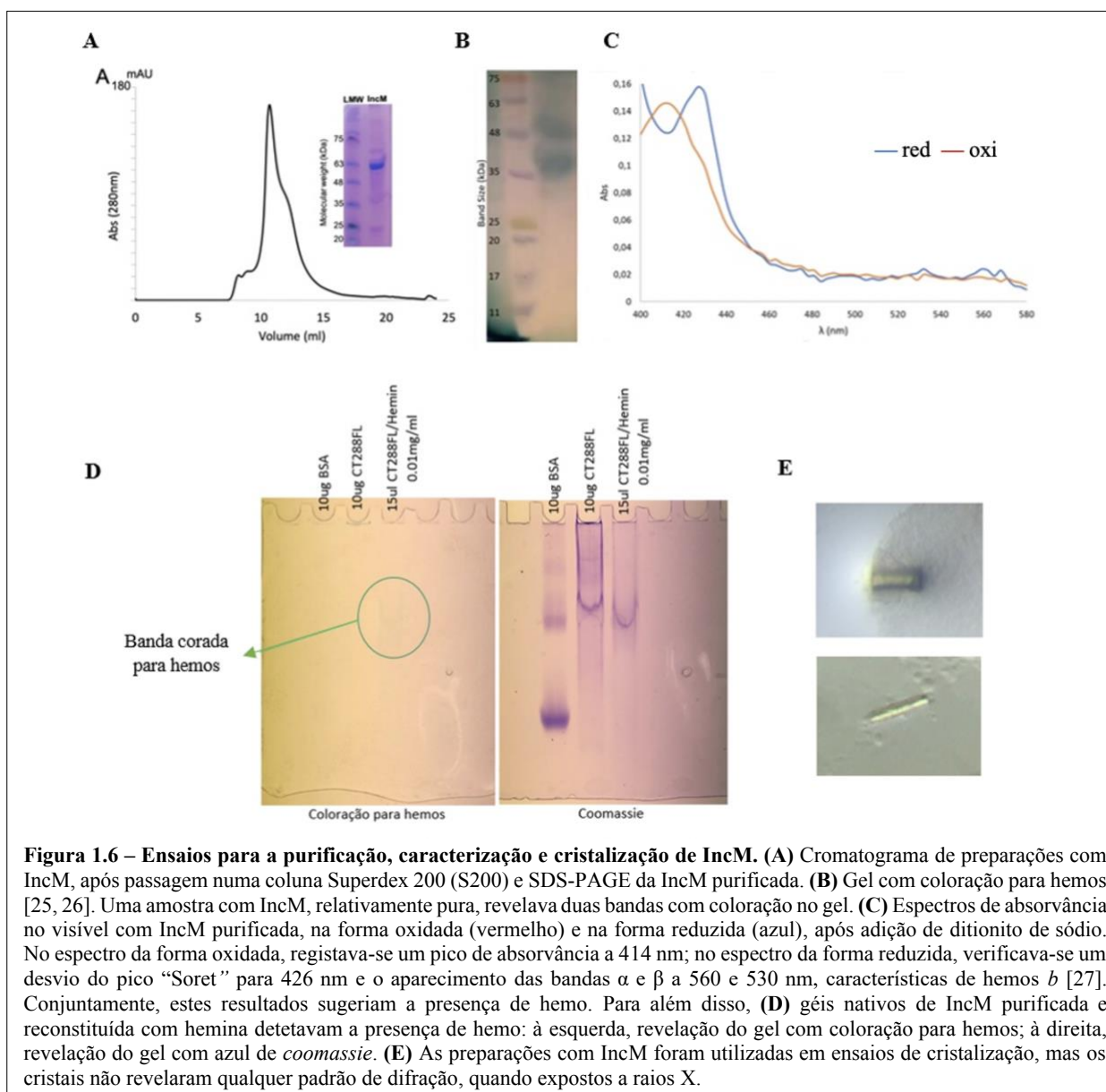
## 1.9. A possível ligação de IncM ao hemo

Mais recentemente, foi proposta a possibilidade de IncM ligar hemoss (dados não publicados, Figura 1.6). Esta hipótese foi levantada durante a produção (em *Escherichia coli*) e purificação da proteína para ensaios de cristalização. No decurso da purificação (Figura 1.6A) foi observada uma cor acastanhada em preparações com IncM, relativamente puras, quando concentradas. O SDS-PAGE corava para hemoss [25, 26], mas apenas quando se usava quantidades elevadas de proteína (acima de 100 µg; Figura 1.6B). Para o facto das bandas migrarem mais que o esperado no SDS-PAGE, corado

para hemo, também observado no gel corado com *coomassie* (dados não publicados), foi sugerido que se devia à degradação da proteína ou à elevada concentração de proteína e detergente.

Os espectros de absorvância na zona do visível para as preparações com IncM, na forma oxidada e na forma reduzida (após adição de ditionito de sódio), também sugeriam a presença do grupo hémico (Figura 1.6B). Para o extrato proteico na forma oxidada, foi detetado um máximo de absorvância a 414 nm. Por sua vez, o espectro da forma reduzida revelou um desvio do pico “Soret” para 426 nm e o aparecimento das bandas  $\alpha$  e  $\beta$  a 560 e 530 nm, respetivamente. Estes picos de absorvância são característicos de hemo *b* [27]. Para além disso, a proteína não apresenta o motivo clássico de ligação de hemo *c* (CXXCH) [27]. Finalmente, ensaios preliminares de reconstituição da proteína com hemina resultavam ainda em amostras enriquecidas (com maior quantidade de hemo), e mais sensíveis à coloração em gel (Figura 1.6C; dados não publicados) [25, 26].

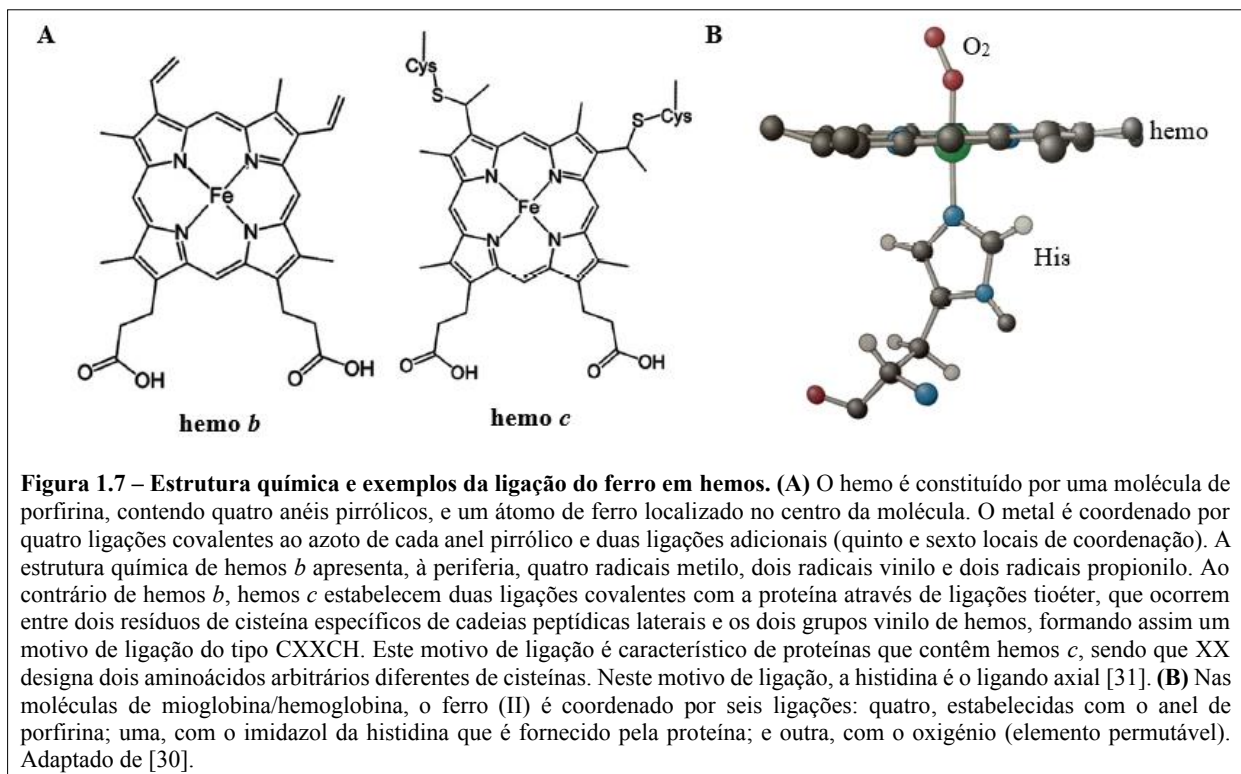
Estas preparações com IncM purificadas foram, posteriormente, utilizadas em ensaios de cristalização para a determinação da estrutura tridimensional da proteína (Figura 1.6D). Contudo, não foram obtidos bons cristais para a difração de raios X, indicando que haveria necessidade de otimizar o protocolo.



## 1.10. O hemo

O hemo é um grupo prostético de proteínas, essencial para algumas atividades biológicas, como o transporte de elétrons; o transporte, armazenamento e detecção de moléculas e o controle da expressão gênica [28]. Está frequentemente envolvido em reações *redox*, contribuindo para a diminuição do *stress* oxidativo da célula [28]. A hemoglobina, a mioglobina, citocromos, oxidases e catalases são alguns exemplos de proteínas que ligam hemos [29].

Estruturalmente, o hemo é constituído por uma porfirina (protoporfirina IX) e um átomo de ferro, alojado no centro da molécula. A porfirina é um composto orgânico formado por quatro anéis pirrólicos ( $C_4H_5N$ ), ligados através de ligações metínicas ( $-CH-$ ). Em condições normais, o ferro (II, no estado ferroso) é coordenado por quatro ligações covalentes ao azoto de cada anel pirrólico, deixando duas posições livres para ligações adicionais – designadas de quinto e sexto locais de coordenação [30]. A estrutura química de hemos varia nos grupos substituintes, sendo que a forma mais comum encontrada em proteínas (o hemo *b*) apresenta à periferia quatro radicais metilo, dois radicais vinilo e dois radicais propionilo [29 – 31]. Modificações de hemos *b* podem resultar em hemos *c*, *a*, *o* e *d* [28]. O hemo *b* não estabelece ligação covalente com a proteína, contrariamente ao hemo *c* [28]. Neste último, além do ferro ser coordenado pela proteína, são estabelecidas duas ligações tioéter entre duas cisteínas de cadeias peptídicas laterais e os dois grupos vinilo, constituintes do hemo (Figura 1.7A) [28]. Neste caso particular, uma histidina geralmente atua como ligando axial, formando um motivo de ligação do tipo CXXCH, característico de hemos *c*, sendo XX dois aminoácidos arbitrários diferentes de cisteínas [28]. Hemos *a*, *o* e *d* são formas menos comuns e podem ser encontradas, por exemplo, em oxidases de células procarióticas e eucarióticas [28].



Na ligação do hemo, relativamente aos quinto e sexto locais de coordenação do ferro, uma de duas situações pode suceder: os dois locais de coordenação são ocupados por ligandos de cadeias

polipeptídicas (de uma só proteína ou de duas proteínas diferentes); ou o quinto local de coordenação é ocupado por um ligando de uma cadeia peptídica, ficando a sexta posição livre que pode ser preenchida por uma molécula permutável. Hemos envolvidos em reações de transferência de eletrões, geralmente têm dois ligandos axiais doados pela proteína; por outro lado, hemos envolvidos no transporte de moléculas ou em reações enzimáticas têm um ligando doado pela proteína e um local livre, para ser preenchido por um substrato, molécula de água ou oxigénio, por exemplo [28]. A Figura 1.7B representa hemos *b* de proteínas, como a mioglobina ou a hemoglobina, especializadas no transporte de oxigénio no tecido muscular ou no sangue, respetivamente. Neste caso, além das quatro ligações covalentes ao azoto de cada anel pirrólico, o ferro (II) é coordenado por uma histidina, que se posiciona num plano perpendicular ao plano do hemo, sendo a posição diametralmente oposta ocupada pelo oxigénio – elemento permutável [30].

Os ligandos axiais doados pela proteína ao hemo, mediado por cadeias laterais de aminoácidos, estabelecem a ligação com o ferro através de átomos de oxigénio, azoto ou enxofre [28]. Desta forma, cada motivo de ligação tem uma afinidade diferente para o hemo, que irá alterar a estabilidade da estrutura tridimensional do complexo formado entre a proteína e o seu grupo prostético [28]. Para além disso, cada ligando tem uma afinidade diferente para o hemo na forma oxidada e na forma reduzida [28]. As propriedades eletrónicas e magnéticas do ferro, localizado no centro da porfirina, são referidas como um importante fator para a função de muitas proteínas hémicas [32].

Com o objetivo de mostrar a distribuição de ligandos axiais para hemos *b* e *c*, foi feita uma análise a todas as proteínas que ligam hemos, disponibilizadas no Banco de Dados de Proteínas (“Protein Data Bank” – PDB) [28]. Os resultados são apresentados na Tabela 1.1. Este estudo incidiu sobre um conjunto de dados, não redundantes, que incluiu um total de 132 proteínas hémicas, representando famílias estruturalmente diferentes [28]. Hemos *a*, *o* e *d* não foram incluídos, porque são menos frequentes [28].

**Tabela 1.1 – Distribuição de ligandos axiais para hemos de tipos *b* e *c*.** Foi efetuada uma análise a todas as proteínas que ligam hemos, disponibilizadas no PDB, com o objetivo de avaliar a distribuição de ligandos axiais para hemos *b* e *c*. Hemos *a*, *o* e *d* não foram incluídos, porque os dados são insuficientes. A designação Xaa representa qualquer aminoácido à exceção da histidina ou metionina. Inclui asparagina, ácido aspártico, cisteína, tirosina, ácido glutâmico e lisina; Ex designa hemos em que a sexta posição de coordenação do ferro (II) é ocupada por um ligando permutável (ex. O<sub>2</sub>). Legenda: <sup>a</sup>His–Tyr; <sup>b</sup>Lys–Met; <sup>c</sup>His–Cys; <sup>d</sup>Lys–Ex. Adaptado de [28].

Ligandos	Hemo <i>b</i>		Hemo <i>c</i>		Total	
	Frequência	%	Frequência	%	Frequência	%
His-His	17	23,9	42	68,9	59	44,7
His-Met	1	1,4	10	16,4	11	8,3
His-Xaa	2 <sup>a</sup>	2,8	2 <sup>a,b</sup>	3,3	4	3
His-Ex	31	43,7	4	6,6	35	26,5
Xaa-Xaa	1 <sup>c</sup>	1,4	0	0	1	0,8
Xaa-Ex	17	23,9	2 <sup>d</sup>	3,3	19	14,4
Outro	2	2,8	1	1,6	3	2,3
Total	71		61		132	

Analisando a tabela, verifica-se que o ligando mais comum, de um total de 132 hemos, é a histidina (em 83 % dos casos). No entanto, hemos *b* e *c* diferem na preferência de ligandos: 72 % de hemos *b* e 95 % de hemos *c* têm, pelo menos, um ligando de histidina. Neste último, a maior prevalência pode ser

explicada, pelo facto deste aminoácido fazer parte do motivo de ligação CXXCH, característico de hemos *c* [28].

A presença simultânea de duas histidinas (His–His) na coordenação do ferro (II) é encontrada em aproximadamente 69 % de todos os hemos *c*, mas apenas em 24 % de todos os hemos *b*. Por sua vez, a ligação histidina-metionina (His–Met) diverge da anterior, em percentagens de 16 e 1,4 % para hemos *c* e *b*, respetivamente. Os números revelam também que apenas 12 % de hemos *c* não têm dois ligandos fornecidos pela proteína, enquanto que em 70 % de hemos *b*, o sexto local de coordenação do ferro (II) é ocupado por moléculas permutáveis. Estes dados apoiam a ideia de que proteínas hémicas envolvidas em reações de transferência de electrões (ex. citocromos) estão mais frequentemente associadas a hemos de tipo *c*.

Ao longo do estudo foi ainda possível deduzir que, em 96 % dos casos, existe conservação dos motivos de ligação ao hemo dentro de famílias de proteínas, sugerindo haver uma correlação entre as funções por elas desempenhadas [28].

O hemo apresenta um espectro de absorvância UV-visível típico que se deve, em grande parte, à estrutura química e característica do anel de porfirina [33]. O espectro UV-visível de hemos é caracterizado pela presença de um pico de maior intensidade a um comprimento de onda, que pode variar entre 350 a 440 nm (banda “Soret”) [32], e pelo aparecimento de outras bandas menos pronunciadas (bandas Q) na faixa dos 450 – 700 nm [33]. Em literatura, é descrito que hemos *b*, na forma reduzida, apresentam bandas  $\alpha$  e  $\beta$  a 560 e 530 nm, respetivamente [27]. Diferenças nas configurações eletrónicas de hemos explicam as alterações detetadas nos seus espectros de absorvância de luz UV-visível, nomeadamente a deslocação da banda “Soret”. Alguns estudos relatam, por exemplo, que um desvio da banda “Soret” para comprimentos de onda na ordem dos 370 nm parece correlacionar-se com a forma pentacoordenada do ferro no centro da porfirina; por outro lado, um desvio para cerca de 420 nm é detetado em complexos cujo metal é penta e hexacoordenado [33].

## 1.11. Objetivos

Embora a possibilidade da ligação de IncM ao hemo fosse inesperada e pudesse ser inespecífica, valeria a pena ser esclarecida. Numa primeira análise, IncM poderia estar envolvida no transporte do ferro da célula hospedeira para o interior da inclusão. No entanto, considerou-se a hipótese pouco provável porque, na ausência da proteína, o crescimento de *C. trachomatis* não é significativamente afetado. Por outro lado, o hemo poderia servir como cofator a uma atividade bioquímica de IncM ainda não determinada ou, de alguma forma, intervir na capacidade de *C. trachomatis* inibir a citocinese de células hospedeiras. Por essa razão, com base no objetivo geral de melhor compreender a função de IncM, foram inicialmente traçados dois objetivos específicos para este trabalho:

- Identificar os aminoácidos de IncM necessários para a ligação ao hemo *b*;
- Determinar se a ligação IncM-hemo *b* estaria relacionada com a capacidade de IncM inibir a citocinese da célula hospedeira.

A identificação de aminoácidos de IncM envolvidos na ligação ao hemo *b* seria uma indicação de que a ligação IncM-hemo *b* é específica. De seguida, poder-se-ia determinar a relevância desta ligação na inibição da citocinese de células infetadas com estirpes de *C. trachomatis* que codificam IncM mutantes.

Desde o início, considerou-se a hipótese de não ser possível identificar mutantes de IncM capazes de ligar o hemo e, por isso, existia o objetivo alternativo de otimizar condições para a determinação da estrutura tridimensional da proteína, por cristalografia de raios X. Este método utiliza o padrão de difração de raios X de cristais de proteínas, para revelar o arranjo tridimensional das moléculas a nível atómico [34].

Tal como descrito na secção de resultados, no decurso deste trabalho verificou-se que a ligação IncM-hemo *b* correspondia a um artefacto experimental. Como plano de estudo alternativo, optou-se por experiências adicionais, tendo em vista:

- a produção e a purificação de IncM para análise estrutural;
- a análise sobre se a capacidade de IncM de *C. trachomatis*, de serovar L2 (biovar LGV), inibir a citocinese de células hospedeiras seria conservada nos seus homólogos de outros serovares e biovares (ocular, urogenital) e de outras espécies de *Chlamydia* (*C. muridarum* e *C. caviae*);
- a identificação de aminoácidos em IncM importantes para a função de inibir a citocinese de células hospedeiras, com base na comparação entre homólogos e na identidade entre uma região de IncM e domínios de proteínas eucarióticas da família bicaudal D (BICD), por sua vez envolvidas na regulação de motores moleculares de microtúbulos [35].

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Manipulação e crescimento de estirpes de *Escherichia coli*

As estirpes de *Escherichia coli* utilizadas neste trabalho estão indicadas na Tabela A.1. Os meios de cultura utilizados para a propagação rotineira de *E. coli*, com crescimento a 37 °C, foram Lysogeny Broth (LB; meio líquido) ou LB solidificado (LA) com 1,6 % (m/v) agar. Quando necessário, foi adicionado canamicina (50 µg mL<sup>-1</sup>). As estirpes de *E. coli* foram transformadas por eletroporação ou por choque térmico usando metodologias *standard*.

### 2.2. Plasmídeos, oligonucleótidos e manipulação de DNA

Os plasmídeos e oligonucleótidos utilizados e concebidos para este trabalho estão descritos nas Tabelas A.2 e A.3, respetivamente. A construção e purificação de plasmídeos recorreu a metodologias *standard* de biologia molecular com utilização de DNA polimerase Phusion (Thermo Fisher Scientific); enzimas de restrição NdeI, EcoRI, KpnI e NotI (Thermo Fisher Scientific), DNA ligase T4 (Thermo Fisher Scientific); DNA polimerase NZY Taq II (Thermo Fisher Scientific); Kits de purificação de DNA Clean and Concentrator™-5 e Zymoclean™ (Zymo Research) e Kits de extração de DNA NZYMiniprep e NZYMidiprep (NZYtech). Todos os reagentes e materiais foram manipulados de acordo com as instruções dos fabricantes. A identificação de colónias transformadas foi feita por PCR e todos os plasmídeos foram validados por sequenciação de DNA.

### 2.3. Caracterização da ligação do hemo *b* à IncM

Cresceram-se pré-inóculos de *E. coli* BL21 (DE3; Thermo Fisher Scientific) – transformada com os plasmídeos pET28b+, pJB13 ou pCS1 a 4 (Tabela A.2) – em meios LB contendo canamicina (50 mg L<sup>-1</sup>), a 37 °C e 180 rpm, durante quatro horas. Para cada cultura, inoculou-se 250 µL de pré-inóculo em 50 mL de meio de autoindução (LB, 5052 [glicerol 0,5 % (v/v), glucose 0,05 % (m/v), α-lactose 0,2 % (m/v)], NPS [Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 25 mM], MgSO<sub>4</sub> 1 mM e canamicina 50 mg L<sup>-1</sup>) e incubou-se a 26 °C e 180 rpm, durante 24 horas. As bactérias foram concentradas por centrifugação a 2 500 x g, durante 20 minutos, ressuspendidas em 10 mL de tampão de lise [Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM (pH 8), NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, β-mercaptoetanol 2 mM, glicerol 10 % (v/v), inibidores de protease (Roche) e DNase] e lisadas por sonicação a uma amplitude de 80 %, com 0,5 – 10 ciclos de 30 segundos. Seguiu-se uma centrifugação a 3 000 x g, durante 30 minutos, para separar células não partidas e outros detritos celulares, do extrato solúvel e membranas; e uma segunda centrifugação a 35 000 x g, durante uma hora, para isolar membranas. Finalmente, as membranas foram solubilizadas em 10 mL de tampão de lise (pH 7) com DDM 1 % (m/v), a 4 °C durante a noite, em agitação. A fração membranar solubilizada foi separada por centrifugação a 30 000 x g, durante uma hora. Todas as centrifugações foram feitas a 4 °C.

Espectros de absorvância no UV-visível (250 – 700 nm; Espectrofotómetro Evolution 201, Thermo Fisher Scientific) de extratos membranares solubilizados, contendo as diferentes IncMs, foram então

traçados e normalizados para a absorvância a 280 nm da fração que continha a proteína nativa. Posteriormente, adicionou-se, aproximadamente, 2 mg de ditionito de sódio a cada amostra, para a monitorização dos espectros com as diferentes proteínas na forma reduzida. Aliquotas com os diferentes extratos proteicos foram corridas num SDS-PAGE, corado com azul de *coomassie*.

Para terminar a experiência, todas as frações membranares solubilizadas de *E. coli* BL21 (DE3) foram purificadas por cromatografia de afinidade de iões metálicos imobilizados (“immobilized metal-ion affinity chromatography” – IMAC), em coluna HisTrap FF (GE Healthcare) de 1 mL (0,7 x 2,5 cm), contendo meio Sepharose 6 Fast Flow de iões níquel. Duas soluções tampão foram preparadas no decurso da técnica, uma para lavagem e outra para eluição, variando na concentração de imidazol: [Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM (pH 7), NaCl 300 mM, imidazol 50 mM, DDM 0,1 % (m/v)] e [Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM (pH 7), NaCl 300 mM, imidazol 400 mM, DDM 0,1 % (m/v)]. A fração que passou através da coluna quando foi carregada com o volume total de proteína a purificar designámos de “flow through” (FT), sendo esta a primeira recolhida. De seguida, separou-se a fração de lavagem (L) e, por fim, a fração eluída (E). Depois, as frações L e E dos extratos proteicos de *E. coli*, sem IncM ou contendo IncM (nativa), foram utilizadas para traçar novos espectros UV-visível, antes e após concentração das frações em “centricon” (Merck Millipore) com *cut-off* de 100 kDa.

## 2.4. Produção de IncM de larga escala e purificação

Preparou-se uma cultura de *E. coli* BL21 (DE3) de larga escala, em 6 L de meio de autoindução (6 x 1 L). O pré-inóculo de *E. coli* BL21 (DE3), transformada com o plasmídeo pJB13, cresceu em meio LB suplementado com canamicina (50 mg L<sup>-1</sup>), a 37 °C e 180 rpm, durante quatro horas. Após o inóculo em meio de autoindução, em 1:200 (v/v), *E. coli* BL21 (DE3) cresceu a 26 °C e 180 rpm, durante 24 horas. As bactérias foram recolhidas por centrifugação a 5 000 x g, durante 15 minutos, com a ressuspensão do *pellet* em 200 mL de tampão de lise (pH 8), e lisadas por sonicação (amplitude de 80 %, 0,5 – 15 ciclos de 30 segundos). Depois de uma centrifugação a 24 000 x g, 12 minutos, separou-se o extrato solúvel. O isolamento de membranas resultou de uma ultracentrifugação posterior a 200 000 x g, durante uma hora. As membranas foram transferidas para um homogeneizador de vidro e solubilizadas em 10 mL de tampão de lise (pH 7), ao qual se adicionou DDM 1 % (m/v), seguido de incubação a 4 °C, em agitação, durante a noite. A fração membranares solubilizada foi então separada por centrifugação a 30 000 x g, durante uma hora, e purificada por IMAC em coluna HisTrap FF de 5 mL (1,6 x 2,5 cm), com utilização de tampão de lavagem [Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM (pH 7), NaCl 300 mM, imidazol 50 mM, DDM 0,1 % (m/v)] e tampão de eluição [Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM (pH 7), NaCl 300 mM, imidazol 400 mM, DDM 0,1 % (m/v)]. Finalmente, a fração eluída da HisTrap FF foi separada por cromatografia de exclusão molecular (“size-exclusion chromatography” – SEC) em coluna Superdex 200 (S200) Increase 10/300 GL (GE Healthcare) usando, como tampão de corrida, Tris-HCL 50 mM (pH 7), contendo NaCl 150 mM, glicerol 10 % (v/v) e DDM 0,03 % (m/v). A SEC decorreu a um fluxo de 0,5 mL min<sup>-1</sup>. Entre cada passo de purificação, as amostras foram concentradas em “centricon” com *cut-off* de 100 kDa. Aliquotas das frações recolhidas durante a extração e purificação de IncM foram corridas num SDS-PAGE, corado com azul de *coomassie*, incluindo *pellet* da lise celular, extrato solúvel e *pellet* de membranas. Todas a centrifugações para isolar membranas foram efetuadas a 4 °C.

## 2.5. Clivagem da cauda de histidinas da IncM e otimização

A proporção trombina:IncM utilizada para a clivagem da cauda de histidinas foi otimizada através de ensaios preliminares da IncM, extraída de uma cultura bacteriana de 1 L, e após passagem numa HisTrap FF de íões níquel e numa S200. Aliquotas contendo 22 µg de IncM foram incubadas, durante 16 horas a 4 °C, com diferentes quantidades de trombina (Sigma-Aldrich). As concentrações de trombina testadas foram: 4,5 U, 2,3 U, 1,2 U e 0,6 U. Após incubação, estas amostras foram corridas num SDS-PAGE. O rácio trombina:IncM foi determinado como a menor quantidade de enzima testada capaz de clivar a IncM, removendo a cauda de histidinas do seu N-terminal.

Após passagem do extrato proteico, de uma cultura bacteriana de 5 L, em coluna HisTrap FF, aproximadamente 2,5 mg de IncM foi incubada com 1,4 U de trombina. A incubação decorreu durante 16 horas a 4 °C, numa membrana de diálise com *cut-off* de 14 kDa, submersa em solução tamponada de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM (pH 7), NaCl 300 mM, imidazol 50 mM e DDM 0,03 % (m/v). Aliquotas das frações recolhidas, antes e após digestão com trombina, foram corridas num SDS-PAGE.

Depois de um segundo passo cromatográfico na mesma coluna de afinidade, a fração eluída em tampão de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM (pH 7), NaCl 300 mM, imidazol 400 mM e DDM 0,1 % (m/v), foi novamente dialisada durante a noite e, a amostra recolhida do interior da membrana, separada por cromatografia líquida rápida de proteínas (“fast protein liquid chromatography” – FPLC), com aplicação de um gradiente de imidazol na HisTrap FF, a um fluxo de 0,5 mL min<sup>-1</sup>. Para o gradiente de imidazol, foram preparadas duas soluções: A [Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM (pH 7), NaCl 300 mM, imidazol 50 mM, DDM 0,03 % (m/v)] e B [Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM (pH 7), NaCl 300 mM, imidazol 400 mM, DDM 0,03 % (m/v)]. A absorvância foi monitorizada a um comprimento de onda de 280 nm. As frações eluídas da HisTrap FF por FPLC foram concentradas em “centricon” com *cut-off* de 30 kDa e, a amostra que daí resultou, aplicada numa S200 para um último passo cromatográfico. Aliquotas das frações recolhidas foram corridas num SDS-PAGE.

## 2.6. Linhagens de células de mamíferos

Células HeLa 229 e Vero (ambas da European Collection of Cell Culture – ECACC) foram infetadas com estirpes de *C. trachomatis* e mantidas a 37 °C, em atmosfera humidificada com 5 % (v/v) de CO<sub>2</sub>. As células foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (“Dulbecco’s modified of Eagle’s medium” – DMEM; Corning), enriquecido com glucose (4,5 g L<sup>-1</sup>), L-glutamina, piruvato de sódio e suplementado com soro fetal de bovino (“fetal bovine serum” – FBS; Thermo Fisher Scientific) 10 % (v/v), inativado pelo calor. Passagens de células foram feitas a cada dois ou três dias, em frascos T75 (área de superfície de 75 cm<sup>2</sup>) ou T25 (área de superfície de 25 cm<sup>2</sup>), após lavagem com solução salina tamponada de fosfato (“phosphate-buffered saline” – PBS) e tripsinização durante cinco (HeLa 229) ou dois minutos (Vero) a 37 °C. Todas as linhagens celulares foram verificadas para *Mycoplasma* por PCR convencional [36].

## 2.7. Manutenção e manipulação de estirpes de *C. trachomatis*

As estirpes de *C. trachomatis* utilizadas neste trabalho estão indicadas na Tabela A.4 e são todas derivadas da estirpe 434/Bu de *C. trachomatis*, do biovar LGV e serovar L2 (L2/434; “American Type

Culture Collection” – ATCC). Estas estirpes de *C. trachomatis* foram propagadas em células HeLa 229, usando técnicas convencionais [37].

### 2.7.1. Infecção de células HeLa 229

Células HeLa 229 foram cultivadas em placa ou frasco apropriados para cultura de tecidos, 24 horas antes da infecção. A infecção foi precedida por um passo de lavagem das células com solução balanceada de Hanks (“Hank’s Balanced Salt Solution” – HBSS; Gibco). Suspensões de *C. trachomatis*, preparadas em HBSS ou tampão de sacarose-fosfato-glutamato (“sucrose-phosphate-glutamate” – SPG; sacarose 0,4 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 34 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6 mM, ácido glutâmico 10 mM), foram inoculadas em placa ou frascos T25, contendo células de mamífero. O inóculo em placa foi incubado a 37 °C em atmosfera humidificada com 5 % (v/v) de CO<sub>2</sub>, durante 30 minutos; o inóculo em frasco, durante uma hora em suave agitação, à temperatura ambiente. Após remoção do inóculo, foi adicionado DMEM contendo gentamicina (10 µg mL<sup>-1</sup>), sendo este considerado o tempo zero da infecção. O procedimento está de acordo com o descrito em [38].

### 2.7.2. Transformação de *C. trachomatis*

A transformação de *C. trachomatis* L2/434, inicialmente reportado por [39], está em conformidade com o referido em [40]. A um volume de 200 µL de tampão de CaCl<sub>2</sub> (Tris 10 mM pH 7,4, CaCl<sub>2</sub> 50 mM) contendo 6 µg de DNA plasmídico (pDNA; pCS10, pCS11 ou pCS12; Tabela A.2), adicionou-se 20 µL de suspensão bacteriana de *C. trachomatis incM::aadA* (Tabela A.4), com aproximadamente 1 x 10<sup>9</sup> IFUs mL<sup>-1</sup> (“inclusion forming units” – IFUs). Após incubação durante 30 minutos à temperatura ambiente, retirou-se 200 µL desta preparação e acrescentou-se igual volume de células HeLa 229 (aproximadamente 4 x 10<sup>6</sup> células), previamente centrifugadas a 160 x g durante cinco minutos e ressuspendidas em tampão de CaCl<sub>2</sub>. Depois de uma segunda incubação durante 20 minutos à temperatura ambiente, a suspensão anterior foi colocada numa placa de cultura de seis poços contendo DMEM. Findas 16 horas de incubação a 37 °C em atmosfera humidificada com 5 % (v/v) de CO<sub>2</sub>, o meio de cada poço foi substituído por DMEM contendo Penicilina G (0,3 U mL<sup>-1</sup>) e, às 44 horas pós-transformação, as células foram lisadas em H<sub>2</sub>O. Para cada transformação, os lisados recolhidos, diluídos em SPG (sacarose 0,4 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 34 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6 mM, ácido glutâmico 10 mM), foram então centrifugados a 160 x g durante cinco minutos e o sobrenadante utilizado para inocular aproximadamente 6,5 x 10<sup>5</sup> células HeLa 229 num frasco T25, previamente equilibrado com HBSS. As células foram incubadas durante uma hora com leve agitação à temperatura ambiente, sendo por fim removido o inóculo e acrescentado novo meio, contendo Penicilina G (0,3 U mL<sup>-1</sup>), cicloheximida (1 µg mL<sup>-1</sup>) e espectinomicina (250 µg mL<sup>-1</sup>). O passo de reinfeção de células HeLa 229 com os lisados de uma anterior infecção foi repetido até observação de inclusões não aberrantes ao microscópio ótico, isto é, semelhantes às observadas para a estirpe L2/434 (“wild type”), indicando nesta fase que a transformação foi bem sucedida. A concentração ótima de penicilina utilizada para selecionar colônias transformadas foi de 1 U mL<sup>-1</sup>. Uma vez estabelecida a transformação, as estirpes foram cultivadas em meio contendo Penicilina G (10 U mL<sup>-1</sup>) e purificadas em placa usando células Vero, de acordo com [41].

### 2.7.3. Isolamento de clones de *C. trachomatis* (ensaio em placa)

Células Vero foram cultivadas numa placa de cultura de seis poços (4 x 10<sup>5</sup> células/poço) e infetadas com suspensões bacterianas de *C. trachomatis incM::aadA* (Tabela A.4), transformada com os plasmídeos pCS10, pCS11 ou pCS12 (Tabela A.2). As suspensões bacterianas usadas na infecção foram

previamente diluídas a  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  e  $10^{-8}$  em SPG (sacarose 0,2 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  17 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  3 mM, ácido glutâmico 5 mM). Após incubação a 37 °C em atmosfera humidificada com 5 % (v/v) de  $\text{CO}_2$ , o inóculo foi removido e adicionado DMEM, Penicilina G ( $1 \text{ U mL}^{-1}$ ), cicloheximida ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e espectinomicina ( $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Passadas 24 horas, o meio foi substituído por meio sólido com 1,2 % (m/v) agar e, em sobreposição, foi adicionado meio líquido, ambos contendo os antibióticos apropriados. Para cada transformação, placas bacterianas foram observadas ao microscópio ótico, no quarto dia de incubação. Nesta fase, as placas foram picadas, e os clones foram ressuspensos em meio de cultura e inoculados numa placa de 96 poços, contendo células Vero ( $2 \times 10^5$  células/poço). Às 48 horas de incubação, as células foram lisadas com  $\text{H}_2\text{O}$  e os extratos totais de cada clone, diluídos em SPG (sacarose 0,4 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  34 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  6 mM, ácido glutâmico 10 mM) e utilizados para infectar novas células Vero ( $2 \times 10^5$  células/poço), em placas de seis poços. O procedimento foi repetido passadas 48 horas, agora usando frascos T25 para infectar células HeLa 229 ( $6,5 \times 10^5$  células/frasco), com vista à expansão do clone desejado de cada transformação. Findas 48 horas de incubação a 37 °C em atmosfera humidificada com 5 % (v/v) de  $\text{CO}_2$ , as partículas infecciosas de *C. trachomatis* foram então extraídas das células, por lise osmótica, e armazenadas em alíquotas a -80 °C.

#### 2.7.4. Quantificação de partículas infecciosas

Células HeLa 229 foram cultivadas numa placa de cultura de tecidos de 24 poços ( $1 \times 10^5$  células/poço), 24 horas antes da infecção. Uma alíquota de *C. trachomatis* foi descongelada e foram feitas diluições seriadas em HBSS ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ ). A infecção de células HeLa 229 com estirpes de *C. trachomatis* segue o descrito em “Infecção de células HeLa 229”. Às 24 horas pós-infecção, as células foram fixadas e marcadas com os anticorpos apropriados para observação ao microscópio de fluorescência. Assumindo que uma bactéria origina uma inclusão por cada célula infetada, a determinação de IFUs por unidade de volume segue a equação 2.1 [37]:

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ médio inclusões/campo} \times \text{fator diluição} \times \text{n}^\circ \text{ campos/lamela}^*}{\text{Volume do inóculo (200 } \mu\text{L)}}$$

\*250 (microscópio de fluorescência Zeiss AxioImager D2, ampliação 400X).

#### 2.8. Preparação de lisados celulares e reinfeção de células HeLa 229

Células HeLa 229 ( $1 \times 10^5$  células/poço), num total de 14 poços (dois por condição) de uma placa de cultura de tecidos, foram infetadas com as estirpes L2/434 (“wild type”), *incM::aadA* ou *incM::aadA* transformada com os plasmídeos pFA202, pML25, pML26, pML27 ou pML28 (Tabela 2.2.1), em uma multiplicidade de infecção (“multiplicity of infection” – MOI) de 0,1. As células infetadas foram incubadas durante 40 horas a 37 °C, em atmosfera humidificada com 5 % (v/v) de  $\text{CO}_2$ , e lisadas em  $\text{H}_2\text{O}$  durante 15 minutos, à temperatura ambiente. Paralelamente, numa placa adicional (INPUT), células HeLa 229, sob as mesmas condições de cultura e infecção, foram fixadas em metanol a -20 °C, 24 horas pós-infecção, e utilizadas para calcular o título de IFUs por estirpe. Os lisados celulares obtidos na primeira placa (OUTPUT), diluídos em SPG (sacarose 0,4 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  34 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  6 mM, ácido glutâmico 10 mM) com um fator de 100, serviram para reinfetar células HeLa 229

( $1 \times 10^5$  células/poço) numa segunda placa de 24 poços (quatro por estirpe). Após adição de DMEM e gentamicina ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), as placas foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  em atmosfera humidificada com 5 % (v/v) de  $\text{CO}_2$  e fixadas com metanol a  $-20^\circ\text{C}$ , 24 horas depois da reinfeção. O título de IFUs do OUTPUT foi então determinado por microscopia de imunofluorescência, para cada estirpe, e normalizado para o título de IFUs do INPUT.

## 2.9. Anticorpos e marcadores de fluorescência

Para o *immunoblotting* utilizámos uma IgG policlonal de coelho anti-IncM na proporção de 1:2 000, uma IgG monoclonal de rato anti-hexahistidinas (6xHis) em 1:1 000, uma IgG monoclonal de rato anti-HSP60 recombinante de *C. trachomatis* (Thermo Fisher Scientific) em 1:1 000; uma IgG monoclonal de rato anti- $\alpha$ -tubulina (Sigma-Aldrich) em 1:1 000 e uma IgG monoclonal de ratazana anti-HA (Roche) em 1:1 000. Os anticorpos secundários conjugados com peroxidase de rábano (GE Healthcare) anti-coelho (Jackson ImmunoResearch), anti-rato (Sigma-Aldrich) e anti-ratazana (Jackson ImmunoResearch) foram usados, respetivamente, a 1:10 000.

Para a imunofluorescência, os anticorpos primários utilizados foram uma IgG monoclonal de ratazana anti-HA (Roche); uma IgG monoclonal de rato anti- $\gamma$ -tubulina (Sigma-Aldrich) e um anticorpo policlonal de cabra anti-MOMP, todos na proporção de 1:200, incluindo os anticorpos secundários apropriados. Para corar o DNA utilizámos 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI; Thermo Fisher Scientific) a 1:30 000. Por último, um anticorpo policlonal de cabra anti-*C. trachomatis* conjugado com o fluoróforo FITC (anti-CT-FITC; Merck Millipore) foi usado para titular IFUs, na proporção de 1:150.

## 2.10. Immunoblotting

Após SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad) usando um Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad). As membranas foram bloqueadas em solução com leite desnatado seco a 4 % (m/v), diluído em PBS e 0,2 % (v/v) de Tween-20, e em agitação durante uma hora, à temperatura ambiente ou durante a noite a  $4^\circ\text{C}$ . De seguida, as membranas foram incubadas com os anticorpos primário e secundário apropriados, diluídos na solução de bloqueio, em duas etapas sucessivas de uma hora, com agitação. Os anticorpos foram usados nas proporções indicadas no subcapítulo 2.9 – “Anticorpos e marcadores de fluorescência”. As proteínas foram detetadas por emissão de quimioluminescência, na presença de peróxido de rábano e solução ativadora de sinal e por exposição a Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare), seguida de revelação fotográfica do filme em câmara escura.

## 2.11. Microscopia de imunofluorescência

Para a imunofluorescência, as células foram fixadas em metanol a  $-20^\circ\text{C}$ , durante 5 – 10 minutos. Nas titulações, utilizou-se anticorpo anti-CT-FITC; nas restantes experiências, as células foram incubadas com os anticorpos primários e secundários apropriados, em duas etapas de uma hora, intercaladas com passos de lavagem em PBS e  $\text{H}_2\text{O}$ . Os anticorpos utilizados foram diluídos em PBS com soro de cavalo 10 % (v/v), de acordo com o descrito em 2.9 – “Anticorpos e marcadores de fluorescência”. O mesmo procedimento foi aplicado para o corante DAPI (ver subtítulo 2.9). As lamelas, montadas em lâminas

de vidro, em meio de Aqua-poly/Mount (Polysciences), foram observadas ao microscópio de fluorescência (Zeiss AxioImager D2) e as imagens, obtidas por microscopia confocal, processadas por Zeiss LSM Image Browser e *software* Fiji.

## **2.12. Análise estatística**

Os dados foram tratados em *Excel* 2016 para *Microsoft* 365 ou por análise de variância a um fator (one-way ANOVA) usando o programa GraphPad Prism 9.1.2 (225). Neste último, a média de cada grupo foi comparada à média do grupo controle e as diferenças entre os conjuntos de dados consideradas estatisticamente significativas se  $p < 0,05$  (\*).

## 3. Resultados

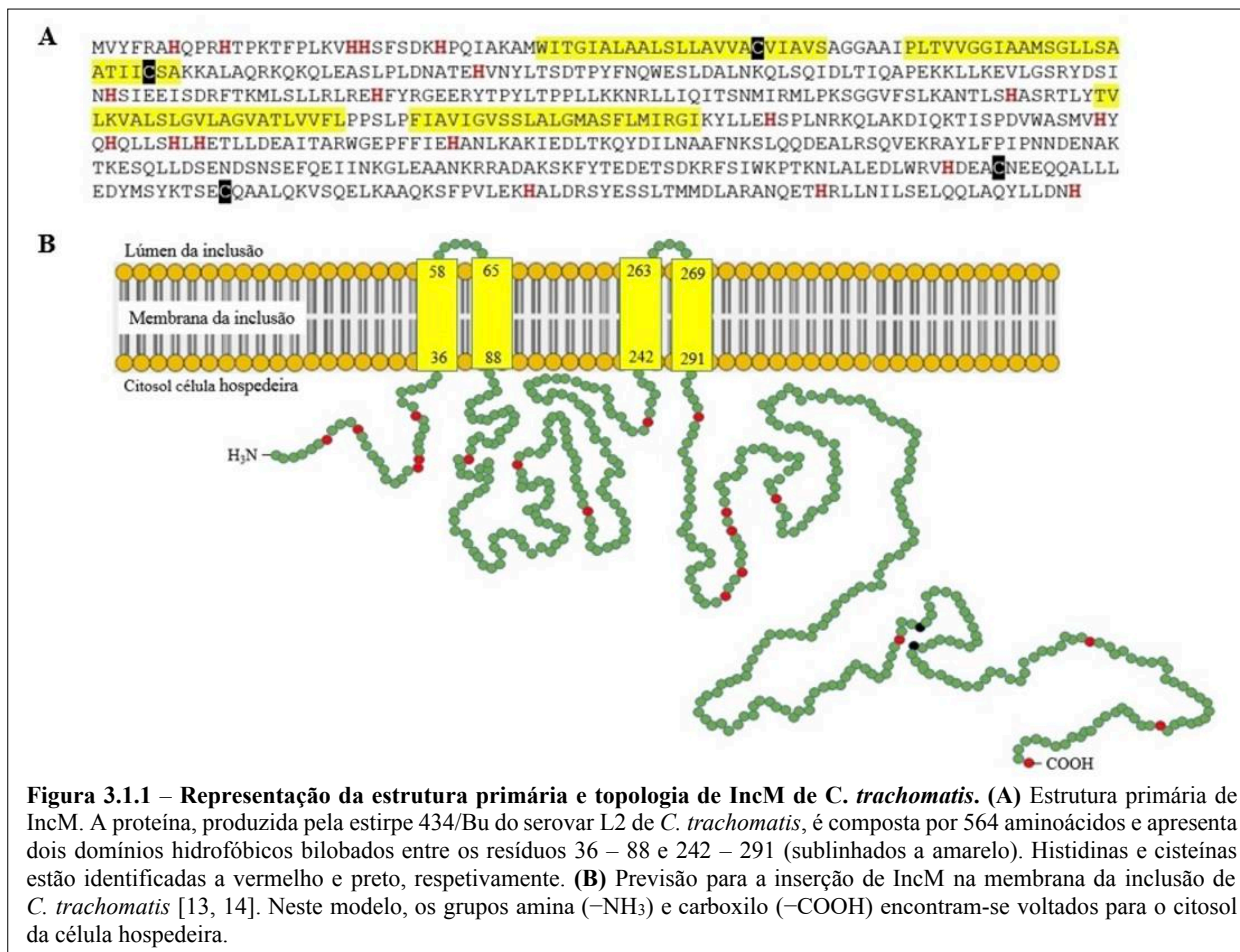
### 3.1 – Possível ligação de IncM de *C. trachomatis* ao hemo

Para estudar a hipótese da proteína IncM ligar hemo, estirpes de *E. coli* BL21 (DE3) foram transformadas com plasmídeos codificando IncMs mutantes de *C. trachomatis* L2 de 434/Bu. A construção das estirpes mutantes foi concebida de forma a que fossem produzidas IncMs com substituição de alguns aminoácidos por alaninas. As proteínas IncM, nestas estirpes, são produzidas com uma cauda de seis histidinas (6xHis) no N-terminal e a sua expressão génica é regulada pelo operão *lac*.

A ligação IncM-hemo *b* em extratos membranares, contendo um *pool* de proteínas de *E. coli* com a produção heteróloga de IncMs mutantes, foi então analisada por espectrofotometria UV-visível e comparada à da proteína (referida como) nativa ou “wild-type”, em amostras com IncM na forma oxidada e na forma reduzida. Antecipou-se que um padrão de diferença nos espectros de absorvância traçados para os diferentes extratos proteicos, quando comparado com o da IncM “wild type” (L2/434), identificaria o(s) aminoácido(s) potencialmente envolvido(s) na ligação específica do hemo. Para testar se a ligação ao hemo seria importante para a capacidade de IncM inibir a citocinese de células hospedeiras, o passo seguinte seria introduzir os genes que codificam as proteínas mutadas, para as quais se registaram alterações espectrais, em *C. trachomatis* e comparar a sua atividade com os fenótipos das estirpes L2/434 e de um mutante nulo, relativamente à capacidade de induzirem multinucleação em células hospedeiras.

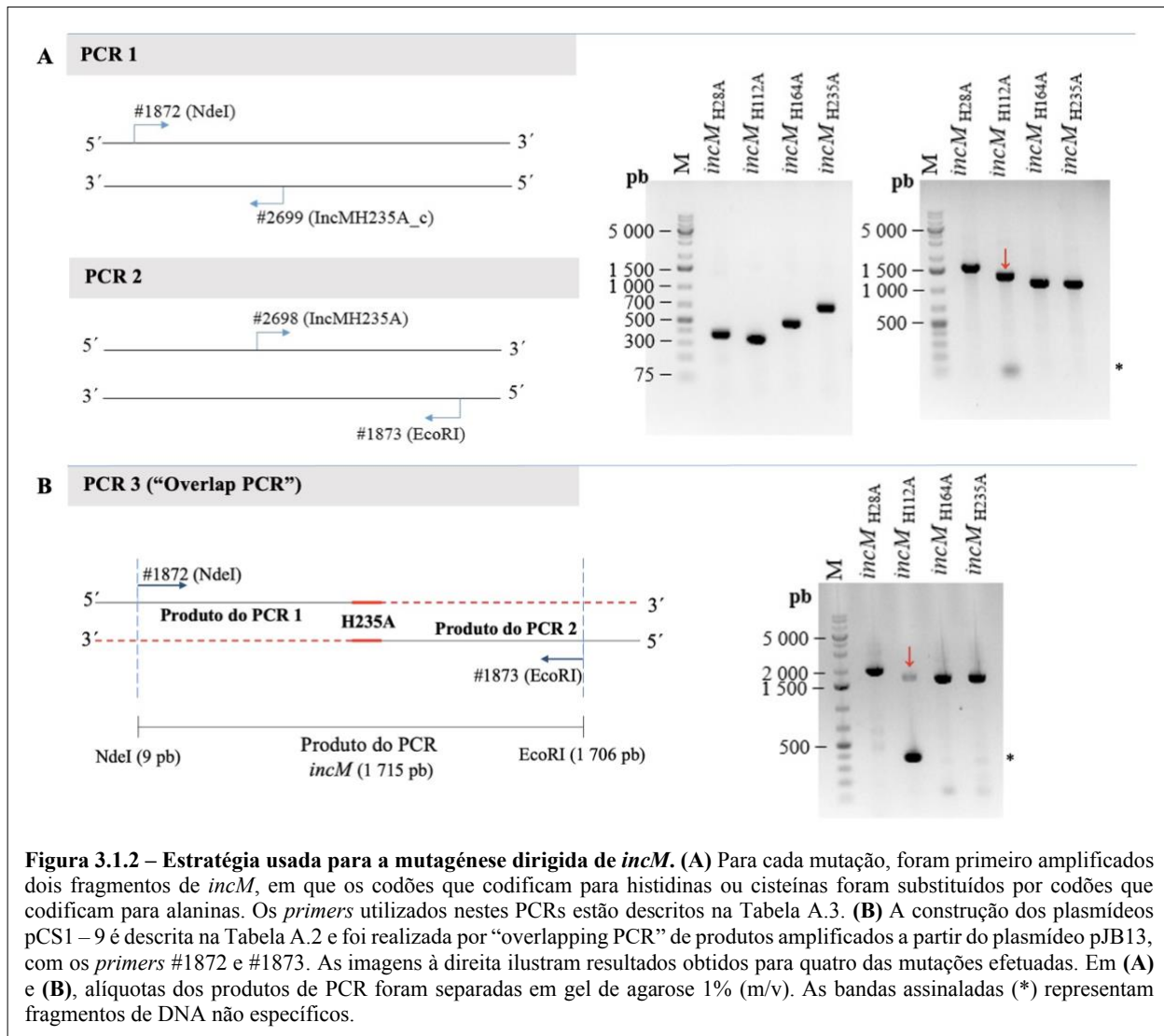
#### 3.1.1. Produção de IncM “wild type” e variantes em *E. coli*

O estudo efetuado tem por base um modelo que prevê a inserção de IncM na membrana da inclusão (Figura 3.1.1). Neste modelo, a proteína apresenta dois domínios hidrofóbicos bilobados entre os resíduos 36 – 88 e 242 – 291 e os grupos amina e carboxilo voltados para o citosol da célula hospedeira [13, 14].



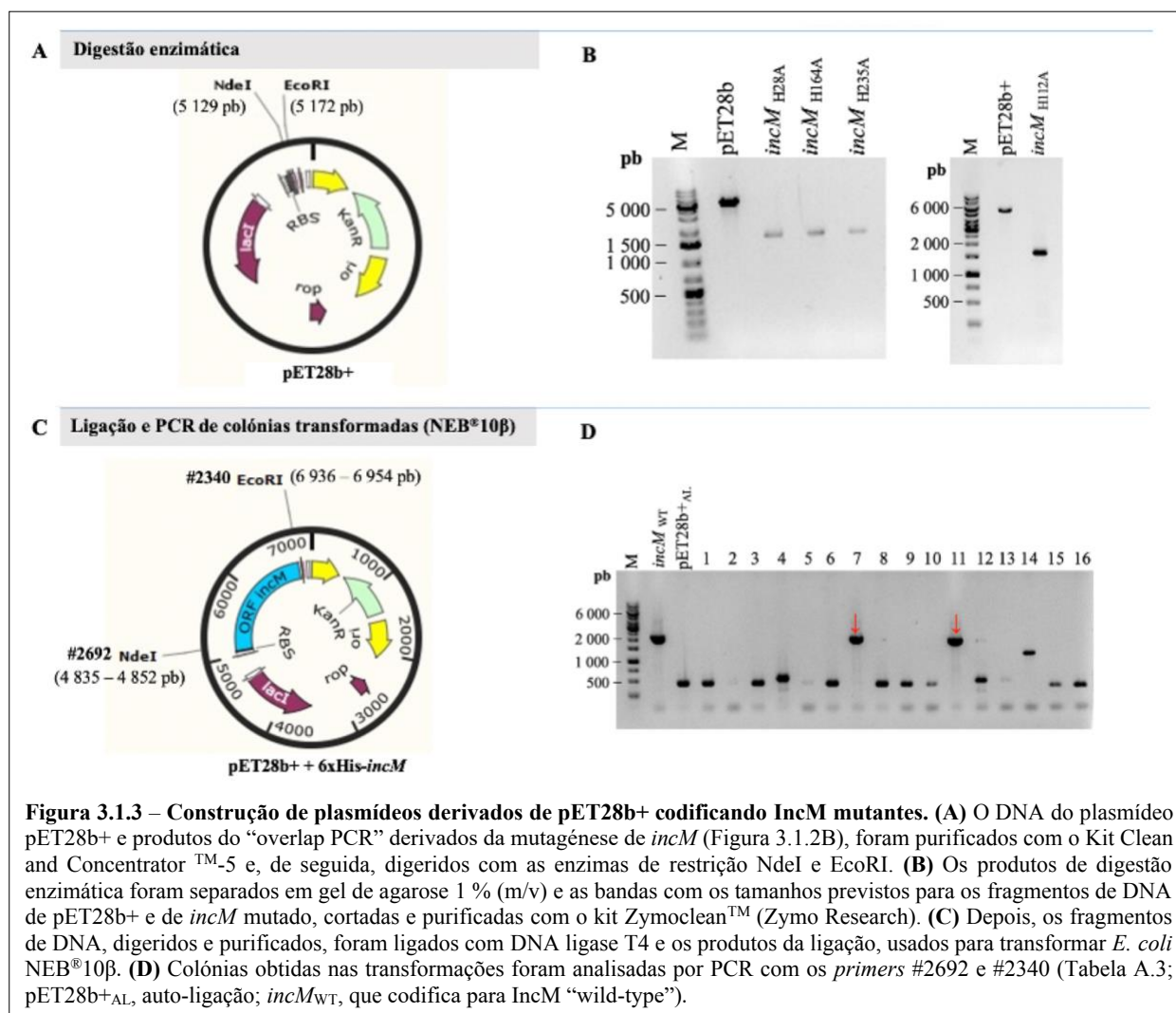
**Figura 3.1.1 – Representação da estrutura primária e topologia de IncM de *C. trachomatis*.** (A) Estrutura primária de IncM. A proteína, produzida pela estirpe 434/Bu do serovar L2 de *C. trachomatis*, é composta por 564 aminoácidos e apresenta dois domínios hidrofóbicos bilobados entre os resíduos 36 – 88 e 242 – 291 (sublinhados a amarelo). Histidinas e cisteínas estão identificadas a vermelho e preto, respetivamente. (B) Previsão para a inserção de IncM na membrana da inclusão de *C. trachomatis* [13, 14]. Neste modelo, os grupos amina (–NH<sub>3</sub>) e carboxilo (–COOH) encontram-se voltados para o citosol da célula hospedeira.

Uma vez identificados os aminoácidos que mais frequentemente são responsáveis pela coordenação do hemo (Tabela 1.1), neste caso histidinas para hemo *b*, e com base no modelo anterior e sequência de aminoácidos, foram primeiro inseridas nove mutações na IncM de *C. trachomatis* L2/434 (plasmídeos pCS1 – 9; Tabela A.2) por mutagénese dirigida (Figura 3.1.2), usando como molde o plasmídeo pJB13 (Tabela A.2).



**Figura 3.1.2 – Estratégia usada para a mutagênese dirigida de *incM*.** (A) Para cada mutação, foram primeiro amplificados dois fragmentos de *incM*, em que os códons que codificam para histidinas ou cisteínas foram substituídos por códons que codificam para alaninas. Os *primers* utilizados nestes PCRs estão descritos na Tabela A.3. (B) A construção dos plasmídeos pCS1 – 9 é descrita na Tabela A.2 e foi realizada por “overlapping PCR” de produtos amplificados a partir do plasmídeo pJB13, com os *primers* #1872 e #1873. As imagens à direita ilustram resultados obtidos para quatro das mutações efetuadas. Em (A) e (B), alíquotas dos produtos de PCR foram separadas em gel de agarose 1% (m/v). As bandas assinaladas (\*) representam fragmentos de DNA não específicos.

Os produtos de amplificação de *incM* mutado, digeridos com as enzimas de restrição NdeI e EcoRI, foram depois inseridos no vetor pET28b+ e utilizados para transformar *E. coli* NEB®10β (Figura 3.1.3). Após verificar a presença dos plasmídeos desejados por PCR de colónia e sequenciação do DNA, estes plasmídeos foram isolados e serviram para transformar *E. coli* BL21 (DE3), de forma a se poder produzir as diferentes proteínas IncM de *C. trachomatis*.

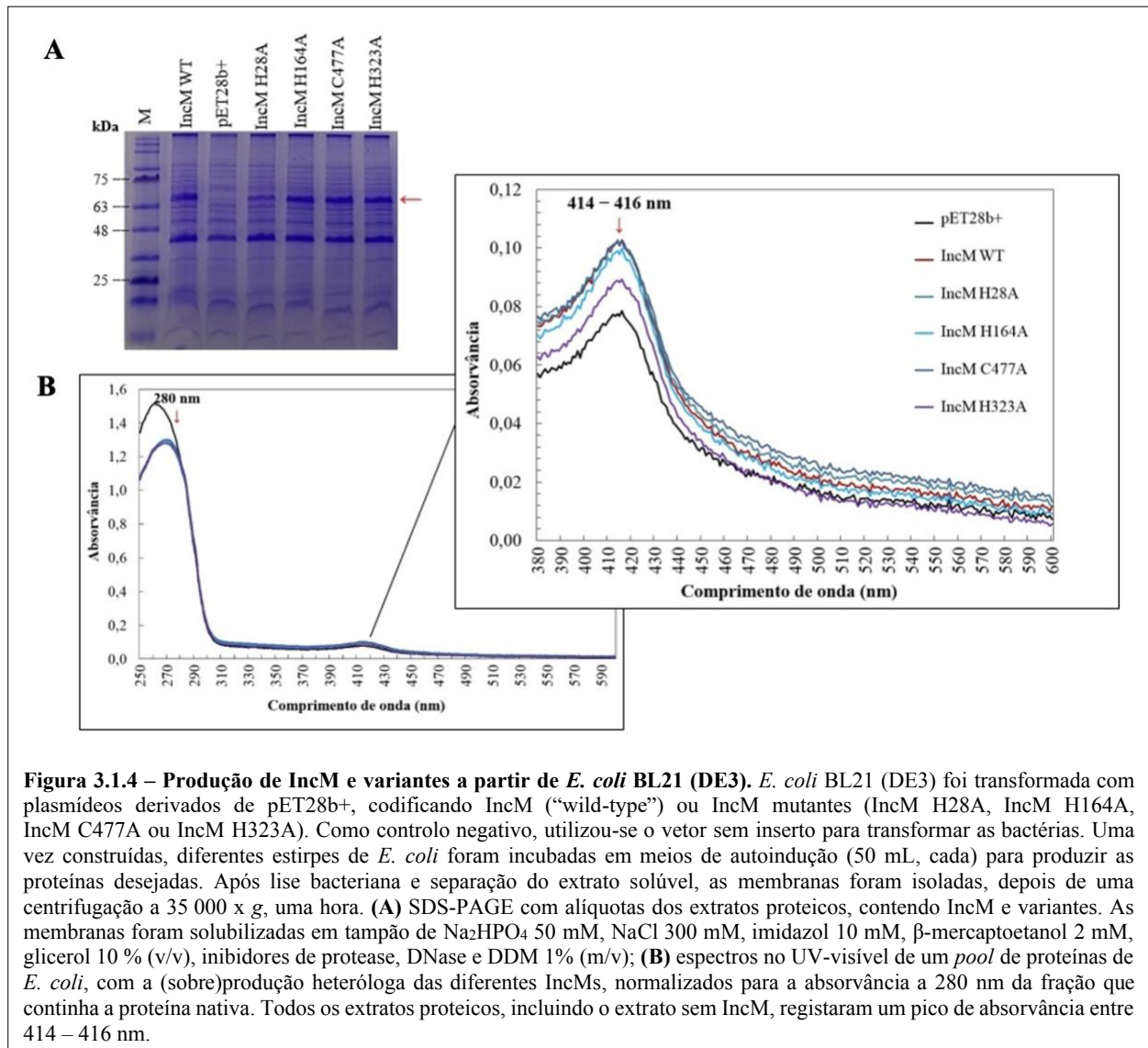


**Figura 3.1.3 – Construção de plasmídeos derivados de pET28b+ codificando *IncM* mutantes.** (A) O DNA do plasmídeo pET28b+ e produtos do “overlap PCR” derivados da mutagênese de *incM* (Figura 3.1.2B), foram purificados com o Kit Clean and Concentrator™-5 e, de seguida, digeridos com as enzimas de restrição NdeI e EcoRI. (B) Os produtos de digestão enzimática foram separados em gel de agarose 1 % (m/v) e as bandas com os tamanhos previstos para os fragmentos de DNA de pET28b+ e de *incM* mutado, cortadas e purificadas com o kit Zymoclean™ (Zymo Research). (C) Depois, os fragmentos de DNA, digeridos e purificados, foram ligados com DNA ligase T4 e os produtos da ligação, usados para transformar *E. coli* NEB®10β. (D) Colônias obtidas nas transformações foram analisadas por PCR com os *primers* #2692 e #2340 (Tabela A.3; pET28b+<sub>AL</sub>, auto-ligação; *incM*<sub>WT</sub>, que codifica para *IncM* “wild-type”).

Para a produção das diferentes proteínas *IncM*, cresceram-se cinco culturas (50 mL cada) de *E. coli* BL21 (DE3), que havia sido transformada com os plasmídeos pJB13 ou pCS1 a 4. Adicionalmente, preparou-se um controlo negativo, em que as bactérias foram transformadas com o vetor pET28b+ sem o inserto. Para cada cultura bacteriana, as células foram concentradas por centrifugação, e o *pellet* ressuspenso em tampão de lise. Posteriormente, as bactérias foram lisadas por sonicação. Após nova centrifugação e remoção das células não partidas, o isolamento de membranas resultou de uma centrifugação a 35 000 x g, durante uma hora. Depois, as membranas foram solubilizadas em tampão de lise com DDM 1 % (m/v) e, finalmente, uma última centrifugação a 30 000 x g separou as frações membranares solubilizadas, contendo as diferentes *IncMs* (Figura 3.1.4A).

### 3.1.2. *IncM* de *C. trachomatis* não liga o hemo *b*

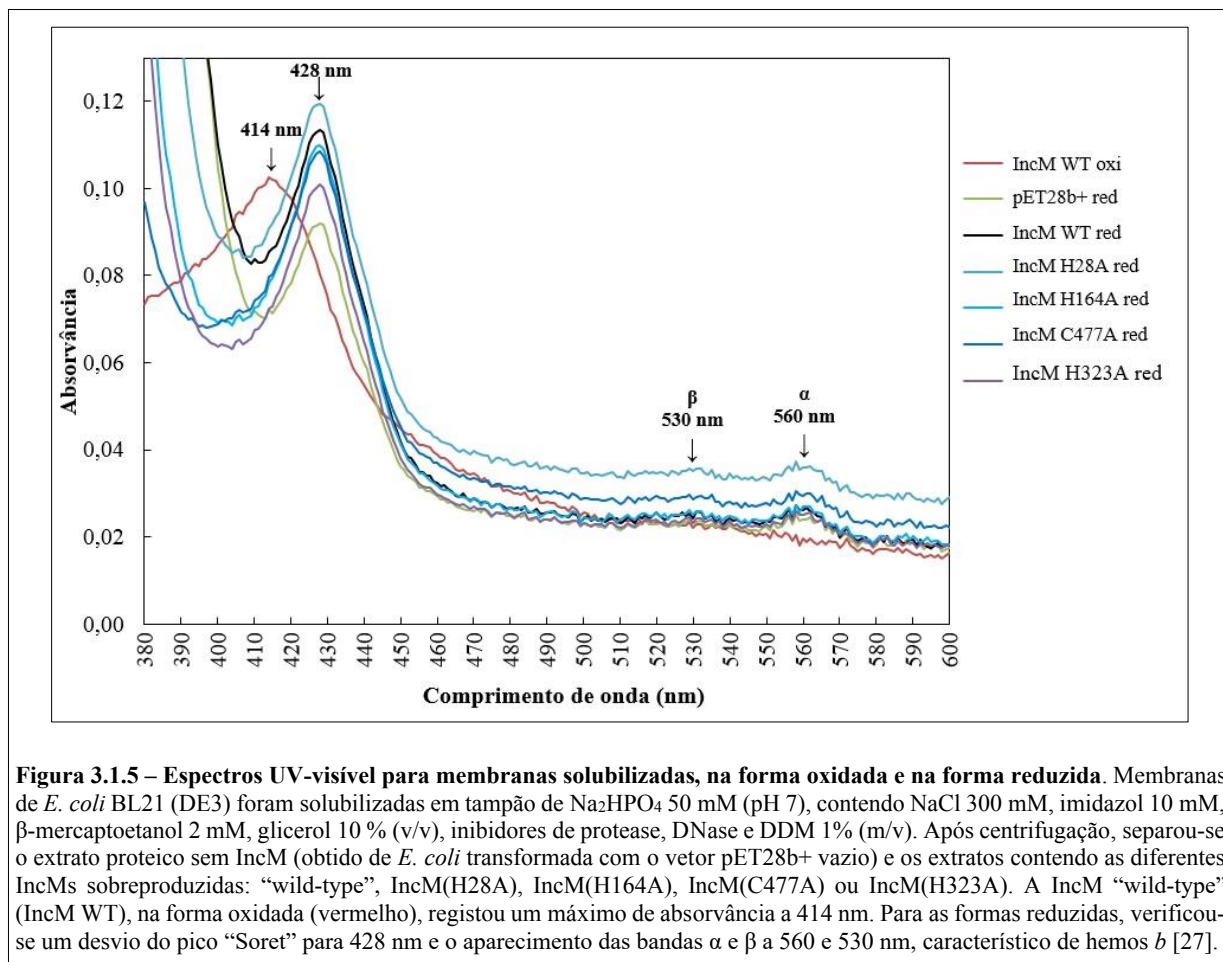
A ligação *IncM*-hemo *b* foi monitorizada por espectrofotometria UV-visível de preparações contendo um *pool* de proteínas de *E. coli* BL21 (DE3), com a produção heteróloga de *IncM* “wild type” ou variantes. Primeiramente, foram traçados os espectros de absorvância para as frações membranares solubilizadas de *E. coli* BL21 (DE3), transformada com os plasmídeos pJB13, pCS1 – 4 ou com o vetor pET28b+ vazio (Figura 3.1.4B).



**Figura 3.1.4 – Produção de IncM e variantes a partir de *E. coli* BL21 (DE3).** *E. coli* BL21 (DE3) foi transformada com plasmídeos derivados de pET28b+, codificando IncM (“wild-type”) ou IncM mutantes (IncM H28A, IncM H164A, IncM C477A ou IncM H323A). Como controle negativo, utilizou-se o vetor sem inserto para transformar as bactérias. Uma vez construídas, diferentes estirpes de *E. coli* foram incubadas em meios de autoindução (50 mL, cada) para produzir as proteínas desejadas. Após lise bacteriana e separação do extrato solúvel, as membranas foram isoladas, depois de uma centrifugação a 35 000 x g, uma hora. **(A)** SDS-PAGE com alíquotas dos extratos proteicos, contendo IncM e variantes. As membranas foram solubilizadas em tampão de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, β-mercaptoetanol 2 mM, glicerol 10 % (v/v), inibidores de protease, DNase e DDM 1% (m/v); **(B)** espectros no UV-visível de um pool de proteínas de *E. coli*, com a (sobre)produção heteróloga das diferentes IncMs, normalizados para a absorvância a 280 nm da fração que continha a proteína nativa. Todos os extratos proteicos, incluindo o extrato sem IncM, registaram um pico de absorvância entre 414 – 416 nm.

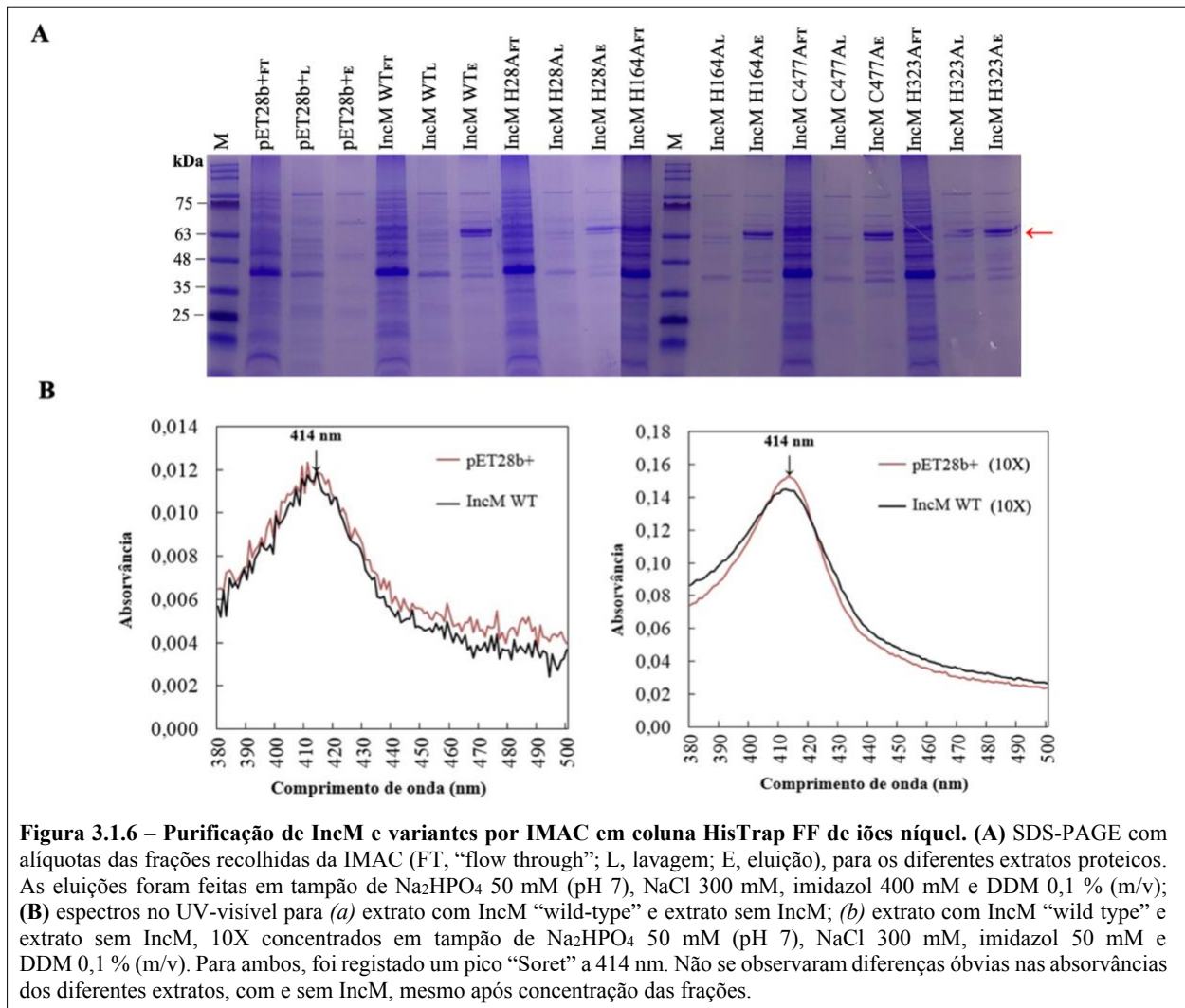
De seguida, correu-se um SDS-PAGE com alíquotas das diferentes preparações contendo os extratos proteicos de *E. coli*. O gel SDS revelou que as diferentes proteínas IncM eram produzidas, pela observação de uma banda que migra de acordo com uma massa molecular de 63 kDa, presente em todos os extratos e ausente no extrato correspondente à transformação que utilizou o vetor sem inserto (Figura 3.1.4A). Os espectros foram normalizados para a absorvância de 280 nm da fração que continha a proteína nativa. De notar que este procedimento poderá não ser o mais correto, uma vez que existe a possibilidade de uma elevada absorvância da banda a 260 nm (provavelmente devido à presença de nucleótidos) mascarar a absorvância do pico a 280 nm. Para todas as amostras foi registado um pico de absorvância entre 414 e 416 nm (banda “Soret”) – característico de hemo *b* – ainda que o crescimento com o vetor pET28b+ vazio, para o mesmo comprimento de onda, tenha apresentado um menor valor (Figura 3.1.4B). A substituição dos resíduos de histidina ou cisteína, por alaninas, na proteína IncM, parece não afetar significativamente os espectros de absorvância dos extratos membranares solubilizados com as diferentes IncMs, relativamente ao espectro traçado para o extrato contendo a proteína nativa.

Para melhor esclarecer se alguma das mutações poderia ter um efeito no espectro com o hemo reduzido, comparando com a IncM “wild-type”, traçamos novos espectros UV-visível para as frações membranares solubilizadas, na forma oxidada (para a IncM “wild-type”) e na forma reduzida (para as IncMs “wild-type” e variantes), adicionando ditionito de sódio a cada amostra (Figura 3.1.5).



O espectro do extrato com IncM na forma oxidada revelou um máximo de absorvância a 414 nm. Nos extratos com as proteínas na forma reduzida (após adição de ditionito de sódio), registou-se um desvio do pico “Soret” para 428 nm e o aparecimento das bandas α e β a 560 e 530 nm, respetivamente. Estes espectros são característicos de hemos *b* [27]. Apesar destas evidências, a ausência de perturbações espectrais entre proteínas IncM (variantes *versus* “wild type”), nos diferentes estados *redox* (Figuras 3.1.4 e 3.1.5), sugere o não envolvimento dos aminoácidos mutados na coordenação do hemo.

Ainda na tentativa de confirmar a interferência de outro(s) contaminante(s) de *E. coli*, todos os extratos membranares solubilizados foram purificados por IMAC, com passagem das preparações numa coluna HisTrap FF de iões níquel, e reanalisados espectrofotometricamente. Aliquotas das frações recolhidas da cromatografia de afinidade (“flow through”, lavagem e eluição), corridas num SDS-PAGE, validavam uma purificação de IncM bem sucedida (Figura 3.1.6A). Para todos os casos, a IncM foi detetada na fração eluída.



Posto isto, espectros de absorvância no UV-visível foram traçados para as frações eluídas da coluna de afinidade, de preparações com o extrato contendo a proteína nativa (preto) ou o extrato controlo (vermelho), tendo-se verificado que não existem diferenças óbvias entre ambos. Este resultado sugere que a proteína com hemo se tratava afinal de um contaminante de *E. coli* e que a IncM não fará a ligação específica do hemo. Além disso, após concentração dos produtos de eluição (Figura 3.1.6B), confirmou-se que este contaminante também concentra neste passo. Isto veio demonstrar que a proposta anterior de uma interação entre IncM e hemoss se tratava de um artefacto experimental. Esta evidência bastou para dispensar a análise dos restantes extratos recolhidos.

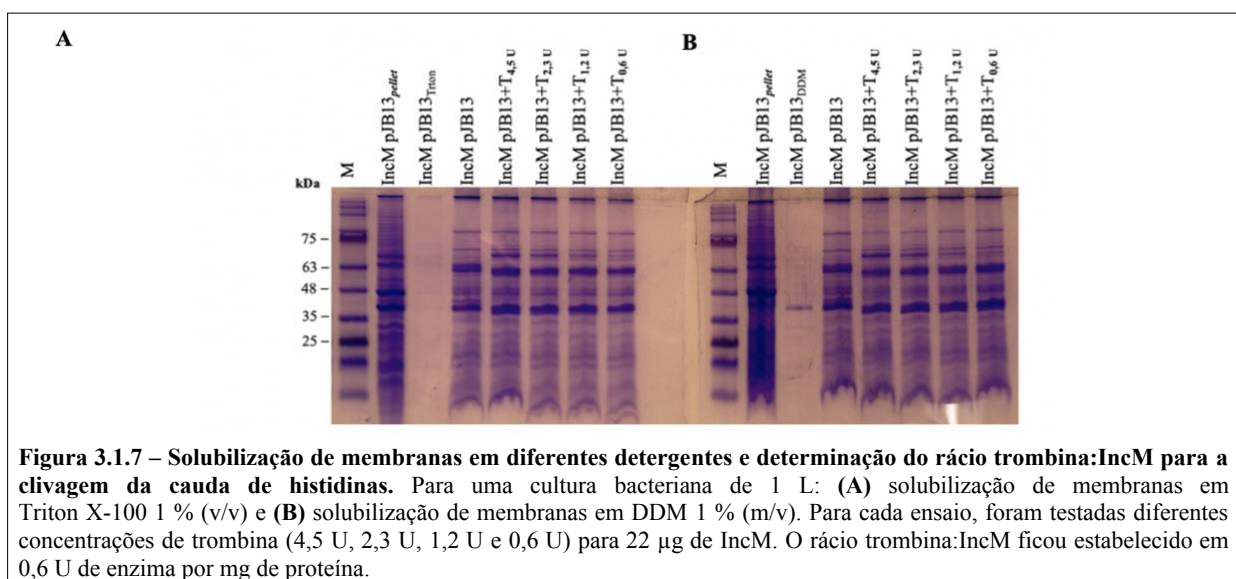
Com o objetivo de obter uma preparação mais pura e remover o contaminante hémico, procedeu-se, de seguida, à otimização da purificação de IncM adicionando passos a este protocolo, como a clivagem da cauda de histidinas com uma segunda passagem na coluna da IMAC.

### 3.1.3. Purificação de IncM e otimização das condições para análise estrutural por cristalografia de raios X

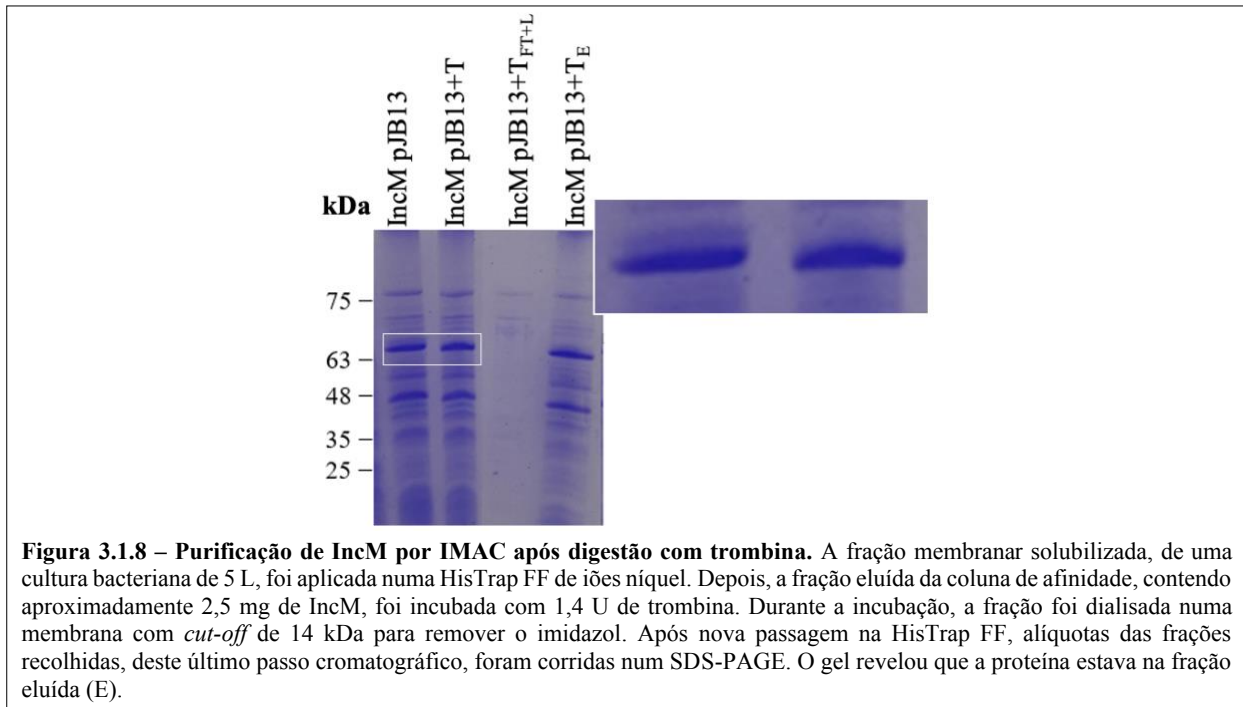
Durante a purificação de IncM, verificou-se que alíquotas das frações eluídas da coluna HisTrap FF, corridas num SDS-PAGE, exibiam repetidamente produtos de degradação e/ou contaminantes em torno de 57 e 43 kDa, respetivamente. Estes resultados, corroborados por trabalhos anteriores, mostravam a necessidade de melhorar as condições de produção e purificação da proteína. Assim, tentou-se otimizar este processo, quer no passo da solubilização das membranas com diferentes detergentes, quer através da clivagem da cauda de histidinas do N-terminal da IncM. Nesse sentido, cresceu-se *E. coli* BL21 (DE3), transformada com o plasmídeo pJB13, em 6 L de meio de autoindução, para a produção de IncM de larga escala. Desta cultura bacteriana, um volume de 1 L foi usado em experiências para otimizar as condições dos ensaios que, mais tarde, viriam a ser aplicados para a máxima quantidade de proteína produzida, extraída de uma cultura bacteriana de 5 L. Em primeiro lugar, a IncM, extraída da cultura de 1 L, foi utilizada para testar o efeito de dois detergentes no rendimento de solubilização das membranas e, em segundo lugar, para determinar a proporção trombina:IncM ideal, de forma a clivar a cauda de histidinas do N-terminal da IncM (Figura 3.1.7).

Quanto à determinação do rácio trombina:IncM para a digestão da cauda de histidinas, a IncM foi incubada com trombina, em diferentes concentrações de protease, e os resultados analisados por SDS-PAGE. A proporção ótima trombina:IncM a utilizar ficou então estabelecida em 0,6 U de enzima por mg de proteína, correspondendo à menor quantidade de trombina, testada, capaz de clivar a IncM, removendo a cauda de histidinas do seu N-terminal (Figura 3.1.7). De notar que a digestão enzimática ocorreu numa amostra contendo IncM relativamente pura, obtida de duas cromatografias: IMAC e cromatografia de exclusão molecular (SEC), com passagem do extrato eluído da HisTrap FF numa Superdex 200 (S200).

Para testar o rendimento de solubilização de membranas em diferentes detergentes, membranas de *E. coli* foram isoladas e ressuspensas em tampão de lise. Depois, esta suspensão foi dividida em duas amostras de igual volume às quais se adicionou, respetivamente, Triton X-100 1 % (v/v) e DDM 1 % (m/v). Seguidamente, alíquotas das frações membranares (contendo IncM), diferentemente solubilizadas, foram corridas num SDS-PAGE. Para iguais condições de ensaio, verificou-se que Triton X-100 teve um menor rendimento na solubilização de membranas que DDM (Figura 3.1.7).

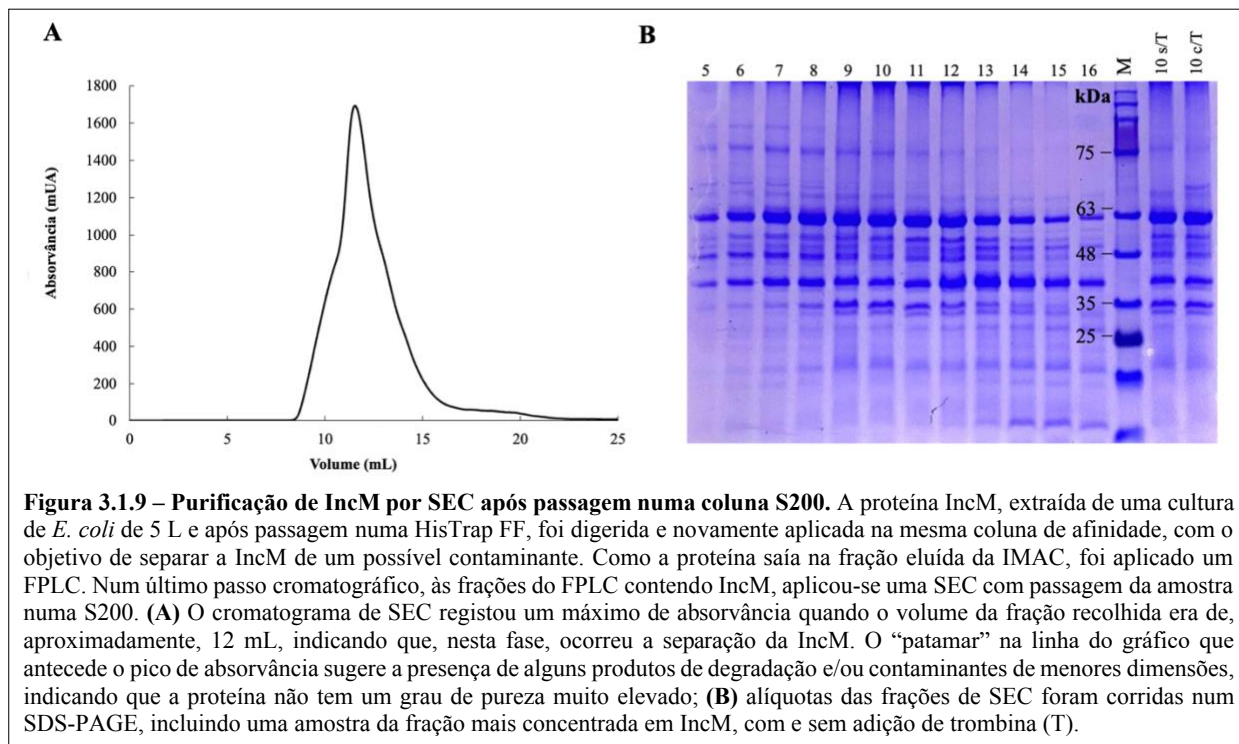


Tendo por base esta primeira experiência, agora para uma cultura bacteriana de 5 L, a fração membrana solubilizada foi purificada por IMAC; e a fração eluída da IMAC (que continha a IncM), incubada com 1,4 U de trombina. Neste caso, a digestão enzimática ocorreu numa amostra com um menor grau de pureza que a anterior (extrato da cultura de 1 L). Durante a incubação, a proteína foi dialisada numa membrana com *cut-off* de 14 kDa para remover o imidazol. Depois, o dialisado foi aplicado numa HisTrap FF e as frações recolhidas da IMAC, corridas num SDS-PAGE. O gel da eletroforese revelou que a proteína estava afinal na fração de eluição (E), quando seria expectável a sua deteção no “flow through” (FT). Portanto, o objetivo primário que seria remover um possível contaminante de *E. coli* que agarrara à coluna da IMAC, não se verificou.



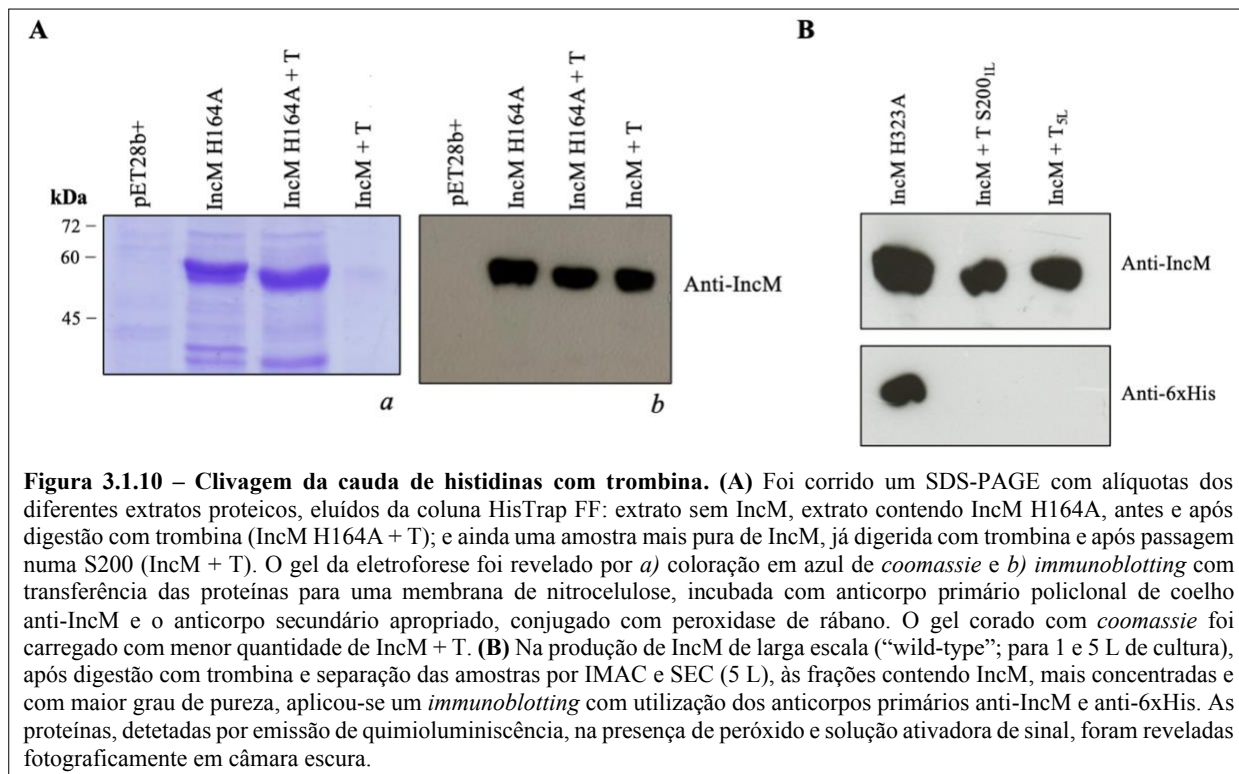
**Figura 3.1.8 – Purificação de IncM por IMAC após digestão com trombina.** A fração membrana solubilizada, de uma cultura bacteriana de 5 L, foi aplicada numa HisTrap FF de íões níquel. Depois, a fração eluída da coluna de afinidade, contendo aproximadamente 2,5 mg de IncM, foi incubada com 1,4 U de trombina. Durante a incubação, a fração foi dialisada numa membrana com *cut-off* de 14 kDa para remover o imidazol. Após nova passagem na HisTrap FF, alíquotas das frações recolhidas, deste último passo cromatográfico, foram corridas num SDS-PAGE. O gel revelou que a proteína estava na fração eluída (E).

No entanto, como a trombina parecia ter ação de clivagem, pela presença de um *shift* no gel para as bandas correspondentes à IncM, antes e após diálise, o mesmo passo de digestão enzimática foi repetido, agora para a fração de eluição da IMAC deste último passo cromatográfico. Uma vez mais, foi feita uma diálise durante a incubação para remover o imidazol, cuja concentração está aumentada no tampão de eluição, utilizado para separar a proteína da coluna. O produto de diálise foi então separado por FPLC; e as frações obtidas do FPLC, corridas num SDS-PAGE. Apesar da concentração de IncM ser reduzida, o cromatograma do FPLC e o gel da eletroforese revelaram que a trombina parecia não ter efeito, pois se a cauda de histidinas fosse clivada, IncM deveria perder a afinidade para a coluna e sair na fração FT do FPLC. Contudo, o que se verificou foi que a proteína só é removida depois de aplicado um gradiente de imidazol. Por fim, ainda na tentativa de se obter uma preparação com IncM mais pura, aplicou-se às frações do FPLC contendo proteína, uma SEC em coluna S200 (Figura 3.1.9).



**Figura 3.1.9 – Purificação de IncM por SEC após passagem numa coluna S200.** A proteína IncM, extraída de uma cultura de *E. coli* de 5 L e após passagem numa HisTrap FF, foi digerida e novamente aplicada na mesma coluna de afinidade, com o objetivo de separar a IncM de um possível contaminante. Como a proteína saía na fração eluída da IMAC, foi aplicado um FPLC. Num último passo cromatográfico, às frações do FPLC contendo IncM, aplicou-se uma SEC com passagem da amostra numa S200. **(A)** O cromatograma de SEC registou um máximo de absorvância quando o volume da fração recolhida era de, aproximadamente, 12 mL, indicando que, nesta fase, ocorreu a separação da IncM. O “patamar” na linha do gráfico que antecede o pico de absorvância sugere a presença de alguns produtos de degradação e/ou contaminantes de menores dimensões, indicando que a proteína não tem um grau de pureza muito elevado; **(B)** alíquotas das frações de SEC foram corridas num SDS-PAGE, incluindo uma amostra da fração mais concentrada em IncM, com e sem adição de trombina (T).

Analisado o cromatograma de SEC, verificou-se que, para além de existirem alguns agregados (que saem na frente de corrida), o grau de pureza de IncM não é muito elevado, tendo sido detetados alguns produtos de degradação e/ou contaminantes de menores dimensões (Figura 3.1.9A). Com o propósito de confirmar se a cauda de histidinas tinha sido efetivamente cortada foi corrido um SDS-PAGE com alíquotas das frações de SEC, incluindo uma amostra da fração mais concentrada em IncM, com e sem adição de trombina (Figura 3.1.9B). Como o gel não era esclarecedor relativamente à atividade de clivagem da cauda de histidinas pela trombina, às frações de SEC mais concentradas e com maior grau de pureza, aplicou-se um *immunoblotting*, utilizando os anticorpos primários anti-IncM e anti-6xHis, para assim detetar a IncM e verificar se a cauda de histidinas ainda continuava presente (Figura 3.1.10). Na validação do ensaio, considerou-se a análise de um extrato proteico contendo o vetor pET28b+ vazio; e outro, com uma IncM (IncM H323A) diferente da que foi testada, não digerida.



No *immunoblotting* verificou-se que anti-IncM detetou a proteína em todas as amostras, exceto no extrato de *E. coli* que havia sido transformada com o vetor pET28b+ sem o inserto; por sua vez, anti-6xHis revelou que a cauda de histidinas está ausente, quer na fração com IncM digerida, para o extrato da cultura de 1 L e após passagem numa S200; quer na fração com IncM digerida, para o extrato da cultura de 5 L. A cauda de histidinas apenas foi detetada na alíquota controlo, contendo a IncM(H323A) não digerida (Figura 3.1.10).

Estes resultados sugerem que a trombina clivou a cauda de histidinas do N-terminal de IncM mas, por uma razão desconhecida, a proteína parece ter afinidade para a HisTrap FF, impedindo a sua separação de possíveis contaminantes e/ou produtos de degradação neste passo da purificação.

## **3.2 – Pesquisa de aminoácidos em IncM importantes para a sua função**

Para testar se a capacidade de IncM em promover a multinucleação de células hospedeiras é conservada entre diferentes serovares de *C. trachomatis* e espécies de *Chlamydia*, usaram-se estirpes de *C. trachomatis* (já existentes no laboratório) derivadas de *incM::aadA* (mutante nulo), transformadas com plasmídeos codificando IncM dos serovares L2 (434/Bu) ou C (TW3) ou E (Bour); ou IncM de *C. muridarum* ou de *C. caviae*. As proteínas IncM nestas estirpes são produzidas com um duplo epítipo de hemaglutininas (2HA) de *Influenza* no C-terminal e os seus genes são expressos a partir do promotor de *incM* de L2/434. Como controlos, usámos a estirpe de *C. trachomatis incM::aadA* e a L2 de 434/Bu (“wild-type”; já analisada e usada como referência na Figura 3.1.1).

Previu-se que, caso IncM dos serovares C ou E ou IncM de *C. muridarum* ou de *C. caviae* não promovesse a multinucleação de células hospedeiras, seria possível identificar aminoácidos em IncM de L2 (434/Bu) potencialmente envolvidos na indução deste fenótipo. Posteriormente, caso a substituição desses resíduos por alaninas, em IncM de L2/434, resultasse numa alteração de fenótipo, significaria que essa mutação teria conduzido a uma perda de função da proteína.

### **3.2.1. Alinhamento entre proteínas IncM de diferentes serovares de *C. trachomatis* e espécies de *Chlamydia***

Em primeiro lugar, as estruturas primárias de IncM dos serovares L2, C e E de *C. trachomatis* foram alinhadas, recorrendo a uma plataforma bioinformática (“basic local alignment search tool” – BLAST) que determinou as seguintes percentagens de identidade: 96,1 % para as IncM de L2 e C e 95,7 % para as IncM de L2 e E (Figura 3.2.1) [42, 43]. Com este alinhamento verificou-se que as proteínas – de 564 (L2/434) e 563 aminoácidos (E/Bour e C/TW3) – divergem em alguns resíduos, sendo essa evidência mais notável na região da IncM exposta ao citoplasma da célula hospedeira, situada entre o segundo e terceiro domínios transmembranares (Figura 3.2.1).

Igualmente estudadas foram as IncM de *C. muridarum* e de *C. caviae*. O alinhamento de IncM de *C. trachomatis* com IncM de *C. muridarum* revelou 63,6 % de identidade, e com IncM de *C. caviae*, apenas 22,9 % [43, 44]. Portanto, é maior o grau de divergência entre homólogos produzidos por diferentes espécies do que por diferentes serovares (Figura 3.2.2), sendo que essas diferenças são mais pronunciadas entre as IncM de *C. trachomatis* e *C. caviae*. Desigualdades no comprimento total das proteínas foram igualmente detetadas: IncM de *C. muridarum*, com 558 aminoácidos, é menor que IncM de *C. caviae*, com 583 aminoácidos [44].

L2 434/Bu E/Bour C/TW3	MVYFRAHQPRHTPKTFPLKVVHHSFSDKHPQIAK <b>AMWITGIALAALSLLAV</b> MVYFRAHQPRHTPKTFPLEVVHHSFSDKHPQIAKAMRITGITLAALSLLAV MVYFRAHQPRHTPKTFPLKVVHHSFSDKHPQIAKAMRITGIALAALSLLAV : :
L2 434/Bu E/Bour C/TW3	<b>VACVIAVSAGGAAIPLTVVGGIAAMSGLLSAATIICS</b> AKKALAQRKQKQL VACVIAVSAGGAAIPLAVI <b>GGIAAMSGLLSAATIICS</b> AKKALAQRKQKQL VACVIAVSAGGAAIPLAVI <b>GGIAAMSGLLSAATIICS</b> AKKALAQRKQKQL : :
L2 434/Bu E/Bour C/TW3	<b>EAS</b> LPLDNATEHVNYLTSDT <b>PYFNQWESLD</b> DALNKQLSQIDLTIQAPEKKL <b>EEL</b> LPLDNATEHVNYLTSDT <b>SYFNQWESLD</b> DALNKQLSQIDLTIQAPEKKL <b>EES</b> LPLDNATEHVNYLTSDT <b>SYFNQWESLD</b> GALNKQLSQIDLTIQAPEKKL . .
	<b>CC1</b>
L2 434/Bu E/Bour C/TW3	LKEVLGSRYSINHSIEEISDRFT <b>KML</b> SLLRRLREHF <b>YRGEERYTPYL</b> TPP LKEVLGSRYSINHSIEEISDRFT <b>KML</b> SLLRRLREHF <b>CRGEERYAPYLS</b> PP LKEVLGSRYSINHSIEEISDRFT <b>KVLS</b> LRLREHF <b>YRGEERYAPYLS</b> PP : : :
L2 434/Bu E/Bour C/TW3	<b>LLKNRLLI</b> QITSNMIRMLPKSGGVFSLKANTLSHASRTLYT <b>VLKVALS</b> L <b>LLKNRLLT</b> QITSNMIRMLPKSGGVFSLKANTLSHASRTLYT <b>VLKVALS</b> L <b>LLKNRLLT</b> QITSNMIRMLPKSGGVFSLKANTLSHASRTLYT <b>VLKVALS</b> L : :
L2 434/Bu E/Bour C/TW3	<b>GVLGVAALIVVFL</b> PPSLPF <b>IAVIGVSSALGMA</b> SFLMIRGIKYLLEHSPL GVLGVAALII <b>IFL</b> PPSLPF <b>IAVIGVSSALGMA</b> SFLMIRGIKYLLEHSPL GVLGVAALII <b>IFL</b> PPSLPF <b>IAVIGVSSALGMA</b> SFLMIRGIKYLLEHSPL : ::
L2 434/Bu E/Bour C/TW3	NRKQLAKDIQKTI <b>SPDV</b> WASMVHY <b>QHQL</b> SHLHETLLDEAITAR <b>WGE</b> PF NRKQLAKDIQKTI <b>IPDV</b> LASMVHY <b>QHQL</b> SHLHETLLDEAITAR <b>WSE</b> PF NRKQLAKDIQKTI <b>SPDV</b> LASMVHY <b>QHQL</b> SHLHETLLDEAITAR <b>WSE</b> PF .
	<b>CC2</b>
L2 434/Bu E/Bour C/TW3	<b>IEHANLKAKIEDLTKQYDI</b> LNAAFNKS <b>LQ</b> DEALRS <b>QVE</b> KRAYLFPIPN <b>IEHANLKAKIEDLTKQYDI</b> LNAAFNKS <b>LQ</b> DEALRS <b>QVE</b> KRAYLFPIPN <b>IEHANLKAKIEDLTKQYDI</b> LNAAFNKS <b>LQ</b> DEALRS <b>QVE</b> KRAYLFPIPN : :
L2 434/Bu E/Bour C/TW3	DENAKTKESQLLSEDSNS <b>EFQE</b> I INKGLEAANKRRADAKSKFYTEDET DENAKTKESQLLSEDSNS <b>EFQE</b> I INKGLEAANKRRADAKSKFYTEDET DENAKTKESQLLSEDSNS <b>EFQE</b> I INKGLEAANKRRADAKSKFYTEDET .
	<b>CC3</b>
L2 434/Bu E/Bour C/TW3	SDKRFSIWKP <b>TKN</b> LALEDLWRVH <b>DEACNEEQQ</b> ALLEDYMSYKTSEC <b>QAA</b> SDKRFSIWKP <b>TKN</b> LALEDLWRVH <b>DEACNEEQQ</b> ALLEDYMSYKTSEC <b>QAA</b> SDKRFSIWKP <b>PKN</b> LALEDLWRVH <b>DEACNEEQQ</b> ALLEDYMSYKTSEC <b>QAA</b> . .
	<b>CC4</b>
L2 434/Bu E/Bour C/TW3	<b>LQKVSQELKAAQKSFAV</b> LEKHALDRSYESS <b>LTMMDLARANQETH</b> RLLNIL <b>LQKVSQELKAAQKSFAV</b> LEKHALDRSYESS <b>VAMMDLARANQETH</b> RLLNIL <b>LQKVSQELKAAQKSFAV</b> LEKHALDRSYESS <b>VAMMDLARANQETH</b> RLLNIL . : ::
L2 434/Bu E/Bour C/TW3	<b>SELQQLAQYLLDNH</b> <b>SELQQLAQYLLDNH</b> <b>SELQQLAQYLLDNH</b>

**Figura 3.2.1 – Alinhamento de seqüências de IncM de diferentes serovares de *C. trachomatis*.** As estruturas primárias de proteínas IncM produzidas por estirpes de *C. trachomatis* dos biovars LGV (L2 434/Bu), urogenital (E/Bour) e ocular (C/TDW3) foram alinhadas e, os aminoácidos que diferem ao longo destas seqüências, assinalados a amarelo; (:) diferença ligeira; (•) diferença moderada. As IncM de L2/434 e de E/Bour têm 95,7 % de identidade; As IncM de L2/434 e de C/TW3, 96,1 % [43]. As regiões membranares (negrito) e domínios “coiled-coil” (CC1 – 4, cinzento) foram identificados para a IncM(L2/434) [42].

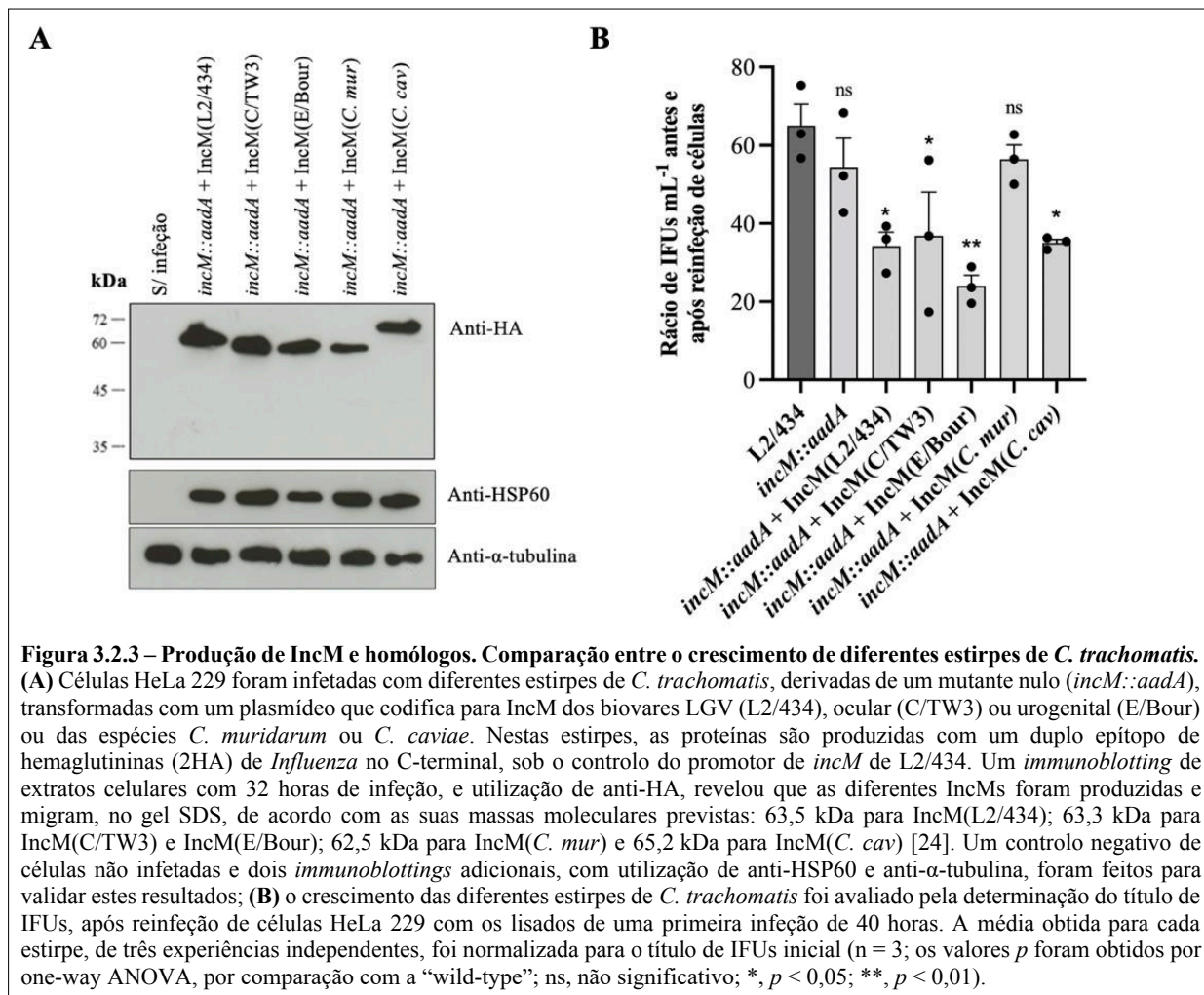


### 3.2.2. Caracterização de estirpes de *C. trachomatis* que produzem IncM de diferentes serovares de *C. trachomatis* e espécies de *Chlamydia*

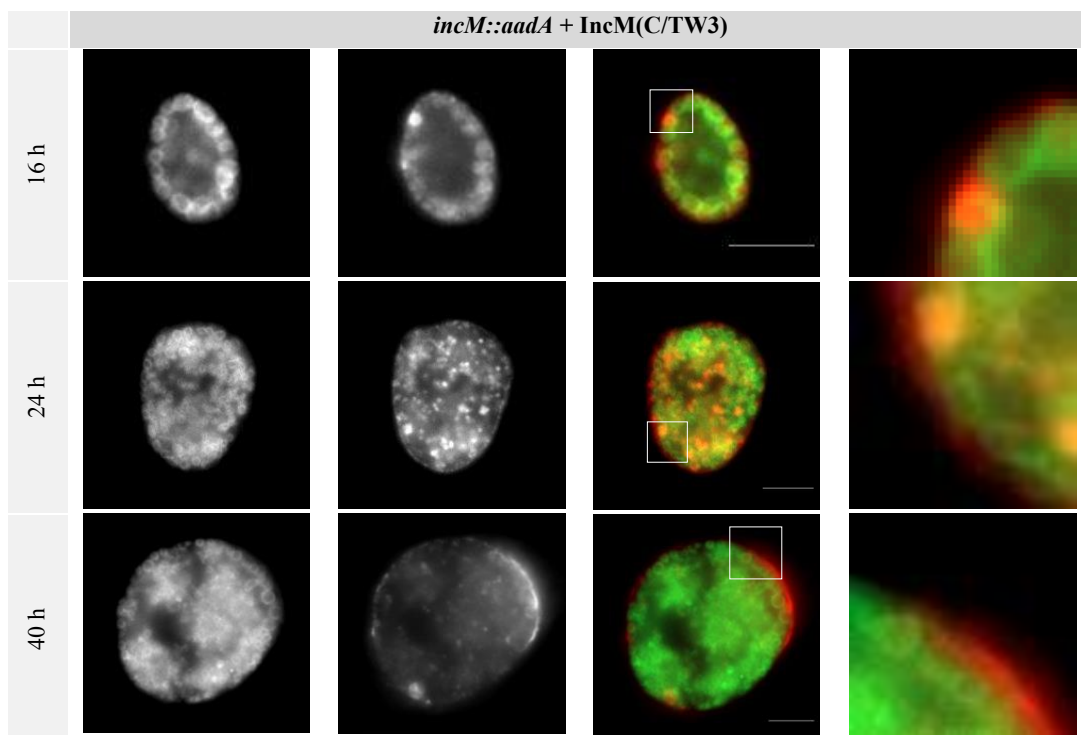
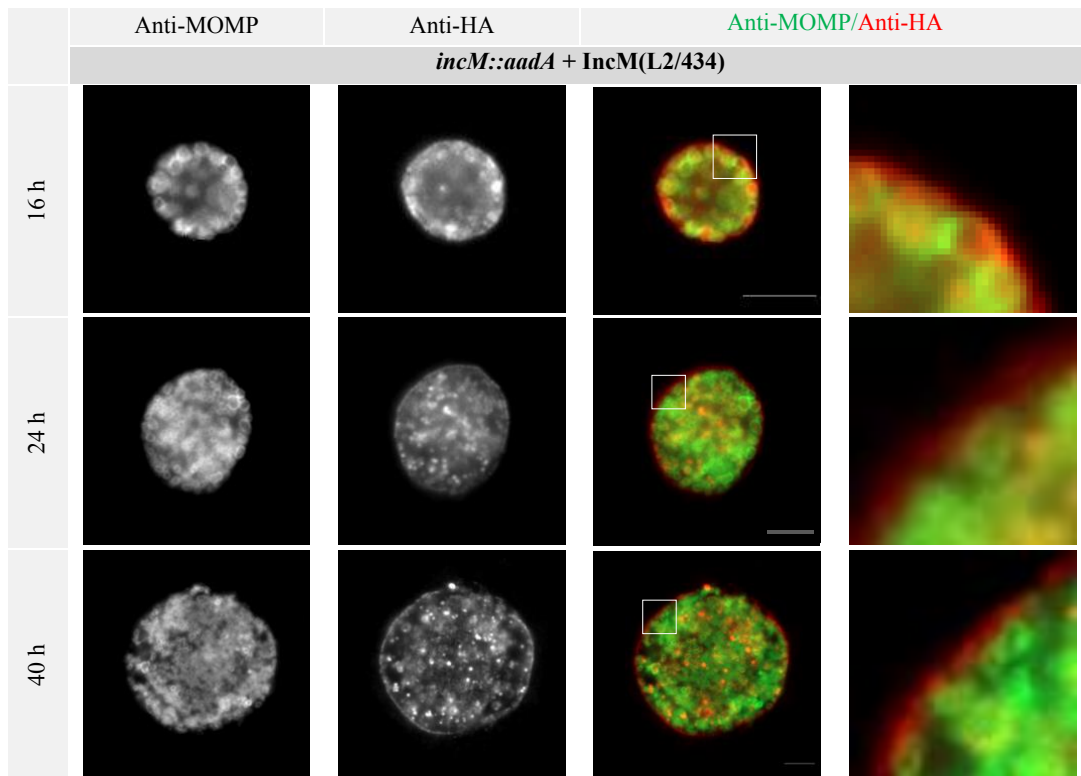
Tal como acima referido, estirpes de *C. trachomatis* derivadas do mutante *incM::aadA* tinham sido transformadas com um plasmídeo codificando IncM dos biovares LGV (L2/434), urogenital (E/Bour), ocular (C/TW3) ou das espécies *C. muridarum* ou *C. caviae*, sob a regulação do promotor de *incM* de *C. trachomatis* L2/434. Estas estirpes foram usadas para infectar células HeLa 229, com o objetivo de determinar o padrão de multinucleação das células hospedeiras por comparação a infeções com *incM::aadA* e a estirpe “wild-type”.

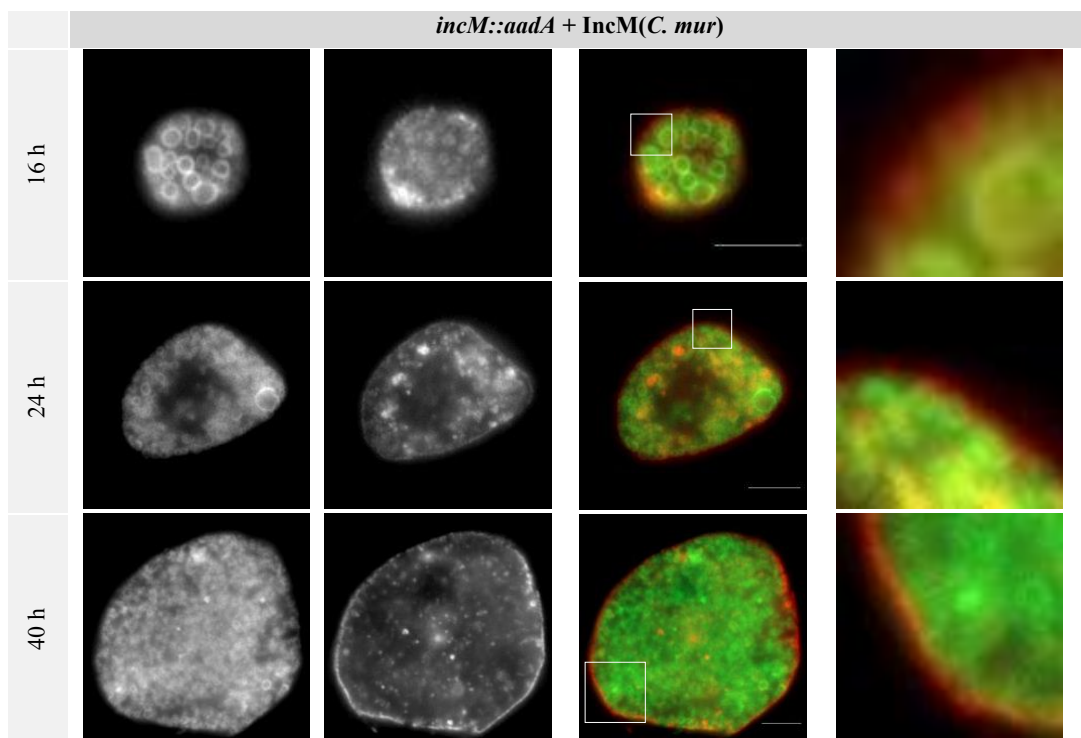
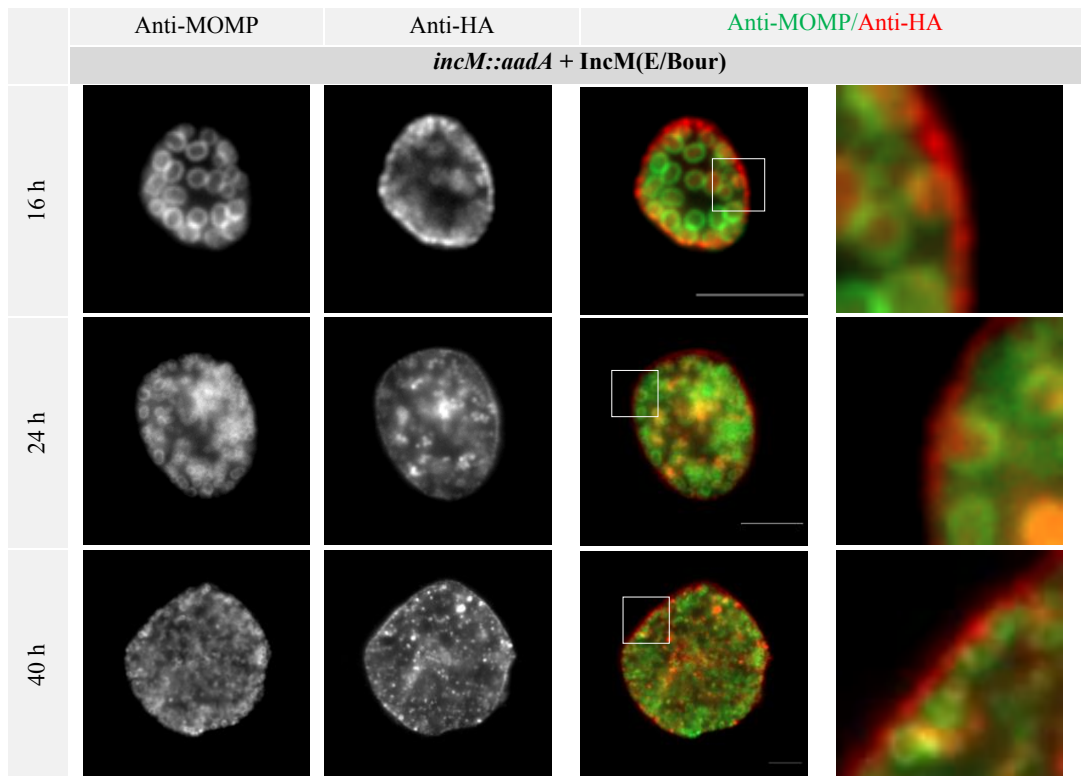
Como controlo, iniciámos este estudo analisando dois fatores: em primeiro lugar, se as estirpes de *C. trachomatis* produziam a proteína IncM; e em segundo lugar, se as proteínas IncM localizavam-se na membrana da inclusão. Após confirmação, fomos testar se havia algum efeito na capacidade de *C. trachomatis* promover a multinucleação de células hospedeiras. Para as experiências de controlo, padronizámos as infeções calculando as multiplicidades de infeção (MOI) pretendidas, com base no título de unidades formadoras de inclusão (IFUs), previamente determinado para cada estirpe (ver capítulo 2 – “Materiais e Métodos”). Seguidamente, analisámos a produção de IncM e homólogos por *immunoblotting* de extratos totais, recolhidos a partir de células com 32 horas de infeção (Figura 3.2.3A). Os resultados mostraram que as estirpes de *C. trachomatis* produziam proteínas IncM que migram em SDS-PAGE de acordo com as suas massas moleculares previstas (Figura 3.2.3A).

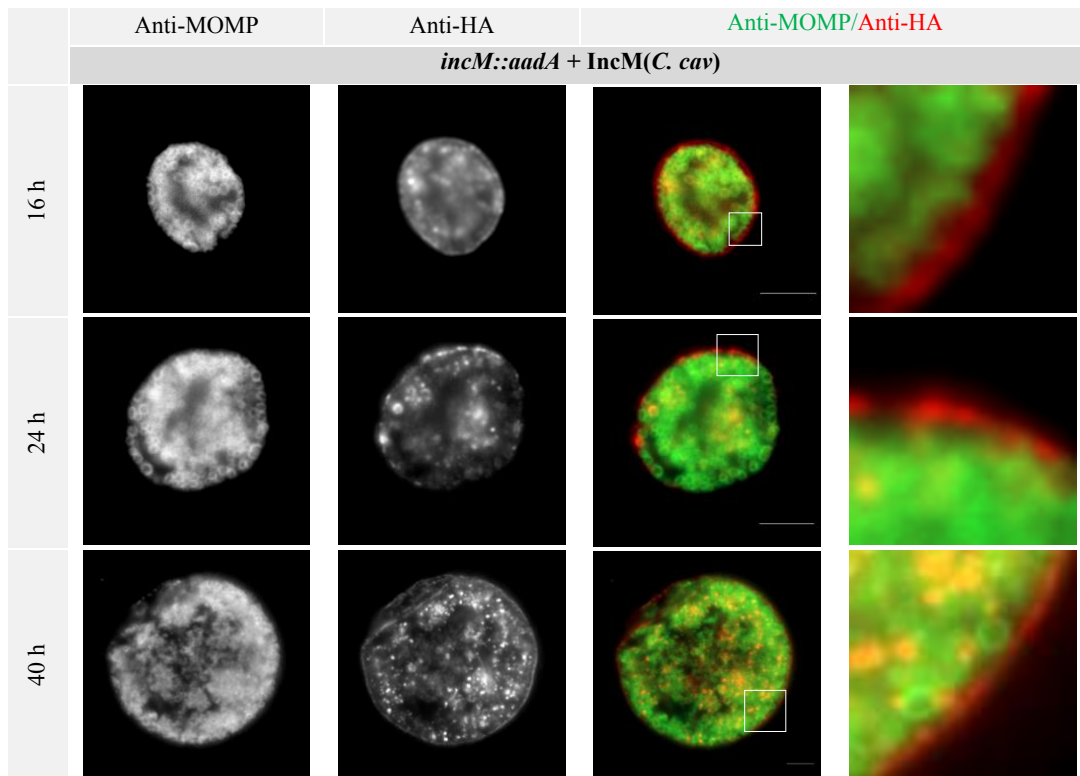
Estudos anteriores [14] e investigações em curso no laboratório indicam que a proteína IncM de L2/434, quando sobreproduzida em *C. trachomatis*, inibe o crescimento de *Chlamydia* (Luís M. e Mota L., resultados não publicados). Por essa razão, comparámos o crescimento de várias estirpes, incluindo *incM::aadA*, em relação ao crescimento de *C. trachomatis* L2/434 (“wild-type”; Figura 3.2.3B). Não foram registadas diferenças estatisticamente significativas na capacidade de propagação de *incM::aadA* e da estirpe derivada de *incM::aadA* produzindo IncM de *C. muridarum* (Figura 3.2.3B). Contudo, as estirpes que produzem IncM dos serovares L2 ( $p < 0,05$ ), C ( $p < 0,05$ ), E ( $p < 0,01$ ) e a estirpe mutante que produz IncM de *C. caviae* ( $p < 0,05$ ) apresentaram menor capacidade de gerar descendência (Figura 3.2.3B). Ou seja, a particularidade de IncM, ectopicamente codificado (e por isso sobreproduzido), inibir o crescimento de *C. trachomatis* é conservada entre IncMs de diferentes serovares de *C. trachomatis* e espécies de *Chlamydia*. No caso de IncM de *C. muridarum*, a proteína parece ser produzida em menor quantidade e, talvez por isso, não se detete a inibição do crescimento de *C. trachomatis* (Figura 3.2.3). Deve-se, no entanto, ressaltar a ideia de que a quantidade de proteína detetada no *immunoblotting* deriva de uma só experiência, sendo necessários mais testes para apoiar esta tese.



Para verificar se as proteínas IncM dos biovars ocular (C/TW3), urogenital (E/Bour) e dos homólogos derivados de *C. muridarum* e de *C. caviae* tinham a mesma localização de IncM do biovar LGV (L2/434), células HeLa 229 foram infetadas, durante 16, 24 e 40 horas, com as estirpes de *C. trachomatis* que produzem as diferentes IncMs. As células infetadas foram processadas para imunofluorescência, usando um anticorpo anti-MOMP para evidenciar as chlamydiae (verde), um anticorpo anti-HA para marcar IncM (vermelho) e os anticorpos secundários apropriados (Figura 3.2.4). Imagens representativas das diversas infecções mostram que IncM e homólogos localizam-se, predominantemente, na periferia da inclusão de células hospedeiras ao longo do ciclo de desenvolvimento bacteriano, não tendo sido detetadas diferenças óbvias na localização das diferentes proteínas.





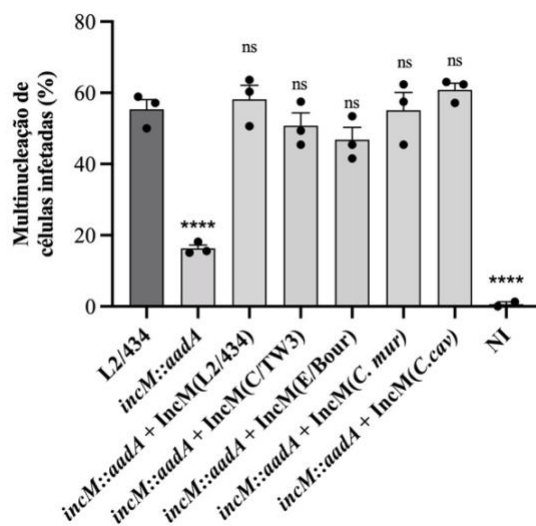
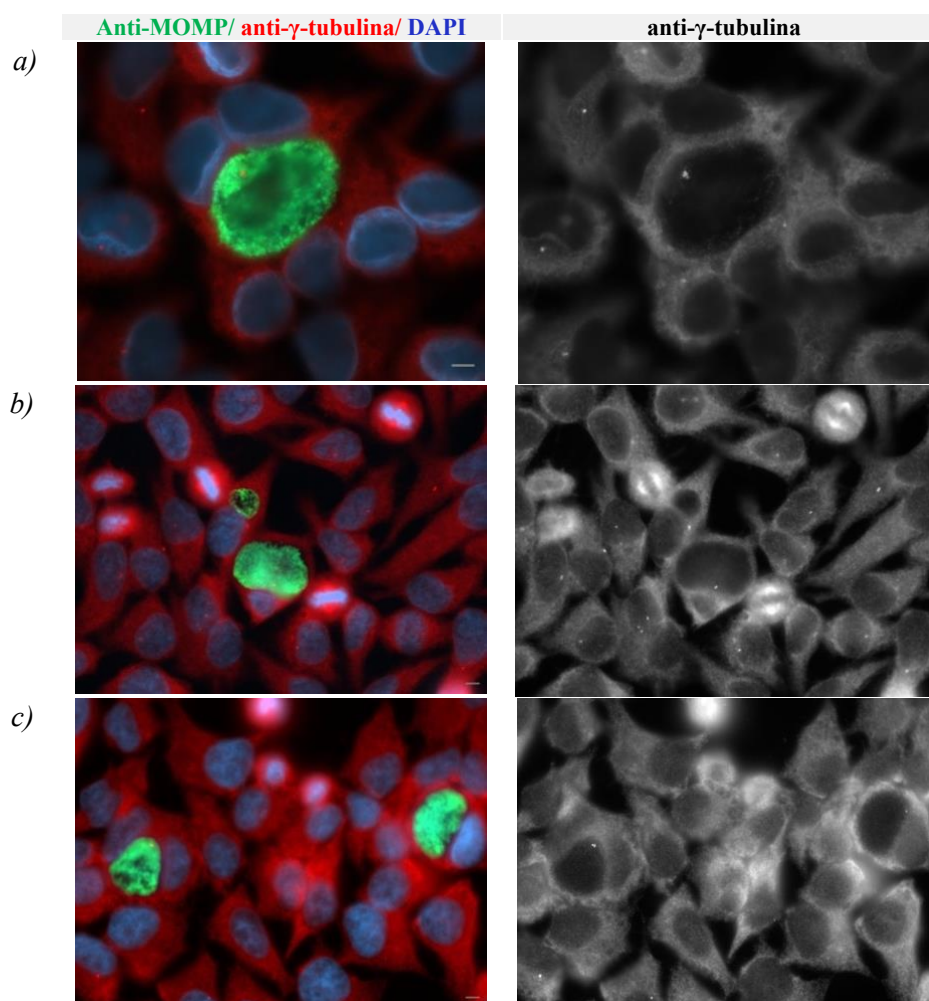


**Figura 3.2.4 – Localização de IncM e homólogos em células HeLa 229 infectadas com *C. trachomatis*.** Células HeLa 229 foram infectadas com as estirpes de *C. trachomatis* indicadas, construídas a partir de um mutante nulo (*incM::aadA*). As células, fixadas com metanol, 16, 24 e 40 horas após infecção, foram marcadas com anti-MOMP (principal proteína da membrana externa de *Chlamydia*, verde), anti-HA (IncM, vermelho) e observadas ao microscópio de fluorescência (Zeiss AxioImager D2). As fotografias, representadas à escala de 5 µm, foram processadas por Zeiss LSM Image Browser e *software* Fiji. Para cada estirpe, a imagem à direita representa uma região ampliada da membrana da inclusão.

### 3.2.3. A capacidade de IncM induzir a multinucleação é conservada entre serovares de *C. trachomatis* e espécies de *Chlamydia*

Na experiência seguinte, testou-se então se as proteínas IncM de diferentes serovares de *C. trachomatis* e espécies de *Chlamydia* tinham capacidade de induzir a multinucleação de células hospedeiras, tal como IncM de L2/434 (“wild-type”). Para isso, comparou-se o efeito na multinucleação das estirpes que produzem as diferentes IncMs com o das estirpes “wild-type” e mutante nulo. Assim, células HeLa 229 foram infectadas (com as diferentes estirpes), durante 40 horas, e processadas para imunofluorescência. As células infectadas foram fixadas e incubadas com anti-MOMP para marcar as chlamydiae (verde), anti- $\gamma$ -tubulina para marcar os centrossomas (vermelho) – em ambos, usando anticorpos secundários apropriados – e DAPI para corar os núcleos (azul). Após contagem do número de núcleos por célula infectada (num total de, pelo menos, 70 células infectadas) ao microscópio de fluorescência, os resultados obtidos, para o número de células multinucleadas, de três experiências independentes ( $n = 3$ ), foram representados sob a forma de um gráfico de barras (Figura 3.2.5A). Verificou-se que todas as estirpes mutantes complementaram o fenótipo de *incM::aadA*, cuja percentagem de células multinucleadas é significativamente menor, igualando o fenótipo da “wild-type” (Figura 3.2.5A). Assim, estes resultados sugerem que a capacidade de IncM induzir a multinucleação de células hospedeiras é conservada entre serovares de *C. trachomatis* e espécies de *Chlamydia*.

Na Figura 3.2.5B são apresentadas imagens, obtidas por microscopia de imunofluorescência, de infecções com as estirpes de *C. trachomatis* a) L2/434, b) *incM::aadA* e c) a estirpe derivada de *incM::aadA*, produzindo IncM sob a regulação do seu promotor endógeno. Em a) uma célula infetada com *C. trachomatis*, multinucleada, é identificada pela presença de uma inclusão (a verde), dois núcleos (a azul) e quatro centrossomas (a vermelho); em b) duas células infetadas, não multinucleadas, caracterizam-se pela presença de uma inclusão (a verde) e um núcleo; em c) os dois fenótipos são observados relativamente ao número de núcleos por célula hospedeira.

**A****B**

**Figura 3.2.5 – Comparação do fenótipo de multinucleação de células hospedeiras para infecções com diferentes estirpes de *C. trachomatis*.** (A) Células HeLa 229 foram infectadas com as estirpes de *C. trachomatis* L2/434 (“wild-type”), *incM::aadA* (IncM nula) ou estirpes derivadas de *incM::aadA* produzindo IncM dos biovars LGV (L2/434), ocular (C/TW3) ou urogenital (E/Bour) ou das espécies *C. muridarum* ou *C. caviae*, sob a regulação do promotor de *incM* de *C. trachomatis* L2/434. As células infectadas durante 40 horas, foram fixadas e marcadas com anti-MOMP (verde, para marcar as chlamydiae), anti- $\gamma$ -tubulina (vermelho, centrossomas) e DAPI (azul, núcleos). Os resultados são dados pelo número de células multinucleadas observadas ao microscópio de fluorescência, em pelo menos 70 células infectadas, de três experiências independentes ( $n = 3$ ). Os valores  $p$  foram obtidos por one-way ANOVA, por comparação à “wild-type”; ns, não significativo; \*\*\*\*,  $p < 0,0001$ . (B) Imagens representativas das infecções com as estirpes a) L2/434, b) *incM::aadA* e c) *incM::aadA* + IncM(L2/434). A escala é de 5  $\mu$ m.

### 3.2.4. Possível homologia estrutural entre IncM e proteínas eucarióticas da família bicaudal D

Uma vez que a capacidade de IncM induzir a multinucleação de células hospedeiras é conservada entre serovares de *C. trachomatis* e espécies de *Chlamydia* (Figura 3.2.5A), estas experiências não permitiram identificar resíduos de IncM que possam estar envolvidos na sua capacidade de induzir a multinucleação de células infetadas.

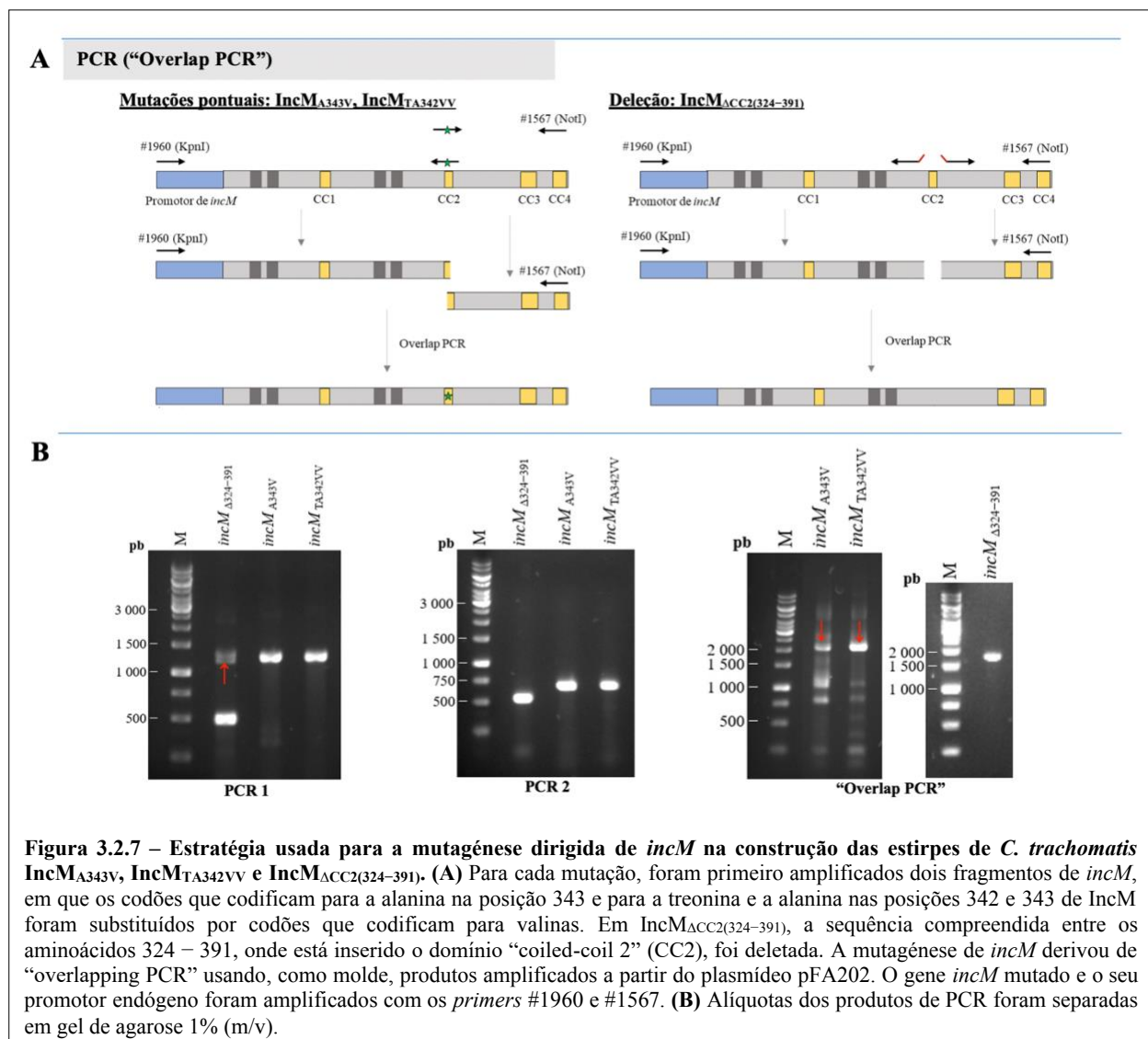
Partindo agora de uma análise bioinformática de IncM usando a plataforma Phyre 2, previamente realizada no laboratório (Luís M. *et al*, resultados não publicados), considerou-se que haveria a hipótese de uma possível homologia estrutural entre uma região de IncM (contendo o seu domínio “coiled-coil” 2) e a proteína eucariótica “bicaudal-D-related 1” (BICDR-1). As proteínas da família bicaudal D (BICD) são uma classe de proteínas adaptadoras que controlam a atividade de motores moleculares de microtúbulos, sendo necessárias para o tráfego vesicular e de outros componentes ao longo do citosqueleto da célula [35]. Esta possibilidade de homologia estrutural pode ser relevante para o estudo de IncM, na investigação das suas funções, pelo que foi explorada com maior detalhe.

Em mamíferos, o alinhamento de sequências de ortólogos de BICD (BICD1, BICD2, BICDR-1 e BICDR-2), entre si e com outros ativadores de dineína, identificou a conservação de duas regiões – um segmento de CC1 e o motivo Spindly – entre proteínas BICD e Spindly (Figura 3.2.6A) [45]. A região conservada de CC1 é um segmento da estrutura “coiled-coil”, junto ao N-terminal que interage com a cadeia leve intermediária 1 (“light intermediate chain 1” – LIC1) de dineína [45]. Em CC1 de BICD, mutações de duas alaninas conservadas por resíduos de valina impedem a interação com dineína e dinactina *in vitro*, resultando num fenótipo de perda de função, em *Drosophila*, que se reflete no aparecimento de organismos com um abdómen de duas caudas [45]. Os dois resíduos de alanina são conservados, não só entre ortólogos de BICD, como também entre outras proteínas adaptadoras de ativação de dineína citoplasmática [45].

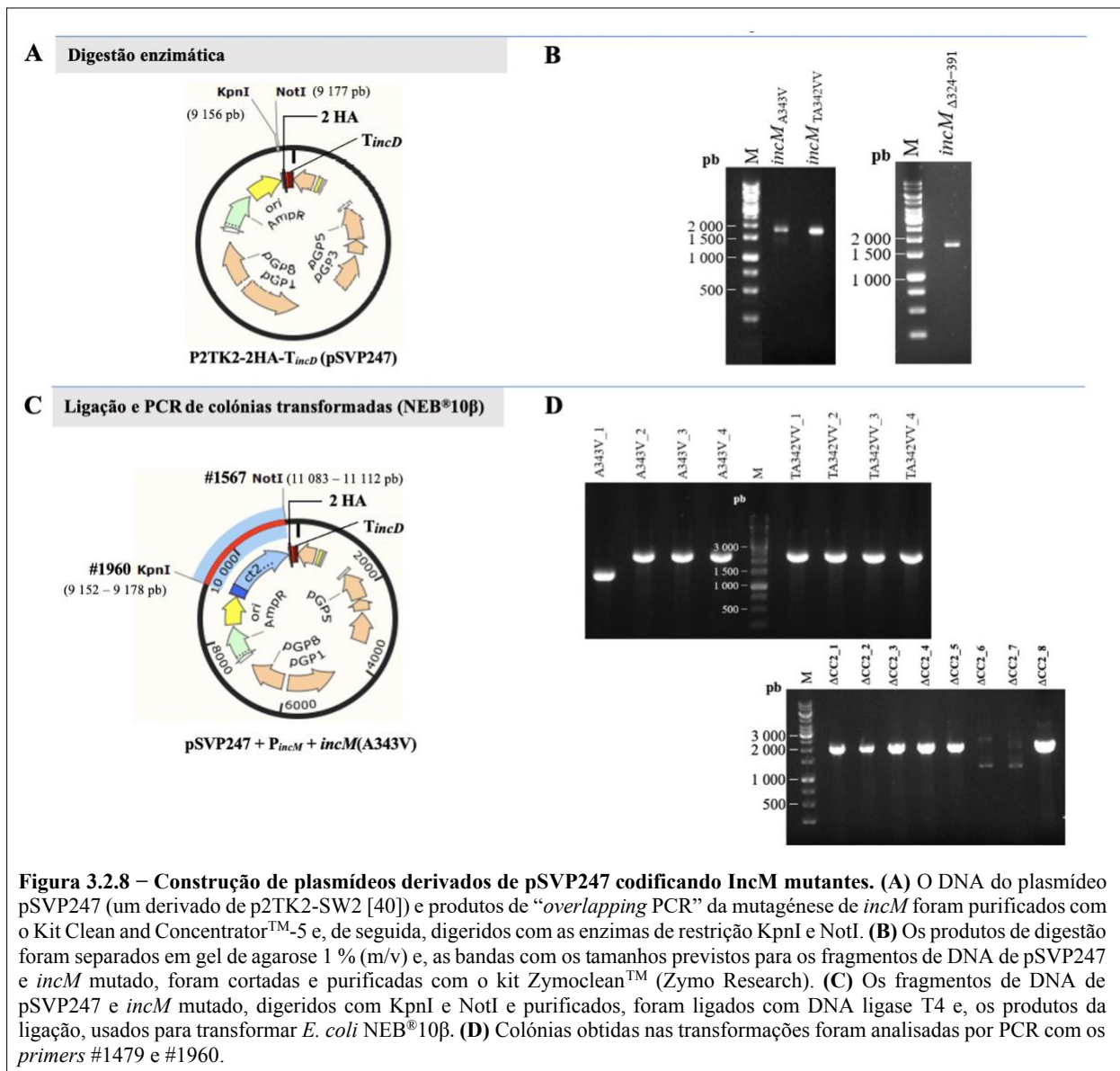


### 3.2.5. Construção de estirpes de *C. trachomatis* que produzem proteínas IncM mutantes, baseado na possível homologia estrutural com proteínas da família BICD

Com base nas mutações anteriormente referidas para BICD e na perda de função de BICD associada a essas mutações – acompanhada de uma alteração de fenótipo em organismos mutantes do género *Drosophila* – três estirpes produzindo IncM mutantes foram construídas em laboratório e, os seus fenótipos de multinucleação de células hospedeiras, analisados por microscopia de imunofluorescência. As estirpes mutantes de *C. trachomatis* concebidas para este trabalho são derivadas de *incM::aadA* por transformação com os plasmídeos pCS10, pCS11 ou pCS12 (Tabela A.2), obtidos por mutagênese dirigida de *incM*. As mutações realizadas em *incM* estão esquematicamente representadas na Figura 3.2.7A (ver também Figura 3.2.6B) e incluem a substituição de uma alanina por uma valina na posição 343 de IncM (pCS10); a substituição de uma treonina e de uma alanina por duas valinas nas posições 342 e 343 de IncM (pCS11) e, finalmente, a deleção da região onde foi detetada homologia com proteínas BICD e que insere o domínio CC2 de IncM, compreendida entre os aminoácidos 324 – 391 (pCS12).



A mutagênese de *incM* derivou de “overlapping PCR” de produtos amplificados a partir do plasmídeo pFA202, contendo *incM* nativo (Tabela A.2). Durante a construção dos plasmídeos mutantes, alíquotas dos produtos de PCR foram separadas em gel de agarose 1 % (m/v; Figura 3.2.7B). Para cada mutação, o produto da amplificação de *incM* mutado e do seu promotor endógeno foi digerido com as enzimas de restrição KpnI e NotI e inserido no vetor pSVP247 (Figuras 3.2.8A, B e C). Finalmente, colônias de *E. coli* NEB®10β transformadas foram analisadas por PCR (Figura 3.2.8D) e, o seu DNA, utilizado para transformar *E. coli* K12 ER2925 e, por último, a estirpe mutante *incM::aadA* de *C. trachomatis*.

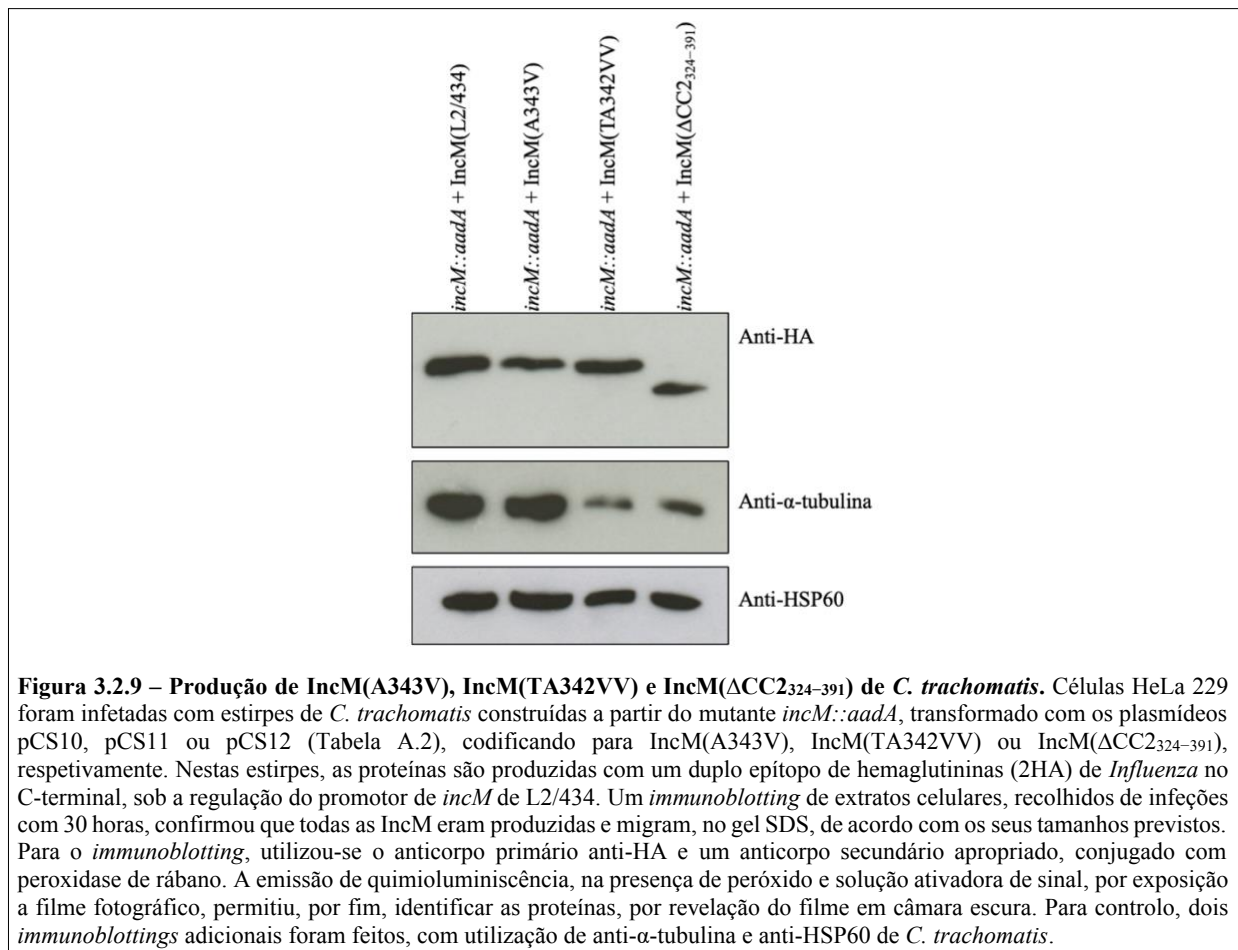


As estirpes de *C. trachomatis* produzindo IncM(A343V), IncM(TA342VV) e IncM( $\Delta$ CC2<sub>324-391</sub>) foram analisadas por PCR, para validação, a partir de lisados de clones isolados (ver subcapítulo 2.7.3 – “Isolamento de clones de *C. trachomatis* – ensaio em placa”).

### 3.2.6. Caracterização das estirpes de *C. trachomatis* que produzem IncM(A343V), IncM(TA342VV) e IncM( $\Delta$ CC2<sub>324-391</sub>)

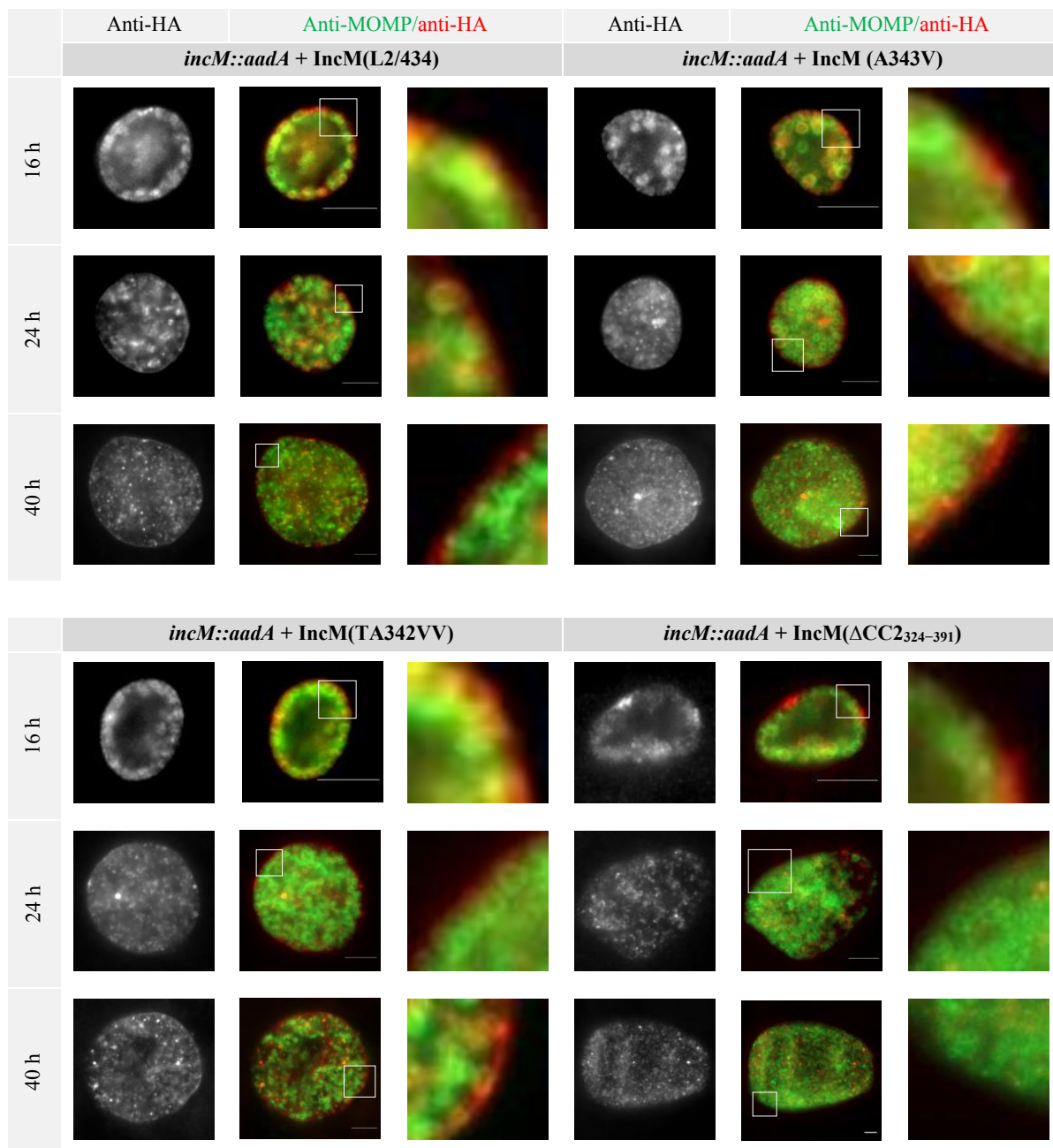
À semelhança das experiências anteriores que tinham por objetivo a caracterização de IncM e homólogos de *C. trachomatis*, as estirpes agora construídas a partir do mutante nulo, produzindo IncM(A343V), IncM(TA342VV) ou IncM( $\Delta$ CC2<sub>324-391</sub>), foram então usadas para infectar células HeLa 229 e também avaliar a complementação do fenótipo de multinucleação da sua estirpe parental (*incM::aadA*) em células infectadas, por comparação a L2/434 (“wild-type”).

Antecipadamente, confirmou-se a produção das proteínas mutantes, por *immunoblotting* de extratos celulares de infecções com 30 horas (Figura 3.2.9); e depois, a localização das IncM por imunofluorescência, em células infectadas durante 16, 24 e 40 horas, com as estirpes de *C. trachomatis* que produzem as três variantes e por comparação à IncM “wild-type” (produzida pela estirpe L2/434; Figura 3.2.10).



Para o *immunoblotting* utilizou-se anti-HA e o anticorpo secundário apropriado, conjugado com peroxidase de rábano; para a imunofluorescência, as células infectadas foram incubadas com anti-MOMP (chlamydiae, verde), anti-HA (IncM, vermelho) e depois com os anticorpos secundários respetivos, acoplados a um fluoróforo.

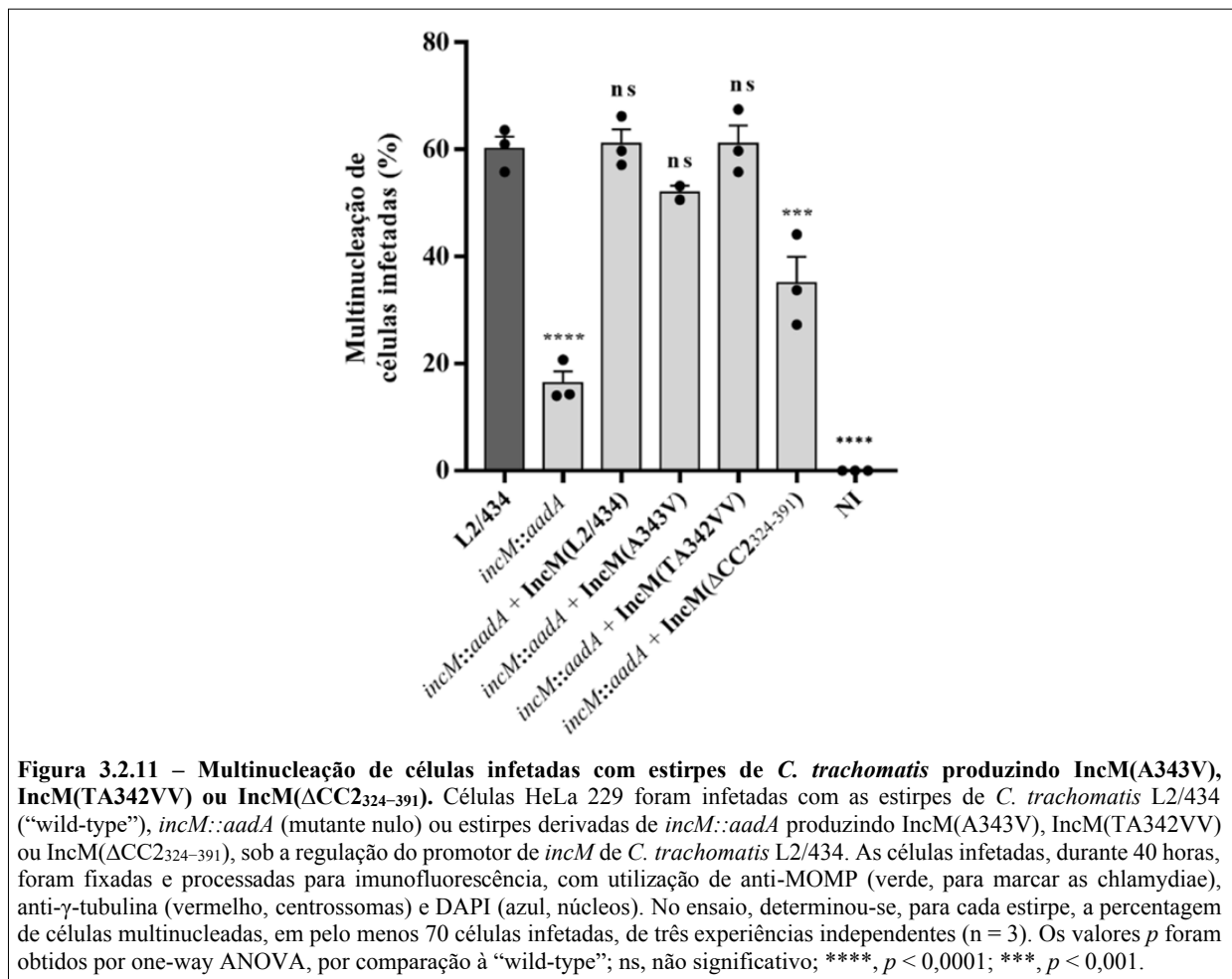
Todas as proteínas IncM foram detetadas nas infecções com as diferentes estirpes (Figura 3.2.9). Imagens representativas destas infecções (Figura 3.2.10) mostram que não há diferenças óbvias na localização das IncM(A343V) e IncM(TA342VV), por comparação à IncM nativa. Estas proteínas são predominantemente encontradas na periferia de inclusões de células hospedeiras, durante o ciclo de desenvolvimento de *C. trachomatis*. Por sua vez, IncM( $\Delta$ CC2<sub>324-391</sub>) parece não ter a mesma associação com a membrana da inclusão, visto ser observada, na maioria dos casos, de forma dispersa. Para esta proteína mutante, as imagens fotografadas no canal para a visualização do fluoróforo acoplado ao anticorpo secundário mostram a ausência de uma linha que contorna as inclusões, e que está presente nas infecções com as restantes estirpes (Figura 3.2.10). No entanto, em infecções de 16 horas, é possível identificar IncM( $\Delta$ CC2<sub>324-391</sub>) em regiões junto da membrana – locais onde a proteína parece concentrar-se. Estes aglomerados também foram observados para outras IncMs de *C. trachomatis* (Figura 3.2.4).



**Figura 3.2.10 – Localização de IncM(A343V), IncM(TA342VV) e IncM( $\Delta$ CC2324-391) em células HeLa 229 infectadas com *C. trachomatis*.** Células HeLa 229 foram infectadas com as estirpes de *C. trachomatis* indicadas, construídas a partir de um mutante nulo (*incM::aadA*). As células, fixadas com metanol às 16, 24 e 40 horas após infecção, foram processadas para imunofluorescência, com utilização de anti-MOMP (principal proteína da membrana externa de *Chlamydia*, verde) e anti-HA (IncM, vermelho). As fotografias, representadas à escala de 5  $\mu$ m, foram processadas por Zeiss LSM Image Browser e *software* Fiji. Para cada estirpe, a imagem à direita representa uma região ampliada da membrana da inclusão.

A capacidade das diferentes IncM mutantes induzirem a multinucleação de células hospedeiras foi, por fim, avaliada, considerando os fenótipos do mutante nulo e da “wild-type”. Assim, infectaram-se células HeLa 229, durante 40 horas, com as estirpes de *C. trachomatis*: “wild-type”; *incM::aadA*; L2/434 derivada de *incM::aadA* sob a regulação do seu promotor endógeno; ou as estirpes derivadas de *incM::aadA*, codificando para IncM(A343V), IncM(TA342VV) ou IncM( $\Delta$ CC2324-391). As células infectadas, processadas para imunofluorescência, foram incubadas com anti-MOMP, anti- $\gamma$ -tubulina – para marcar as chlamydiae (verde) e os centrossomas (vermelho), respetivamente – e DAPI para corar

os núcleos (azul). Os resultados são dados pela percentagem de células multinucleadas, em pelo menos 70 células infetadas, por estirpe, de três experiências independentes (exceto para IncM A343V, em que apenas se efetuaram duas experiências; Figura 3.2.11).



Analisando o gráfico, verifica-se que as estirpes de *C. trachomatis* produzindo IncM(A343V) e IncM(TA342VV) complementaram o fenótipo do mutante nulo, igualando o da “wild-type” (Figura 3.2.5A), sugerindo que a capacidade de IncM induzir a multinucleação de células hospedeiras é, também, conservada nestas IncM mutantes. Por sua vez, para a IncM em que foi deletada a região que contém o domínio CC2, constatou-se que a percentagem de multinucleação de células hospedeiras é inferior a 50 %, pelo que a estirpe produzindo IncM(ΔCC2324-391) parece não complementar o fenótipo do mutante nulo. O facto desta proteína mutante não se localizar na membrana da inclusão a tempos mais longos da infeção, contrariamente do que se observa para a “wild-type” e restantes variantes (Figuras 3.2.4 e 3.2.10), não permite inferir sobre a importância da região deletada na função da IncM, nomeadamente se o domínio CC2 tem significado funcional para a capacidade da proteína induzir multinucleação em células hospedeiras. No entanto, a indução deste fenótipo depende da localização da IncM na membrana da inclusão.

## 4. Discussão de Resultados

As Inc são uma família de proteínas produzidas por *Chlamydia* spp. que medeiam a interação bactéria:célula hospedeira. Conhecer a forma como estas proteínas atuam na subversão das funções de células eucarióticas é importante para compreender como chlamydiae manipula o seu hospedeiro e assim permitir identificar novas ferramentas de diagnóstico e controlo, bem como estratégias que previnam o aparecimento de doenças associadas a estas infeções bacterianas – na maioria dos casos assintomáticas.

Neste trabalho, estudou-se a proteína IncM de *C. trachomatis*, com o objetivo geral de a caracterizar para assim ajudar a determinar a sua função em sistemas vivos. A evidência de que a proteína IncM não liga hemo e a revelação de uma possível homologia estrutural com proteínas eucarióticas da família bicaudal D (BICD) ajudaram a redirecionar esta investigação. Ao discriminar-se a hipótese de que o hemo influencia a capacidade de IncM inibir a citocinese de células hospedeiras, assumindo por sua vez uma possível função análoga a proteínas adaptadoras de ativação de dineína, por exemplo, em células infetadas com *C. trachomatis*, abre-se portas a novas investigações, como a de IncM poder interagir com o citosqueleto e/ou complexo de Golgi.

No processo de otimização do protocolo de purificação de IncM, verificou-se que a trombina permite clivar a cauda de histidinas do seu N-terminal. Este passo poderá ajudar a obter uma preparação mais pura para futuros estudos estruturais, ainda que essas condições tenham de ser melhoradas. Por sua vez, as experiências com *C. trachomatis* que produzem homólogos de IncM baseadas, quer na localização, quer na multinucleação de células hospedeiras, por comparação às estirpes “wild type” (L2/434 de *C. trachomatis*) e mutante nulo (*incM::aadA*), sugerem que a possível interferência de IncM na inibição da citocinese de células infetadas é conservada, não só entre diferentes biovars de *C. trachomatis* (ocular e urogenital), como também entre diferentes espécies de *Chlamydia* (*C. muridarum* e *C. caviae*). Finalmente, a construção de uma estirpe de *C. trachomatis* que produz uma proteína IncM mutante sem uma das quatro regiões “coiled-coil” (IncM<sub>ΔCC2[324–391]</sub>) contribuiu para suportar a ideia de que a localização de IncM na membrana da inclusão é importante para a sua função.

### 4.1. A proteína IncM de *C. trachomatis* não liga o hemo

Estudos anteriores descreveram que o SDS-PAGE de preparações com IncM relativamente puras corava para hemo em amostras mais concentradas. Além disso, os espectros de absorvância no visível destas preparações, para diferentes estados *redox*, também sugeriam a presença de hemo; e ainda, que as amostras usadas em ensaios de reconstituição com hemina se revelavam mais ricas em hemo (dados não publicados). Baseado nestas evidências, foi proposto que a IncM de *C. trachomatis* ligasse hemo (de tipo *b*) e que essa hipótese estaria relacionada com a possível função de IncM inibir a citocinese de células hospedeiras (Luís M. e Mota L., resultados não publicados). Por essa razão, construíram-se plasmídeos que codificam IncM mutantes e transformaram-se estirpes de *E. coli* com esses plasmídeos para produzir as diferentes proteínas. Assumindo que os aminoácidos mais frequentemente responsáveis pela ligação do hemo *b* são histidinas, para cada plasmídeo recombinante, substituiu-se uma histidina por um resíduo de alanina (Tabela A.2), com o objetivo de monitorizar, por espectrofotometria UV-visível, a ligação do hemo à IncM em preparações contendo um *pool* de proteínas de *E. coli* com a (sobre)produção heteróloga de IncM e variantes. As cisteínas no C-terminal de IncM foram igualmente sujeitas a mutagénese.

Apesar das evidências revelarem a presença de hemo nas preparações contendo as diferentes IncMs – pelo facto de exibirem espectros de absorvância característicos de hemos *b*, tanto para as formas oxidadas como para as formas reduzidas – a ausência de perturbações espectrais entre os extratos contendo as diferentes proteínas, em cada estado *redox*, sugere o não envolvimento dos aminoácidos mutados na coordenação do hemo. Além disso, depois de um passo extra de purificação numa coluna de afinidade, a amostra do extrato proteico contendo o vetor vazio tinha um espectro de absorvância idêntico à da proteína IncM sobreproduzida, sendo bem evidente após concentração das amostras. Assim se conclui que a IncM de *C. trachomatis* não será responsável pela ligação específica do hemo e que, possivelmente, a presença de hemo será consequência da ligação a uma proteína hémica de *E. coli*, com afinidade para a HisTrap FF usada na cromatografia.

Neste estudo, foram construídos nove plasmídeos codificando IncM mutantes (de um total de 18 inicialmente previstos) que poderão, futuramente, ser reaproveitados e introduzidos em estirpes de *C. trachomatis* para analisar as funcionalidades dos aminoácidos mutados.

## 4.2. Otimização do protocolo de purificação de IncM

Assumindo que a coloração da proteína nas preparações obtidas se tratava afinal de um contaminante de *E. coli* e, atendendo ao facto de que, repetidamente, se obtinham produtos de degradação e/ou contaminantes em torno de 57 e 43 kDa, após SDS-PAGE de amostras contendo IncM relativamente puras, procedeu-se, de seguida, à otimização do protocolo da purificação de IncM. Nesse sentido, optou-se por cortar a cauda de histidinas localizada no N-terminal da proteína, uma vez que o vetor utilizado tinha um local de corte para a trombina, e, posteriormente, passar a amostra numa segunda coluna de afinidade (IMAC). O passo de clivagem com trombina foi otimizado e verificou-se que foi possível remover a cauda de histidinas, demonstrado pelo SDS-PAGE e *immunoblotting* de amostras purificadas, com e sem digestão enzimática, e por comparação a amostras controlo. No entanto, constatou-se que a proteína IncM parece ter afinidade para a HisTrap FF, mesmo sem a cauda de histidinas. Desta forma, ainda que no final não tenhamos obtido uma amostra suficientemente pura para posterior análise estrutural por cristalografia de raios X, este passo adicional de clivagem pode ser considerado um avanço no protocolo da purificação de IncM para os ensaios de cristalização.

Uma vez que as preparações com IncM parecem apresentar produtos de degradação estáveis de formas truncadas no C-terminal, de 57 e 43 kDa, a clonagem e produção heteróloga destas formas poderiam ser um procedimento para obter proteína estável e mais propícia para cristalização.

## 4.3. Inibição da citocinese de células hospedeiras por *Chlamydia* e papel da IncM

Assumindo que a maioria das proteínas produzidas por *Chlamydia* spp. é comum entre espécies, em resultado da conservação genética e restrições evolutivas impostas por um ciclo de vida intracelular, prevê-se que as funções por elas desempenhadas sejam igualmente conservadas [1, 2]. É sabido, no entanto, que, entre Incs, esse grau de conservação genética é menor [1, 13], possivelmente pelo facto de ser maior a exposição ao sistema imunológico do hospedeiro [13]. Apesar da conservação genética ser elevada entre estirpes de *C. trachomatis*, existem, no entanto, alguns polimorfismos genéticos que podem explicar as diferenças de tropismo de tecidos entre as estirpes e o tipo de infeção (invasiva ou não invasiva) [6, 46].

No caso de IncM de *C. trachomatis*, estudos num dos laboratórios onde se realizou esta tese indicam que participa na inibição da citocinese de células hospedeiras (Luís M. e Mota L., resultados não publicados). Para os ortólogos desta espécie, verificou-se que as sequências de aminoácidos aqui analisadas partilham 96 % de identidade. Apesar dessas grandes semelhanças, a proteína IncM é, de entre as Inc, a que apresenta mais divergências entre as estruturas primárias de ortólogos, o que pode explicar diferenças no tropismo de tecidos pelas bactérias. Por essa razão, analisou-se se IncMs de diferentes serovares de *C. trachomatis* (L2, C e E), produzidas por estirpes L2 de Bu/434 derivadas de um mutante nulo, teriam efeito na inibição da citocinese de células hospedeiras determinando, para cada ortólogo, o fenótipo de multinucleação em células infetadas com a estirpe que lhe deu origem. Em conformidade com resultados de outros estudos [14], verificou-se que todas as estirpes utilizadas nesta experiência (L2/434, C/TW3 e E/Bour) complementaram o fenótipo do mutante nulo, igualando o da “wild-type”.

Posteriormente, ao alinhar sequências de IncM de diferentes espécies de *Chlamydia* (*C. trachomatis*, *C. muridarum* e *C. caviae*) mostrou-se que o grau de identidade é menor entre as IncM de *C. trachomatis* e *C. muridarum* (64 %); e que esse valor decresce ainda mais, quando a IncM de *C. trachomatis* é comparada com o homólogo de *C. caviae* (23 %). Apesar das diferenças serem muito maiores entre espécies do que entre serovares, células infetadas com estas estirpes continuaram a complementar o fenótipo de multinucleação de *incM::aadA*.

Baseado nestas evidências, sugere-se que a possível capacidade de IncM inibir a citocinese de células hospedeiras é conservada entre serovares de *C. trachomatis* e espécies de *Chlamydia*, suportando a ideia de que a IncM pode, de facto, ter um papel integral no processo da divisão celular de hospedeiros. Em alternativa, um fenótipo de diferença, em infeções com homólogos de IncM, seria sugestivo de que estas proteínas desempenhariam um papel específico na espécie ou biovar que a produzisse, pelo que a função de interferir com a citocinese durante a mitose celular seria excluída. Nessa situação, para o(s) fenótipo(s) não complementado(s), analisar-se-iam as estruturas primárias das IncM respetivas, comparativamente à IncM “wild-type”, e identificar-se-iam as regiões divergentes. Essas regiões divergentes, na IncM de L2/434, teriam significado funcional e seriam estudadas em maior detalhe.

#### **4.4. Regiões e aminoácidos de IncM importantes para a sua função**

Neste capítulo, procurou-se reconhecer, com base na possível homologia estrutural entre IncM e proteínas BICD de células eucarióticas, a importância de determinados aminoácidos conservados para a função de IncM de *C. trachomatis*. Proteínas BICD foram, pela primeira vez, identificadas em membros do género *Drosophila*, como sendo fundamentais para o transporte de mRNA em complexos ribonucleoproteicos e posicionamento do núcleo e centrossomas nas células em mitose [45, 47]. Estão envolvidas no transporte vesicular e de outros componentes celulares, num processo que é mediado por dineína [45, 47]. Dineínas são motores moleculares que operam na polimerização dos microtúbulos ao longo do citosqueleto das células, para conferir movimento intracelular a vesículas, organelos e RNAs [45, 48], nomeadamente em direção ao centrossoma. Requerem o cofator dinactina e a presença de outras proteínas, designadas de proteínas adaptadoras de ativação de dineína, para garantir a sua função adequada [45]. Exemplos destas proteínas adaptadoras são: BICD2 que está envolvida no transporte retrógrado e anterógrado de vesículas [47]; BICD1 que se liga à membrana nuclear; as proteínas relacionadas ao BICD1 e 2 (BICDR1 e 2) que também interagem com RAB6 de vesículas [35]; Hook3; FIP3; Spindly e Golgin160 [49]. Em BICD não ligados a recetores de membrana, um estado conformacional inativo conferido pela capacidade destas proteínas dobrarem a região C-terminal sobre

si mesmo sugere que, também este, é um mecanismo eficiente na regulação de dineína [45]. Ademais, o complexo dineína-dinactina-BICD2 tem um papel importante no posicionamento, estrutura e função do complexo de Golgi, que se localiza na região pericentrossomal e é, por si só, um centro organizador de microtúbulos em organismos vertebrados [49]. Neste organelo, em particular, a dineína citoplasmática conduz o tráfego do retículo endoplasmático para a face *cis* (entrada) e o transporte retrógrado de endossomas/lisossomas para a face *trans* (saída) [49].

Considerando a função de proteínas BICD e sabendo que a proteína IncM participa na inibição da citocinese de células hospedeiras (Luís M. e Mota L., resultados não publicados) e interage com a proteína CCDC146 do centrossoma humano [14] (e que essa interação se mantém entre diferentes biovars de *C. trachomatis* [46]), pareceu relevante estudar com maior detalhe a possível homologia estrutural entre IncM e BICD. Assim, e baseado na perda de função de BICD mutantes em *Drosophila*, com o aparecimento de organismos caracterizados por um abdômen de duas caudas [45], construíram-se três estirpes de *C. trachomatis* (IncM<sub>A343V</sub>, IncM<sub>TA342VV</sub> e IncM<sub>ΔCC2[324–391]</sub>), por mutagênese dirigida a aminoácidos conservados entre IncM e ortólogos de BICD (e também entre outras proteínas adaptadoras de ativação de dineína citoplasmática [45]); e ainda por deleção da região onde se detetou homologia com BICD e que integra o domínio CC2 de IncM. De acordo com o objetivo geral deste trabalho, optou-se por caracterizar estas estirpes quanto à complementação do fenótipo de multinucleação de células hospedeiras de um mutante nulo, por comparação à “wild-type”, tendo-se concluído que não foi possível encontrar aminoácidos em IncM de L2/434 importantes para a sua função. Para a IncM(ΔCC2<sub>324–391</sub>), os resultados mostraram-se inconclusivos, porque a proteína não é detetada na membrana da inclusão em infecções tardias. Desta forma, não foi possível avaliar se o domínio CC2 de IncM tem significado funcional na inibição da citocinese de células hospedeiras.

No entanto, não se pode excluir a hipótese da possível homologia estrutural com proteínas BICD ser relevante para outras funções de IncM, ainda desconhecidas. Atendendo à função de dineína e BICD de células eucarióticas, seria importante estudar se IncM(L2/434) de *C. trachomatis* interagiria, por exemplo, com parceiros de BICD. Em caso afirmativo, isso podia significar que IncM e BICD têm funções homólogas, pelo que uma alteração de fenótipo (relacionado com esta interação) em infecções com os mutantes produzindo IncM(A343V), IncM(TA342VV) ou IncM(ΔCC2<sub>324–391</sub>) seria sugestivo de que os aminoácidos mutados (nas posições 342 e/ou 343 da IncM de L2/434), ou ainda que a região deletada 324 – 391 na mesma proteína (do serovar L2), teriam significado funcional ao nível do citosqueleto e/ou complexo de Golgi de células hospedeiras. Nesse contexto, a IncM de *C. trachomatis* poderia intermediar alguma forma de transporte vesicular, como por exemplo promover o ancoramento de vesículas contendo nutrientes ao interagir com proteínas RAB6 de vesículas, muito embora a estirpe mutante *incM::aadA* não tenha apresentado defeito no seu crescimento [14]; ou, relacionado com a importância funcional do complexo dineína-dinactina-BICD em células eucarióticas, IncM poderia interagir com o citosqueleto de células hospedeiras; ou ainda, atuar ao nível do complexo de Golgi, influenciando o tráfego vesicular e/ou de outros componentes neste compartimento da célula.

Para as experiências da localização, verificou-se que IncMs de diferentes serovares de *C. trachomatis* e espécies de *Chlamydia* são observadas, predominantemente, na periferia de inclusões de células hospedeiras ao longo do ciclo de desenvolvimento bacteriano, não tendo sido detetadas diferenças óbvias na localização das diferentes proteínas. No entanto observou-se, para todas as infecções em geral, que algumas inclusões evidenciavam a concentração de IncM em locais junto da membrana. Sugere-se que esses locais possam corresponder a microdomínios da inclusão e que a localização de IncM, nestas regiões, seja conservada entre os diferentes biovars de *C. trachomatis* e espécies de *Chlamydia*. Por último, destaca-se o contributo da estirpe IncM<sub>ΔCC2(324–391)</sub> para suportar a ideia de que a localização de

IncM na membrana da inclusão é importante para a sua função. As experiências de imunofluorescência mostraram que a IncM, desprovida de domínio CC2, localiza-se na membrana da inclusão a tempos mais curtos da infecção, mas não a tempos mais longos.

#### 4.5. Trabalho futuro

A curto prazo, poder-se-á dar continuidade à pesquisa de aminoácidos em IncM importantes para a inibição da citocinese de células hospedeiras, introduzindo, na IncM do serovar L2 de *C. trachomatis*, mutações dirigidas a resíduos conservados entre homólogos. Uma alteração de fenótipo, na sequência disso, seria sugestivo de que o(s) aminoácido(s) mutado(s) na IncM de L2/434 são importantes para a sua função.

Para a estirpe de *C. trachomatis* que produz IncM( $\Delta$ CC2<sub>324-391</sub>), atendendo ao facto de que esta proteína mutante não é observada na periferia de células hospedeiras em infecções tardias (sugerindo que não migra de forma adequada para a membrana da inclusão), não foi possível concluir se este domínio CC2 tem um papel importante na capacidade de IncM induzir a multinucleação de células hospedeiras. Por esta razão, sugere-se melhor esclarecer a sua função, bem como estudar outros domínios CC de IncM e homólogos de outros biovars de *C. trachomatis* e espécies de *Chlamydia*.

Estas metodologias genéticas que envolvem a produção estratégica de Incs (mutantes) por forma a serem estudadas no seu contexto natural da membrana da inclusão, minorando os artefactos das investigações em ambiente controlado e fechado de laboratório, têm-se revelado essenciais para o estudo de Incs, uma vez que a presença de domínios hidrofóbicos dificulta os estudos estruturais. No entanto, existem também algumas dificuldades associadas a estes estudos de mutagénese e observação de fenótipos, pelo facto de, nestas proteínas, ser reduzido o número de ortólogos ou, controversamente, serem identificados homólogos com sequências de aminoácidos significativamente diferentes (presumivelmente, em resultado de uma evolução convergente), ou ainda Incs apresentando alguma similaridade, mas cuja identidade entre regiões hidrofóbicas é baixa [45]. Desta forma, reconhece-se a importância de uma análise estrutural, nestas proteínas em particular, dado que a ausência de relação entre estruturas primárias sugere que as estruturas terciárias possam representar um factor chave, no facto destes homólogos terem funções similares. Por esta razão, a longo prazo, procura-se obter a estrutura tridimensional de IncM de *C. trachomatis* – com recurso a metodologias como a cristalografia de raios X – para, assim, identificar homólogos estruturais e determinar, com precisão, a função desta Inc.

## 5. Conclusões

No âmbito da investigação inicial sobre a hipótese de IncM de *C. trachomatis* ligar hemo, para depois analisar o significado funcional de aminoácidos relevantes na citocinese de células hospedeiras, a evidência de que o hemo não é afinal coordenado pela IncM permitiu redirecionar este trabalho. Assim, optou-se pela caracterização geral de IncM de *C. trachomatis* para a determinação da sua função em sistemas vivos. Para a análise estrutural, trabalhamos na otimização das condições de purificação da IncM, sendo que a principal evidência foi que a trombina permite clivar a cauda de histidinas situada no N-terminal. Embora não tenhamos obtido uma proteína suficientemente pura e concentrada para ensaios de cristalização, revelando necessidade de melhorar este procedimento, ficámos mais perto das condições ideais ao contemplar este passo adicional no protocolo da purificação de IncM. Seguidamente, caracterizaram-se estirpes de *C. trachomatis* geneticamente modificadas produzindo ortólogos e, nesse contexto, a principal conclusão foi a de que a possível capacidade de IncM inibir a citocinese de células hospedeiras é conservada entre serovares de *C. trachomatis* e espécies de *Chlamydia*, apoiando a tese de que a IncM pode, de facto, ter uma função integral no processo da divisão celular da célula hospedeira. Finalmente, na tentativa de procurar regiões ou aminoácidos de IncM importantes para a sua função, construíram-se estirpes IncM mutantes, com base na possível homologia estrutural entre IncM e proteínas eucarióticas da família bicaudal D (BICD), e caracterizaram-se essas estirpes, também atendendo à hipótese dessas regiões mutadas interferirem com a citocinese de células infetadas. Os resultados mostraram-se inconclusivos para o estudo da relação da IncM com proteínas BICD, no entanto abrem portas a novas investigações sobre a hipótese desta proteína de virulência bacteriana atuar ao nível do citosqueleto e/ou complexo de Golgi da célula hospedeira.

Este projeto reuniu trabalhos desenvolvidos em dois departamentos – Química e Ciências da Vida – e, por isso, sob diferentes abordagens, estudámos a IncM de *C. trachomatis* em prol de um objetivo comum: compreender a sua função. Nesse sentido, evidenciamos a importância do contributo de duas áreas distintas para o mesmo fim e no caso particular de investigações sobre Incs.

## Referências

- [1] Bugalhão J. and Mota L. 2019. The multiple functions of the numerous *Chlamydia trachomatis* secreted proteins: The tip of the iceberg. *Microbial Cell* 6(9): 414–449. doi: 10.15698/mic2019.09.691
- [2] Elwell C., Engel J. and Mirrashidi K. 2016. *Chlamydia* cell biology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology* 14(6): 385–400. doi: 10.1038/nrmicro.2016.30
- [3] Bayramova F., Greub G. and Jacquier N. 2018. Insight in the biology of *Chlamydia*-related bacteria. *Microbes and Infection* 20: 432–440. doi: 10.1016/j.micinf.2017.11.008
- [4] Phillips S., Quigley B. and Timms P. 2019. Seventy years of *Chlamydia* vaccine research – Limitations of the past and directions for the future. *Frontiers in Microbiology* 10(70). doi: 10.3389/fmicb.2019.00070
- [5] Puolakkainen M. and Saikku P. 2017. *Chlamydia*, Clinical Microbiology: Bacteria. *Infectious Diseases* (4<sup>a</sup> ed., vol. 2). Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-7020-6285-8.00188-X
- [6] Gomes J. and Nunes A. 2014. Evolution, phylogeny, and molecular epidemiology of *Chlamydia*. *Infection, Genetics and Evolution* 23: 49–64. doi: 10.1016/j.meegid.2014.01.029
- [7] Ferrell J. and Fields K. 2016. A working model for the type III secretion mechanism in *Chlamydia*. *Microbes and Infection* 18(2): 84–92. doi: 10.1016/j.micinf.2015.10.006
- [8] Dhawan B., Juyal D. and Rawre J. 2017. Molecular typing of *Chlamydia trachomatis*: An overview. *Indian Journal of Medical Microbiology* 35(1): 17–26.
- [9] World Health Organization. 2020. *Trachoma atlas: global Atlas of Trachoma*. Consultado em Janeiro de 2021, em <https://www.trachomaatlas.org/>
- [10] World Health Organization. 2020. WHO alliance for the global elimination of trachoma by 2020: progress report, 2019. *Weekly Epidemiological Record* 95(30): 349–360.
- [11] World Health Organization. 2018. *Report on global sexually transmitted infection surveillance*. Consultado em Janeiro de 2021. Disponível em <https://apps.who.int>
- [12] Abu-Raddad L., Broutet N., Chico R. *et al.* 2019. *Chlamydia*, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis. *Bulletin of the World Health Organization* 97(8): 548–562.
- [13] Dauga C., Dehoux P., Flores R. *et al.* 2011. Multi-genome identification and characterization of chlamydiae-specific type III secretion substrates: The Inc proteins. *BMC Genomics* 12. doi: 10.1186/1471-2164-12-109
- [14] Almeida F., Luís M., Mota L. *et al.* 2018. The Human Centrosomal Protein CCDC146 Binds *Chlamydia trachomatis* Inclusion Membrane Protein CT288 and Is Recruited to the Periphery

- of the *Chlamydia*-Containing Vacuole. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 8. doi: 10.3389/fcimb.2018.00254
- [15] Dumoux M., Hayward R., Nans A. *et al.* 2015. Making connections: Snapshots of chlamydial type III secretion systems in contact with host membranes. *Current Opinion in Microbiology* 23: 1–7. doi: 10.1016/j.mib.2014.09.019
- [16] Bauler L., Hackstadt T., Lam J. *et al.* 2015. Expression and localization of predicted inclusion membrane proteins in *Chlamydia trachomatis*. *Infection and Immunity* 83(12): 4710–4718. doi: 10.1128/IAI.01075-15
- [17] Bannantine J., Brown W., Griffiths R., *et al.* 2000. A secondary structure motif predictive of protein localization to the chlamydial inclusion membrane. *Cellular Microbiology* 2(1): 35–47. doi: 10.1046/j.1462-5822.2000.00029.x
- [18] Bryer A., Cingolani G., Greco D. *et al.* 2019. Structural basis for the homotypic fusion of chlamydial inclusions by the SNARE-like protein IncA. *Nature Communications* 10(1). doi: 10.1038/s41467-019-10806-9
- [19] Bauler L., Bhardwaj A., Hackstadt T. *et al.* 2014. An  $\alpha$ -helical core encodes the dual functions of the chlamydial protein IncA. *Journal of Biological Chemistry* 289(48). doi: 10.1074/jbc.M114.592063
- [20] Mata L. 1999. Vesículas e Vacúolos nos Caminhos de Endocitose e da Exocitose. *Biologia Celular e Molecular* (3<sup>a</sup> ed.), 219–231. Lisboa: LIDEL.
- [21] NCBI. 2015. *CAP03811.1 inclusion membrane protein E (Chlamydia trachomatis 434/Bu)*. Consultado em Janeiro de 2021, em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAP03811.1>
- [22] Dai Z., Dai L., Gong Y. *et al.* 2017. Structural and functional insights into sorting nexin 5/6 interaction with bacterial effector IncE. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2. doi: 10.1038/sigtrans.2017.30
- [23] NCBI. 2012. *Hypothetical protein CT288 (Chlamydia trachomatis)*. Consultado em Janeiro de 2021, em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AFU24220.1>
- [24] Expasy. 2020. *Sequence ProtParam*. Consultado em Agosto de 2021, em <https://web.expasy.org/protparam/>
- [25] Francis J. 1984. Specific indication of hemoproteins in polyacrylamide gels using a double-staining process. *Analytical Biochemistry* 509–514.
- [26] Levin W., Ryan D. and Thomas P. 1976. An Improved Staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome p-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 168–176.
- [27] Okunuki K. and Yamanaka T. 1974. Cytochromes. *Microbial Iron Metabolism*, Academic Press 14: 349–400.

- [28] Fufezan C., Gunner M. and Zhang J. 2008. Ligand preference and orientation in *b*- and *c*-type heme-binding proteins. *Proteins: Structure, Function and Genetics* 73(3). doi: 10.1002/prot.22097
- [29] Layer G. 2020. Heme biosynthesis in prokaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research* 1868(1). doi: 10.1016/j.bbamcr.2020.118861
- [30] Berg J., Stryer L., and Tymoczko J. 2001. Regulatory Strategies: Enzymes and Hemoglobin. *Biochemistry* (5<sup>a</sup> ed.), 261–294. New York: W. Freeman and Company.
- [31] Bonkovsky H., Guo J. and Li T. 2011. Structural analysis of heme proteins: implications for design and prediction. *BMC Structural Biology* 11. doi: 10.1186/1472-6807-11-13
- [32] Duthie F., Florin N., Hagelueken G. *et al.* 2015. Spectroscopic studies on peptides and proteins with cysteine-containing heme regulatory motifs (HRM). *Journal of Inorganic Biochemistry* 148: 49–56. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2015.05.008
- [33] Brewitz H., George A., Imhof D. *et al.* 2019. The molecular basis of transient heme-protein interactions: Analysis, concept and implementation. *Bioscience Reports* 39(1): 1–11, 2019. doi: 10.1042/BSR20181940
- [34] Berg J., Stryer L. and Tymoczko J. 2001. Exploring Proteins. *Biochemistry* (5<sup>a</sup> ed.), 77–116. New York: W. Freeman and Company.
- [35] Schiavo G. and Terenzio M. 2010. The more, the better: the BICD family gets bigger. *The EMBO Journal* 29(10): 1625–1626. doi: 10.1038/emboj.2010.78
- [36] Drexler H. and Uphoff C. 2004. Detecting *Mycoplasma* contamination in cell cultures by polymerase chain reaction. *Methods in molecular medicine* 88(1): 319–326. doi: 10.1385/1-59259-406-9:319
- [37] Scidmore M. 2005. Cultivation and Laboratory Maintenance of *Chlamydia trachomatis*. *Current protocols in microbiology* 11: 1–25. doi: 10.1002/9780471729259.mc11a01s00
- [38] Bugalhão J., Cunha M. and Mota L. 2017. The *Chlamydia trachomatis* type III secretion substrates CT142, CT143 and CT144 are secreted into the lumen of the inclusion. *PLOS ONE* 12(6): 1–24. doi: 10.1371/journal.pone.0178856
- [39] Clarke I, Cutcliffe L., Kahane S. *et al.* 2011. Development of a Transformation System for *Chlamydia trachomatis*: Restoration of Glycogen Biosynthesis by Acquisition of a Plasmid Shuttle Vector. doi: 10.1371/journal.ppat.1002258
- [40] Agaisse H. and Derré I. 2013. A *C. trachomatis* Cloning Vector and the Generation of *C. trachomatis* Strains Expressing Fluorescent Proteins under the Control of a *C. trachomatis* Promoter. *PLOS ONE* 8(2): 1–13. doi: 10.1371/journal.pone.0057090
- [41] Nguyen B. and Valdivia R. 2013. Forward Genetic Approaches in *Chlamydia trachomatis*. *Journal of Visualized Experiments*. doi: 10.3791/50636

- [42] MPI for Developmental Biology. 2021. *IncM and C. trachomatis IncM orthologs alignment*. Consultado em Julho de 2021, em <https://toolkit.tuebingen.mpg.de>
- [43] NCBI. 2021. *BLAST*. Consultado em Julho de 2021, em [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)
- [44] MPI for Developmental Biology. 2021. *IncM and IncM of Chlamydia species alignment*. Consultado em Agosto de 2021, em <https://toolkit.tuebingen.mpg.de>
- [45] Holzbaur E. and Olenick M. 2019. Dynein activators and adaptors at a glance. *Journal of Cell Science* 132(6). doi: 10.1242/jcs.227132
- [46] Almeida F. 2016. *Functional analyses of inclusion membrane proteins of Chlamydia trachomatis* (Tese de Doutoramento não editada). NOVA School of Science and Technology | FCT NOVA, Lisboa.
- [47] Neveling K. *et al.* 2013. Mutations in BICD2, which encodes a golgin and important motor adaptor, cause congenital autosomal-dominant spinal muscular atrophy. *American Journal of Human Genetics* 92(6): 946–954. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.04.011
- [48] David-Ferreira J. and Plancha C. 1999. Citosqueleto: composição, organização e significado funcional. *Biologia Celular e Molecular* (3<sup>a</sup> ed.), 203–218. Lisboa: LIDEL.
- [49] Haase G. *et al.* 2015. Cytoplasmic dynein and its regulatory proteins in Golgi pathology in nervous system disorders. *Frontiers in Neuroscience* 9: 397. doi: 10.3389/fnins.2015.00397

## Anexos

**Tabela A.1** – Estirpes de *Escherichia coli* utilizadas neste trabalho.

<b>Nome</b>	<b>Uso/descrição</b>	<b>Fonte</b>
NEB®10β	Foi utilizada para a construção de plasmídeos que codificam para proteínas IncM mutantes.	New England Biolabs
BL21 (DE3)	Foi utilizada para a produção e purificação de proteínas IncM.	Thermo Fisher Scientific
K12 ER2925	Estirpe deficiente na metilação do DNA (Dam <sup>-</sup> e Dcm <sup>-</sup> ). Foi utilizada, enquanto hospedeira conveniente, para a manutenção de plasmídeos que codificam para proteínas IncM mutantes de <i>C. trachomatis</i> .	New England Biolabs

**Tabela A.2** – Plasmídeos utilizados neste trabalho.

Nome	Descrição	Fonte	Capítulo
pET28b+	Foi utilizado para a construção de plasmídeos codificando proteínas IncM mutantes de <i>C. trachomatis</i> L2/434, com uma cauda de seis histidinas no N-terminal (6xHis-IncM), sob a regulação do operão <i>lac</i> .	Novagen	2.2 2.3
pSVP247	Derivado de p2TK2-SW2 [40], contém o terminador do operão de <i>incDEFG</i> ( $T_{incD}$ ) de <i>C. trachomatis</i> L2/434. Foi utilizado para a construção de plasmídeos codificando proteínas IncM mutantes de <i>C. trachomatis</i> com um duplo epítipo de hemaglutininas de <i>Influenza</i> no C-terminal (IncM-2HA).	[38]	2.2
pJB13	Codifica para IncM de <i>C. trachomatis</i> L2/434 com uma cauda de seis histidinas no N-terminal, sob a regulação do operão <i>lac</i> . O produto de amplificação de <i>incM</i> , com os <i>primers</i> #1872 e #1873, usando como molde DNA genómico da estirpe L2/434, foi digerido com as enzimas de restrição NdeI e EcoRI e inserido nesses locais do vetor pET28b+.	Bugalhão J, não publicado	2.2 2.3
pFA202	Codifica para IncM da estirpe L2/434 de <i>C. trachomatis</i> com um duplo epítipo de hemaglutininas de <i>Influenza</i> no C-terminal, sob a regulação do seu promotor endógeno. O produto de amplificação obtido com os <i>primers</i> #1960 e #1567, usando como molde DNA genómico da estirpe L2/434, foi digerido com as enzimas de restrição KpnI e NotI e inserido nesses locais do vetor pSVP247.	[46]	2.2 2.8
pML25	Codifica para IncM da estirpe C/TW3 de <i>C. trachomatis</i> com um duplo epítipo de hemaglutininas de <i>Influenza</i> no C-terminal (IncM <sub>C/TW3</sub> -2HA), sob a regulação do promotor de <i>incM</i> de <i>C. trachomatis</i> L2/434. O produto de amplificação derivado de <i>overlapping</i> PCR com os <i>primers</i> #1960, #2656, #2655 e #1567 foi digerido com as enzimas de restrição KpnI e NotI e inserido no vetor pSVP247.	Luis M, este trabalho	2.2 2.8
pML26	Codifica para IncM da estirpe E/Bour de <i>C. trachomatis</i> com um duplo epítipo de hemaglutininas de <i>Influenza</i> no C-terminal (IncM <sub>E/Bour</sub> -2HA), sob a regulação do promotor de <i>incM</i> de <i>C. trachomatis</i> L2/434. O produto de amplificação derivado de <i>overlapping</i> PCR com os <i>primers</i> #1960, #2656, #2655 e #1567 foi digerido com as enzimas de restrição KpnI e NotI e inserido no vetor pSVP247.	Luis M, este trabalho	2.2 2.8
pML27	Codifica para IncM de <i>C. muridarum</i> com um duplo epítipo de hemaglutininas de <i>Influenza</i> no C-terminal (IncM <sub>NIGG</sub> -2HA), sob a regulação do promotor de <i>incM</i> de <i>C. trachomatis</i> L2/434. O produto de amplificação derivado de <i>overlapping</i> PCR com os <i>primers</i> #1960, #2658, #2657 e #1567 foi digerido com as enzimas de restrição KpnI e NotI e inserido no vetor pSVP247.	Luis M, este trabalho	2.2 2.8
pML28	Codifica para IncM de <i>C. caviae</i> com um duplo epítipo de hemaglutininas de <i>Influenza</i> no C-terminal (IncM <sub>GPIIC</sub> -2HA), sob a regulação do promotor de <i>incM</i> de <i>C. trachomatis</i> L2/434. O produto de amplificação derivado de <i>overlapping</i> PCR com os <i>primers</i> #1960, #2660, #2659 e #1567 foi digerido com as enzimas de restrição KpnI e NotI e inserido no vetor pSVP247.	Luis M, este trabalho	2.2 2.8

pCS1	Codifica para IncM de <i>C. trachomatis</i> com uma cauda de seis histidinas no N-terminal, em que uma histidina foi substituída por uma alanina na posição 28 de IncM (6xHis-IncM <sub>H28A</sub> ), sob a regulação do operão <i>lac</i> . A mutagênese de <i>incM</i> derivou de <i>overlapping</i> PCR usando como molde DNA amplificado a partir do plasmídeo pJB13, com os <i>primers</i> #2692, #2693, #2686 e #1873. O produto da amplificação de <i>incM</i> mutado, foi digerido com as enzimas de restrição NdeI e EcoRI e inserido no vetor pET28b+.	Este trabalho	2.2 2.3
pCS2	Codifica para IncM de <i>C. trachomatis</i> com uma cauda de seis histidinas no N-terminal, em que uma histidina foi substituída por uma alanina na posição 164 de IncM (6xHis-IncM <sub>H164A</sub> ), sob a regulação do operão <i>lac</i> . A mutagênese de <i>incM</i> derivou de <i>overlapping</i> PCR usando como molde DNA amplificado a partir do plasmídeo pJB13, com os <i>primers</i> #1872, #2697, #2696 e #1873. O produto da amplificação de <i>incM</i> mutado foi digerido com as enzimas de restrição NdeI e EcoRI e inserido no vetor pET28b+.	Este trabalho	2.2 2.3
pCS3	Codifica para IncM de <i>C. trachomatis</i> com uma cauda de seis histidinas no N-terminal, em que uma cisteína foi substituída por uma alanina na posição 477 de IncM (6xHis-IncM <sub>C477A</sub> ), sob a regulação do operão <i>lac</i> . A mutagênese de <i>incM</i> derivou de <i>overlapping</i> PCR usando como molde DNA amplificado a partir do plasmídeo pJB13, com os <i>primers</i> #1872, #2691, #2690 e #2340. O produto da amplificação de <i>incM</i> mutado foi digerido com as enzimas de restrição NdeI e EcoRI e inserido no vetor pET28b+.	Este trabalho	2.2 2.3
pCS4	Codifica para IncM de <i>C. trachomatis</i> com uma cauda de seis histidinas no N-terminal, em que uma histidina foi substituída por uma alanina na posição 323 de IncM (6xHis-IncM <sub>H323A</sub> ), sob a regulação do operão <i>lac</i> . A mutagênese de <i>incM</i> derivou de <i>overlapping</i> PCR usando como molde DNA amplificado a partir do plasmídeo pJB13, com os <i>primers</i> #1872, #2687, #2700 e #1873. O produto da amplificação de <i>incM</i> mutado foi digerido com as enzimas de restrição NdeI e EcoRI e inserido no vetor pET28b+.	Este trabalho	2.2 2.3
pCS5	Codifica para IncM de <i>C. trachomatis</i> com uma cauda de seis histidinas no N-terminal, em que uma histidina foi substituída por uma alanina na posição 112 de IncM (6xHis-IncM <sub>H112A</sub> ), sob a regulação do operão <i>lac</i> . A mutagênese de <i>incM</i> derivou de <i>overlapping</i> PCR usando como molde DNA amplificado a partir do plasmídeo pJB13, com os <i>primers</i> #1872, #2695, #2694 e #1873. O produto da amplificação de <i>incM</i> mutado foi digerido com as enzimas de restrição NdeI e EcoRI e inserido no vetor pET28b+.	Este trabalho	2.2
pCS6	Codifica para IncM de <i>C. trachomatis</i> com uma cauda de seis histidinas no N-terminal, em que uma cisteína foi substituída por uma alanina na posição 497 de IncM (6xHis-IncM <sub>C497A</sub> ), sob a regulação do operão <i>lac</i> . A mutagênese de <i>incM</i> derivou de <i>overlapping</i> PCR usando como molde DNA amplificado a partir do plasmídeo pJB13, com os <i>primers</i> #1872, #2685, #2684 e #2340. O produto da amplificação de <i>incM</i> mutado foi digerido com as enzimas de restrição NdeI e EcoRI e inserido no vetor pET28b+.	Este trabalho	2.2
pCS7	Codifica para IncM de <i>C. trachomatis</i> com uma cauda de seis histidinas no N-terminal, em que uma histidina foi substituída por uma alanina na posição 235 de IncM (6xHis-IncM <sub>H235A</sub> ), sob a	Este trabalho	2.2

	regulação do operão <i>lac</i> . A mutagênese de <i>incM</i> derivou de <i>overlapping</i> PCR usando como molde DNA amplificado a partir do plasmídeo pJB13, com os <i>primers</i> #1872, #2699, #2698 e #1873. O produto da amplificação de <i>incM</i> mutado foi digerido com as enzimas de restrição NdeI e EcoRI e inserido no vetor pET28b+.		
pCS8	Codifica para IncM de <i>C. trachomatis</i> com uma cauda de seis histidinas no N-terminal, em que uma histidina foi substituída por uma alanina na posição 297 de IncM (6xHis-IncM <sub>H297A</sub> ), sob a regulação do operão <i>lac</i> . A mutagênese de <i>incM</i> derivou de <i>overlapping</i> PCR usando como molde DNA amplificado a partir do plasmídeo pJB13, com os <i>primers</i> #1872, #2683, #2682 e #1873. O produto da amplificação de <i>incM</i> mutado foi digerido com as enzimas de restrição NdeI e EcoRI e inserido no vetor pET28b+.	Este trabalho	2.2
pCS9	Codifica para IncM de <i>C. trachomatis</i> com uma cauda de seis histidinas no N-terminal, em que uma cisteína foi substituída por uma alanina na posição 331 de IncM (6xHis-IncM <sub>H331A</sub> ), sob a regulação do operão <i>lac</i> . A mutagênese de <i>incM</i> derivou de <i>overlapping</i> PCR usando como molde DNA amplificado a partir do plasmídeo pJB13, com os <i>primers</i> #1872, #2689, #2688 e #1873. O produto da amplificação de <i>incM</i> mutado foi digerido com as enzimas de restrição NdeI e EcoRI e inserido no vetor pET28b+.	Este trabalho	2.2
pCS10	Codifica para IncM de <i>C. trachomatis</i> com um duplo epítipo de hemaglutininas de <i>Influenza</i> no C-terminal, em que uma alanina foi substituída por uma valina na posição 343 de IncM (IncM <sub>A343V-2HA</sub> ), sob a regulação do promotor de <i>incM</i> de <i>C. trachomatis</i> L2/434. A mutagênese de <i>incM</i> derivou de <i>overlapping</i> PCR usando como molde DNA amplificado a partir do plasmídeo pFA202, com os <i>primers</i> #1960, #2821, #2820 e #1567. O produto da amplificação de <i>incM</i> mutado e do seu promotor endógeno foi digerido com as enzimas de restrição KpnI e NotI e inserido no vetor pSVP247.	Este trabalho	2.2 2.7.2 2.7.3
pCS11	Codifica para IncM de <i>C. trachomatis</i> com um duplo epítipo de hemaglutininas de <i>Influenza</i> no C-terminal, em que uma timina e uma alanina foram substituídas por duas valinas nas posições 342 e 343 de IncM (IncM <sub>TA342VV-2HA</sub> ), sob a regulação do promotor de <i>incM</i> de <i>C. trachomatis</i> L2/434. A mutagênese de <i>incM</i> derivou de <i>overlapping</i> PCR usando como molde DNA amplificado a partir do plasmídeo pFA202, com os <i>primers</i> #1960, #2823, #2822 e #1567. O produto da amplificação de <i>incM</i> mutado e do seu promotor endógeno foi digerido com as enzimas de restrição KpnI e NotI e inserido no vetor pSVP247.	Este trabalho	2.2 2.7.2 2.7.3
pCS12	Codifica para IncM de <i>C. trachomatis</i> com um duplo epítipo de hemaglutininas de <i>Influenza</i> no C-terminal, em que a sequência de <i>incM</i> que codifica para a região entre os aminoácidos 324 – 391, onde está inserido o domínio CC2, foi deletada (IncM <sub>ΔCC2[324-391]-2HA</sub> ), sob a regulação do promotor de <i>incM</i> de <i>C. trachomatis</i> L2/434. A mutagênese de <i>incM</i> derivou de <i>overlapping</i> PCR usando como molde DNA amplificado a partir do plasmídeo pFA202, com os <i>primers</i> #1960, #2816, #2815 e #1567. O produto da amplificação de <i>incM</i> mutado e do seu promotor endógeno foi digerido com as enzimas de restrição KpnI e NotI e inserido no vetor pSVP247.	Este trabalho	2.2 2.7.2 2.7.3

Tabela A.3 – Oligonucleótidos utilizados neste trabalho.

Número	Descrição	Sequência (5' → 3')	Local de restrição
1478	Primer 5' para amplificação e sequenciação de <i>incM</i> no vetor pSVP247	ATGGAAAAACGCCAGCAACG	–
1479	Primer 3' para amplificação e sequenciação de <i>incM</i> no vetor pSVP247	ACAAAATCAAAACAGAATCG	–
1567	Primer 3' para a construção e amplificação de pML25, pML26, pCS10, pCS11 e pCS12	GATCGCGGCCGCGGTGATTATC TAACAGGTATTG	NotI
1872	Primer 5' para a construção e amplificação de pCS1, pCS2, pCS3, pCS4, pCS5, pCS6, pCS7, pCS8 e pCS9	CGGCAGCCATATGGTTTATTTA GAGCTCATC	NdeI
1873	Primer 3' para a construção e amplificação de pCS1, pCS2, pCS4, pCS5, pCS7, pCS8 e pCS9	GATCGAATTCTTAGTGATTATCT AACAGG	EcoRI
1960	Primer 5' para a construção e amplificação de pML25, pML26, pML27, pML28, pCS10, pCS11 e pCS12	GATCGGTACCGCAACAATGACA GTTTTACGC	KpnI
2318	Primer 3' para a verificação de contaminação por <i>Mycoplasma</i>	GCGGTGTGTACAARACCCGA	–
2319	Primer 5' para a verificação de contaminação por <i>Mycoplasma</i>	GCGGTGTGTACAAACCCCGA	–
2340	Primer 3' para a construção e amplificação de pCS3 e pCS6. Também foi utilizado para a sequenciação de <i>incM</i> no vetor pET28b+. Híbrida na região do terminador da RNA polimerase T7.	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	–
2511	Primer 3' para amplificação de pML27	GATCGCGGCCGCTTCGATCCAA CACATACTGCG	NotI
2513	Primer 3' para amplificação de pML28	GATCGCGGCCGCGGTAAGGGAA TTGCCCTGGAGAG	NotI
2655	Primer 5' para a construção de pML25 e pML26	GTTACGGGGGAATCTCTTTCAT GGTTTATTTTAGAGCTCATC	–
2656	Primer 3' para a construção de pML25 e pML26	GATGAGCTCTAAAATAAACCAT GAAAGAGATTCCCCCGTAAC	–
2657	Primer 5' para a construção de pML27	GTTACGGGGGAATCTCTTTCAT GGTTTATTTTAAAGCTGG	–
2658	Primer 3' para a construção de pML27	CCAGCTTTAAAATAAACCATGA AAGAGATTCCCCCGTAAC	–
2659	Primer 5' para a construção de pML28	GTTACGGGGGAATCTCTTTCAT GTCTGAGCCTAAGCC	–
2660	Primer 3' para a construção de pML28	GGCTTAGGCTCAGACATGAAAG AGATTCCCCCGTAAC	–
2682	Primer 5' para a construção de pCS8	GCATTAAGTATTTGCTCGAAGC GTCTCCTCTGAATAGAAAGC	–
2683	Primer 3' para a construção de pCS8	GCTTTCTATTCAGAGGAGACGC TTCGAGCAAATACTTAATGC	–

2684	Primer 5' para a construção de pCS6	GAGTTATAAAACCTCAGAAGCG CAAGCTGCACTCCAAAAAGTG	–
2685	Primer 3' para a construção de pCS6	CACTTTTTGGAGTGCAGCTTGC GCTTCTGAGGTTTTATAACTC	–
2686	Primer 5' para a construção de pCS1	CCATTCGTTCTCCGATAAGGCG CCTCAAATTGCTAAAGC	–
2687	Primer 3' para a construção de pCS4	GTAATTGATGCTGGTACGCAAC CATAGAGGCCAG	–
2688	Primer 5' para a construção de pCS9	GCATCAATTACTATCAGCGCTA CATGAAACTCTATTAG	–
2689	Primer 3' para a construção de pCS9	CTAATAGAGTTTCATGTAGCGC TGATAGTAATTGATGC	–
2690	Primer 5' para a construção de pCS3	GAGTGCATGATGAAGCTGCCAA TGAAGAGCAACAAGC	–
2691	Primer 3' para a construção de pCS3	GCTTGTTGCTCTTCATTGGCAGC TTCATCATGCACTC	–
2692	Primer 5' para a construção e amplificação de pCS1	AACAAGCGCTCATGAGCC	–
2693	Primer 3' para a construção de pCS1	GCTTTAGCAATTTGAGGCGCCT TATCGGAGAACGAATGG	–
2694	Primer 5' para a construção de pCS5	GTTAGATAATGCGACCGAGGCG GTGAATTACCTGACCTC	–
2695	Primer 3' para a construção de pCS5	GAGGTCAGGTAATTCACCGCCT CGGTCGCATTATCTAAC	–
2696	Primer 5' para a construção de pCS2	CAGATACGATTCCATTAATGCC TCCATCGAAGAGATCTC	–
2697	Primer 3' para a construção de pCS2	GAGATCTCTTCGATGGAGGCAT TAATGGAATCGTATCTG	–
2698	Primer 5' para a construção de pCS7	GCCAATACACTAAGTGCGGCCA GCCGCACACTATATAC	–
2699	Primer 3' para a construção de pCS7	GTATATAGTGTGCGGCTGGCCG CACTTAGTGTATTGGC	–
2700	Primer 5' para a construção de pCS4	CTGGGCCTCTATGGTTGCGTAC CAGCATCAATTAC	–
2815	Primer 5' para a construção de pCS12	TCTGGGCCTCTATGGTTCATGCT TACTTATTCCCAATTCC	–
2816	Primer 3' para a construção de pCS12	GGAATTGGGAATAAGTAAGCAT GAACCATAGAGGCCAGAC	–
2818	Primer 3' para a sequenciação de <i>incM</i> no vetor pSVP247	AGGACTGGGAATGATTTTTGTT CATTGCAAGCTTCATCATGC	–
2820	Primer 5' para a construção de pCS10	GATGAAGCCATCACAGTAAGAT GGGGCGAGCCC	–
2821	Primer 3' para a construção de pCS10	GGGCTCGCCCCATCTTACTGTG ATGGCTTCATCTAA	–
2822	Primer 5' para a construção de pCS11	TTAGATGAAGCCATCGTAGTAA GATGGGGCGAGCCC	–
2823	Primer 3' para a construção de pCS11	GGGCTCGCCCCATCTTACTACG ATGGCTTCATC	–

**Tabela A.4** – Estirpes de *Chlamydia trachomatis* utilizadas neste trabalho.

<b>Nome</b>	<b>Uso/descrição</b>	<b>Fonte</b>
434/Bu	<i>C. trachomatis</i> do biovar LGV e serovar L2. Foi utilizada para transformação com plasmídeos que codificam para proteínas IncM mutantes.	ATCC
<i>incM::aadA</i>	Derivada de <i>C. trachomatis</i> L2/434 com o gene <i>incM</i> inativado por um intrão do grupo II. Contém o gene <i>aadA</i> de resistência à espectinomicina. Foi utilizada para transformação com plasmídeos que codificam para ortólogos de IncM ou proteínas IncM mutantes, sob a regulação do promotor de <i>incM</i> de <i>C. trachomatis</i> L2/434.	[14]