

Caracterização estrutural de VirB8, uma subunidade doT4SS

Guilherme Tiburcio Medeiros

José Edwin Neciosup Quesñay

Roberto Kopke Salinas

Instituto de química

guilherme_medeiros@usp.br

Objetivos

O Sistema de Secreção do tipo IV de *Xanthomonas citri* (T4SS_{XAC}) é utilizado para transportar toxinas que matam bactérias gram-negativas. O T4SS_{XAC} é formado por 12 proteínas: VirB1 - VirB11 e VirD4. Entre elas, VirB8 está ancorada na membrana interna e possui um domínio globular localizado no periplasma. Espera-se que o T4SS_{XAC} seja formado por 24 cópias de VirB8, formando um complexo que interage com múltiplas cópias de VirB10 [1]. Portanto, o objetivo deste trabalho é expressar e purificar construções de VirB8 enriquecidas isotopicamente com ¹⁵N para avaliar qual delas seria a melhor para ser estudada por RMN em solução.

Métodos e Procedimentos

Quatro construções de VirB8 (VirB8₆₅₋₃₄₈, VirB8₁₀₂₋₂₄₅, VirB8₇₀₋₂₄₈ e VirB8₇₀₋₃₄₈) foram desenhadas com base em uma predição estrutural realizada com AlphaFold [2]. Estes fragmentos foram clonados no vetor pRSFDuet em fusão com uma sequência de 6 histidinas no N-terminal. Os plasmídeos foram propagados em *Escherichia coli* DH5α. As bactérias contendo o plasmídeo de interesse foram selecionadas utilizando canamicina (VirB8₆₅₋₃₄₈) ou ampicilina (VirB8₁₀₂₋₂₄₅, VirB8₇₀₋₂₄₈ e VirB8₇₀₋₃₄₈). A expressão dos clones foi realizada em *E. coli* BL21(DE3) por indução com 0,3 mM de IPTG durante 18 horas a 18°C. As células foram coletadas por centrifugação, suspensas em tampão de lise (20 mM de Tris

pH 8,0, 300 mM de NaCl e 1 mM de PMSF) e lisadas em Emulsiflex sob pressão de 1000 - 1500 bar a 4°C. O lisado foi clarificado por centrifugação a 25000 RPM e 4°C por 30 minutos. O sobrenadante foi aplicado em uma coluna HisTrap (Cytiva) equilibrada previamente com tampão de ligação (50 mM de NaPi pH 7,4, 400 mM de NaCl, 10 mM de Imidazol e 1 mM de PMSF) e eluída durante um gradiente de imidazol (50 mM de NaPi pH 7,4, 400 mM de NaCl, 300 mM de Imidazol e 1 mM de PMSF). As frações contendo a proteína de interesse foram reunidas e concentradas até 5 ml por centrifugação a 4000 RPM e 4°C em um Centricon de 3 kDa, e separadas por gel filtração em uma coluna Superdex 75 16/600 (Cytiva).

Resultados

O volume de eluição dos fragmentos de VirB8 na coluna de gel filtração é dependente da concentração (**Figura 1**), sugerindo que todos eles tendem a oligomerizar. Com base na calibração da coluna, VirB8₆₅₋₃₄₈ e VirB8₇₀₋₃₄₈ tendem a formar trímeros em concentrações acima de 0,5 mM e dímeros em concentrações abaixo de 0,5 mM (**Figura 1A e 1B**). Enquanto VirB8₁₀₂₋₂₄₅ e VirB8₇₀₋₂₄₈ formam predominantemente monômeros (**Figura 1C e 1D**). Esta diferença sugere que os 100 aminoácidos do C-terminal de VirB8 desempenham um papel importante para a sua oligomerização. A melhor dispersão dos sinais no espectro de RMN de ¹H mostrou que VirB8₁₀₂₋₂₄₅ é mais bem enovelada do que as

outras construções (**Figura 2**). Mais de 500 condições de cristalização dos fragmentos VirB8₆₅₋₃₄₈ e VirB8₇₀₋₂₄₈ foram testadas no Robolab do CNPEM. VirB8₆₅₋₃₄₈ formou cristais em 0,1 M de Imidazol, 0,2 M de MgCl₂ e etanol a 15% v/v (**Figura 3**).

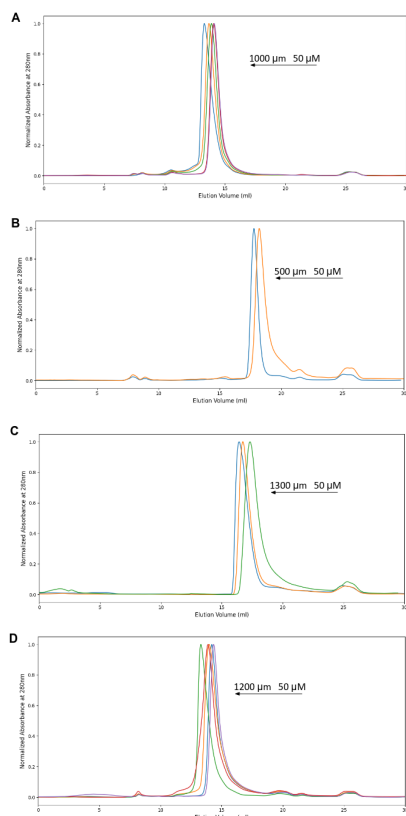


Figura 1 - Caracterização de fragmentos de VirB8 por cromatografia de gel filtração. Os fragmentos de VirB8 foram aplicados em concentrações decrescentes (1000 a 50 µM) em tampão 20 mM de Tris pH 8,0, 150 mM de NaCl e 1 mM de PMSF. Utilizou-se a coluna Superdex 200 10/300. Cromatogramas em diferentes concentrações de proteína foram normalizados. **A)** VirB8₆₅₋₃₄₈. **B)** VirB8₁₀₂₋₂₄₅. **C)** VirB8₇₀₋₂₄₈. **D)** VirB8₇₀₋₃₄₈.

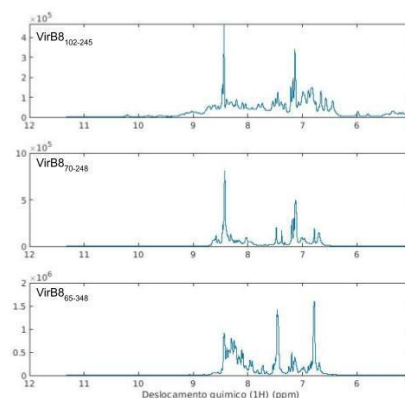


Figura 2. Espectro de RMN 1H de VirB8₁₀₂₋₂₄₅, VirB8₇₀₋₂₄₈ e VirB8₆₅₋₃₄₈. Os espectros foram adquiridos a 800 MHz e 25 °C. As amostras foram preparadas em tampão acetato de sódio 20 mM pH 5,0, contendo 150 mM NaCl, 1 mM PMSF e 1% D₂O.

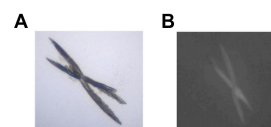


Figura 3. Triagem de condições de cristalização de VirB8₆₅₋₃₄₈. Os experimentos foram realizados no ROBOLAB (CNPEM). **A)** luz visível. **B)** luz UV.

Conclusões

A construção VirB8₁₀₂₋₂₄₅ apresentou melhor estabilidade aparente e melhor espectro de RMN. Por outro lado, VirB8₆₅₋₃₄₈ formou cristais em uma das condições testadas no Robolab. Essas duas construções serão caracterizadas por uma combinação de cristalografia e RMN com o objetivo de investigar a estrutura e oligomerização de VirB8.

Agradecimentos

DOW Química; FAPESP 2021/10577-0.

Referências

- [1] Macé, K., Vadakkepat, A.K., Redzej, A. et al. Cryo-EM structure of a type IV secretion system. 2022. Nature. **607**: 191-196. DOI: 10.1038/s41586-022-04859-y.
- [2] Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A. et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. 2021. Nature **596**: 583-589. DOI:10.1038/s41586-021-03819-2.