

INVESTIGAÇÃO ESTRUTURAL E CATALÍTICA DA XAC1330: UMA POSSÍVEL ADENILATO CICLASE INÉDITA EM *XANTHOMONAS CITRI*¹

PADUIM, Arthur²
FARAH, Shaker Chuck³

RESUMO

Este trabalho apresenta um estudo experimental voltado à investigação estrutural e funcional da proteína hipotética XAC1330 de *Xanthomonas citri*, agente etiológico do cancro cítrico, doença de relevância fitossanitária e econômica global. A partir de análises in silico, incluindo alinhamento e superposição estrutural predita por AlphaFold2, identificou-se a presença do motivo CYTH em XAC1330, domínio associado a proteínas que atuam na ligação e processamento de substratos trifosforilados dependentes de íons metálicos (IYER; ARAVIND, 2002). A similaridade estrutural com a adenilato ciclase YpACIV de *Yersinia pestis* (SMITH et al., 2006) sustenta a hipótese de que XAC1330 atue como adenilato ciclase (AC), catalisando a conversão de ATP em monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), segundo mensageiro associado à regulação de processos celulares e virulência bacteriana. O objetivo central é caracterizar XAC1330 quanto à estrutura tridimensional e potencial atividade enzimática, por meio de expressão heteróloga, purificação, cristalografia de raios X e ensaios de atividade. O gene foi amplificado por PCR, inserido no vetor pET28a via Gibson Assembly e expresso heterologicamente em *Escherichia coli* BL21(DE3), seguido de indução e purificação por cromatografia de afinidade. A remoção da tag de 6x histidina será realizada com protease trombina, a técnica de dicroísmo circular será empregada para avaliar estrutura secundária e estabilidade conformacional em diferentes condições. Ensaios espectrofotométricos, adaptados de Davi et al. (2022), estão sendo realizados a fim de quantificar a formação de AMPc, permitindo inferir a atividade. A determinação da estrutura tridimensional será conduzida por cristalização e análise de difração de raios X em alta resolução, permitindo identificar detalhes moleculares relevantes para sua atuação. Complementarmente, será gerada uma linhagem de *X. citri* com deleção do gene XAC1330, permitindo avaliar o impacto de sua ausência no fenótipo bacteriano. Adicionalmente, será estudada a expressão nativa da proteína em *X. citri*, correlacionando a produção com características fisiológicas e potencial papel na patogenicidade. Espera-se que este estudo forneça evidências experimentais inéditas sobre a presença de adenilato ciclasas em *X. citri*, até então não identificadas, e contribua para o entendimento dos mecanismos moleculares associados à sinalização por cAMP em fitopatógenos, ampliando o conhecimento do proteoma bacteriano e oferecendo subsídios para o desenvolvimento de estratégias de controle do cancro cítrico.

Palavras-chave: Biologia Estrutural, Enzimas, Proteínas, CYTH.

REFERÊNCIAS

- DAVI, M. et al. **A Robust and Sensitive Spectrophotometric Assay for the Enzymatic Activity of Bacterial Adenylate Cyclase Toxins**. *Toxins*, v. 14, n. 10, p. 691, 8 out. 2022.
- IYER, Lakshminarayan M., e L. ARAVIND. **"The Catalytic Domains of Thiamine Triphosphatase and CyaB-like Adenylyl Cyclase Define a Novel Superfamily of Domains That Bind Organic Phosphates"**. *BMC Genomics*, vol. 3, no 1, dezembro de 2002, p. 33.
- SMITH, Natasha et al. **Crystallization of the class IV adenylyl cyclase from *Yersinia pestis***. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications*, v. 62, n. 3, p. 200–204, 1 mar. 2006

¹ Trabalho de Iniciação Científica (IC).

² Licenciando em Ciências Biológicas; IFSP; Aluno de Iniciação Científica; IQ-USP; São Paulo; SP; arthurpaduim@gmail.com;

³ Professor Doutor de Bioquímica; IQ-USP; São Paulo; SP; chsfarah@iq.usp.br.