



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CELULAR

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOLOGIA MOLECULAR

**Caracterização estrutural e funcional de proteínas de camada S de
*Haloferax volcanii***

Thiago Rodrigues de Oliveira

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular do Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília.

Orientadora: Dra. Cynthia M. Kyaw

2018



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CELULAR

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOLOGIA MOLECULAR

**Caracterização estrutural e funcional de proteínas de camada S de
*Haloferax volcanii***

Thiago Rodrigues de Oliveira

Tese aprovada pela banca:

Dra. Cynthia Maria Kyaw (orientadora) (Universidade de Brasília)

Dra. Betania Ferraz Quirino (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)

Dr. João Ricardo M. Almeida (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)

Dr. Napoleão Fonseca Valadares (Universidade de Brasília)

Dra. Nádia Skorupa Parachin (Universidade de Brasília)

Brasília, Março de 2018

*Dedico essa tese de doutorado à
minha família, a qual apoiou o meu
desejo de fazer pesquisa mesmo na
infância, quando dizia que quando
crescer “queria ser cientista”.*

Agradecimentos

Em primeiro lugar, e não teria como ser de outra maneira, gostaria de agradecer a minha orientadora Cynthia Kyaw. Esse contato, que começou ainda no fim de minha graduação, rendeu ótimas trocas, comentários, e proporcionou crescimento profissional e pessoal. Agradeço a sua companhia e amizade nesses oito anos de convivência, perpassando a minha graduação, mestrado e, agora, doutorado.

Gostaria de agradecer a meus pais, Ednamara e Joanes, pela sua compreensão e apoio ilimitado a escolha difícil que é fazer pesquisa em nosso país. Graças a eles pude ter o privilégio de me dedicar integralmente a fazer o que amo. Posso sempre olhar ambos e me espelhar no exemplo que me deram de conduta pessoal e profissional, tentando sempre me aprimorar enquanto indivíduo.

Agradeço também a minha irmã, Nadja, que mesmo sendo de outra área do conhecimento, me escutou, ouviu e apoiou durante esse processo. Poucas pessoas tem o privilégio de desfrutar uma relação de amizade com seus irmãos tão próxima como a nossa.

Por fazer o meu dia a dia de trabalho tão prazeroso, gostaria de agradecer aos meus colegas de laboratório, os quais tenho sorte de poder chamar também de amigos: Aline Belmok, Deborah Vasconcellos, Letícia Mallmann, Letícia Velasco, Lucas Batista, Melodi Maciel, Milla Gois, Matheus Ramos. Gostaria de agradecer especialmente a Aline e a Deborah, que por anos fazem o nosso team archaea ser de uma troca ilimitada de risos e experiências.

Agradeço imensamente ao professor Bernhard Schuster por ter me recebido de braços abertos em seu laboratório em Viena e contribuir para meu trabalho de maneira essencial, permitindo também o desenvolvimento de uma relação de amizade.

Nesse sentido, gostaria de agradecer aos amigos que fiz no meu instituto em Viena: Kevin Sabbe, Fabio Bisaccia, Sonja Zayni, Jacqueline Friedmann, Christian Czernohlavek, Kevin Pfeifer, Kinga Nagy, Darren Tan, Christoph

Zaba, Harald Mayer e Gianluca Bello. Acho extremamente bonito ver pessoas de diferentes culturas e países se unirem pela pesquisa e com isso desenvolverem laços de amizade, apesar de todas as diferenças.

Gostaria também de agradecer ao meu colega de apartamento em Viena, Johannes, por ter se tornado um grande amigo em um momento em que me vi geograficamente afastado de todos os meus laços afetivos.

Agradeço imensamente a professora Sonia Freitas pela colaboração extremamente rica com o meu trabalho, algo que gerou resultados bastante interessantes.

Nesse sentido, gostaria de agradecer também a colega Amanda Souza, pelo imenso suporte que deu nas análises dos métodos biofísicos utilizados nesse trabalho.

Agradeço a Antonielle Monclaro pela sua ajuda sempre que precisei ir ao seu laboratório fazer algum experimento, me ajudando com imensa disponibilidade e boa vontade.

Gostaria de agradecer dois grandes amigos, Marcos Dummont e Carol Ribeiro, por todas as saídas, noites de vídeo game, drinks, as quais ajudaram bastante a espairecer durante esse processo.

Agradeço também a Alana Lima, Clau Nascimento e Walas Silva pela amizade, apoio, escuta e disponibilidade, estando entre os meus amigos mais antigos.

Finalmente, agradeço a FAP-DF pelo financiamento do projeto que possibilitou a realização desse trabalho, a CAPES por permitir suporte financeiro enquanto podia me dedicar exclusivamente ao doutorado e o órgão austríaco OeAD por tornar possível a minha ida para Viena.

*“Why, sometimes I've believed
as many as six impossible things
before breakfast!”*

Lewis Carroll

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1. Árvore filogenética universal, na qual é possível observar o posicionamento filogenético dos três domínios da vida.....	13
Figura 2. Árvore filogenética atualizada de <i>Archaea</i> baseada em 41 genes marcadores.....	15
Figura 3. Microscopia eletrônica de varredura evidenciando a morfologia celular da archaea <i>Haloferax volcanii</i>	18
Figura 4. Composição da parede celular de representantes de alguns filos de <i>Archaea</i>	19
Figura 5. Tipos de simetria observados nos arranjos cristalinos de camadas S.....	22
Figura 6. Microscopia eletrônica de transmissão evidenciando a camada S com simetria hexagonal da archaea <i>Methanocorpusculum sinense</i>	23
Figura 7. Distribuição das diferentes simetrias de camada S nos filos de <i>Archaea</i> ...	24
Figura 8. Componentes estruturais do <i>tetrabrachion</i> de <i>Staphylothermus marinus</i> ...	27
Figura 9. Estrutura em forma de domo da camada S de <i>Haloferax volcanii</i> disposta sobre a superfície celular.....	32
Figura 10. Esquema da via de <i>N</i> -glicosilação da proteína de camada S de <i>Haloferax volcanii</i>	33
Figura 11. Diferentes estratégias para a obtenção de proteínas de camada S fusionadas a proteínas de interesse.....	36
Figura 12. Esquema representando a obtenção de proteínas de camada S híbridas, fusionadas a produtos de interesse.....	37
Figura 13. Ilustração de uma bicamada lipídica apoiada em proteínas de camada S	39
Figura 14. Perfil eletroforético em gel de agarose 1% da amostra de DNA total extraído a partir da cultura de células de <i>Haloferax volcanii</i>	57
Figura 15. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio contendo produtos de PCR amplificados com os iniciadores HvoSLFor e HvoSLRev.....	58
Figura 16. Cultivo de células do clone S60 em ágar LB contendo canamicina.....	61
Figura 17. Gel de poliacrilamida corado com <i>Coomassie Blue</i> revelando o perfil proteico de células lisadas do clone S60.....	63

Figura 18. Perfil de hidrofobicidade dos resíduos de aminoácidos da proteína de camada S de <i>Haloferax volcanii</i>	66
Figura 19. Gel de poliacrilamida evidenciando a banda obtida a partir da extração de proteínas de camada S de <i>H. volcanii</i>	68
Figura 20. Curvas de desnaturação obtidas por dicroísmo circular.....	70
Figura 21. Espectros obtidos por dicroísmo circular para a proteína de camada S de <i>Haloferax volcanii</i> em pH 4.0.....	70
Figura 22. Espectros obtidos por dicroísmo circular para a proteína de camada S de <i>Haloferax volcanii</i> em pH 7.0.....	71
Figura 23. Espectros obtidos por dicroísmo circular para a proteína de camada S de <i>Haloferax volcanii</i> a 25 °C, em pH 4.0, 7.0 e 8.5.....	74
Figura 24. Emissões por espectroscopia de fluorescência da proteína de camada S de <i>H. volcanii</i> em valores de pH variando de 3.5-9.0.....	76
Figura 25. Espectros obtidos por dicroísmo circular para a proteína de camada S de <i>Haloferax volcanii</i> em diferentes sais.....	79
Figura 26. Emissões por espectroscopia de fluorescência da proteína de camada S de <i>H. volcanii</i> em diferentes sais.....	81
Figura 27. Envelopes celulares de <i>H. volcanii</i> observados por microscopia eletrônica de transmissão.....	82
Figura 28. Experimento de Ultracentrifugação Analítica.....	86
Figura 29. Mudanças na pressão de superfície em função do tempo no sistema Langmuir-Blodgett (TrisHCl 500 µM pH 7.0 + CaCl ₂ 10 mM).....	90
Figura 30. Recristalização da proteína de camada S de <i>H. volcanii</i> por Langmuir-Blodgett em diferentes superfícies.....	91
Figura 31. Mudanças na pressão de superfície em função do tempo no sistema Langmuir-Blodgett (NaCl 2.14 M + CaCl ₂ 10 mM, pH 6.8).....	93
Figura 32. Recristalização da proteína de camada S de <i>H. volcanii</i> em diferentes soluções.....	94
Tabela 1. Componentes do meio de cultura <i>Halobacterium</i> (ATCC 974).....	43
Tabela 2. Análise por espalhamento de luz dinâmico (ELD) em pH 7.0, mediante variação de temperatura.....	72
Tabela 3. Análise por espalhamento de luz dinâmico (ELD) a 25°C, mediante variação do pH.....	78

Sumário

Resumo	10
Abstract.....	11
1. Introdução	12
1.1 O Domínio <i>Archaea</i>	12
1.2. O envelope celular de <i>Archaea</i>	18
1.3. Camada S	21
1.4. Camada S em <i>Archaea</i>	24
1.5. A proteína de camada S de <i>Haloferax volcanii</i>	31
1.6. Aplicações biotecnológicas de proteínas de camada S	35
1.7. Uso de proteínas de camada S para estabilização de membranas lipídicas	37
1.8. Estudos aplicados utilizando proteínas de camada S de <i>Archaea</i>	40
1.9. Justificativa	41
2. Objetivos	42
2.1. Objetivo geral	42
2.2. Objetivos específicos.....	42
3. Materiais e Métodos.....	43
3.1. Cultivo e manutenção das células de <i>Haloferax volcanii</i>	43
3.2. Extração de DNA total de <i>Haloferax volcanii</i>	43
3.3. Ensaios de PCR para amplificação do gene da proteína de camada S de <i>Haloferax volcanii</i>	44
3.4. Purificação dos amplicons obtidos e clonagem no vetor pGEM T easy® .	44
3.5. Preparo de células competentes de <i>Escherichia coli</i> DH5α e transformação por choque térmico.....	45
3.6. Seleção de clones recombinantes e estocagem.....	46
3.7. Extração de DNA plasmidial	46
3.8. Sequenciamento de DNA.....	47
3.9. Análise de sequências	47
3.10. Digestão, ligação dos fragmentos ao vetor de expressão e transformação	48
3.11. Triagem dos clones recombinantes para indução da expressão	48
3.12. Indução da expressão do gene codificador da proteína de camada S de <i>H. volcanii</i> em células de <i>E. coli</i>	49
3.13. Extração das proteínas de camada S a partir da cultura de <i>H. volcanii</i> ...	49
3.14. Quantificação de proteínas.....	50

3.15. Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE).....	50
3.16. Preparo de células-fantasma de <i>H. volcanii</i>	51
3.17. Microscopia Eletrônica de Transmissão	51
3.18. Ultracentrifugação Analítica	51
3.19. Análise da estrutura secundária por dicroísmo circular	52
3.20. Análise da estrutura terciária por espectroscopia de fluorescência.....	53
3.21. Análise da tendência à oligomerização por espalhamento de luz dinâmico (ELD)	53
3.22. Langmuir-Blodgett	54
4. Resultados e Discussão.....	56
4.1. Isolamento do gene que codifica a proteína de camada S de <i>Haloferax volcanii</i> e sua expressão em <i>Escherichia coli</i>	56
4.1.1. Extração de DNA total de <i>H. volcanii</i>	57
4.1.2. Ensaio de PCR para amplificação do gene da proteína de camada S de <i>Haloferax volcanii</i>	57
4.1.3. Transformação de células de <i>Escherichia coli</i> DH5 α	58
4.1.4. Sequenciamento e análise da qualidade das sequências de DNA.....	59
4.1.5. Transformação de células de <i>E. coli</i> BL 21 (DE3) pLysS com o vetor de expressão pET 28a(+) e seleção de clones para expressão heteróloga.....	60
4.1.6. Indução da expressão do gene que codifica a proteína de camada S de <i>Haloferax volcanii</i> em células de <i>E. coli</i> BL 21 (DE3) pLysS	61
4.2. Caracterização estrutural de proteínas de camada S nativas de <i>Haloferax volcanii</i>	65
4.2.1. Análise da sequência de aminoácidos.....	66
4.2.2. Extração de proteínas de camada S a partir da cultura de <i>H. volcanii</i>	67
4.2.3. Influência da temperatura na estrutura da proteína de camada S de <i>H. volcanii</i>	69
4.2.4. Influência do pH na estrutura da proteína de camada S de <i>H. volcanii</i>	73
4.2.5. Influência da salinidade na estrutura da proteína de camada S de <i>H. volcanii</i>	79
4.3. Construção de envelopes celulares biomiméticos utilizando a proteína de camada S de <i>H. volcanii</i>	88
5. Considerações finais.....	96
6. Conclusões	98
7. Perspectivas futuras.....	100
8. Referências Bibliográficas	101
Anexo I. Publicações realizadas durante o período de doutorado	118

Resumo

A presença de uma camada proteica de superfície (camada S) é comum em organismos procarióticos. As proteínas que compõem essa camada apresentam a propriedade de se auto-organizar em arranjos simétricos estáveis, que as confere um alto potencial biotecnológico. Apesar de presente em quase todas as archaeas, existem poucos relatos do uso de proteínas de camada S desses organismos em estudos aplicados. Além disso, os estudos descrevendo a estrutura de proteínas desse tipo são escassos. Assim, esse trabalho tem o objetivo de caracterizar estruturalmente as proteínas de camada S da archaea halófila *Haloferax volcanii*, utilizá-las para a construção de envelopes celulares biomiméticos para o estudo de membranas e a expressão dessa proteína em *E. coli* para construção de fusões gênicas de interesse. As proteínas foram obtidas a partir da cultura de células de *H. volcanii* e caracterizadas por ensaios de espalhamento de luz dinâmico, dicroísmo circular e espectroscopia de fluorescência. Microscopia eletrônica de transmissão foi utilizada para observar a formação do arranjo cristalino das proteínas purificadas, bem como de envelopes celulares de *H. volcanii*. Foram produzidas monocamadas lipídicas por Langmuir-Blodgett utilizando os lipídios DPPE, DPPC e DPhPE. A estrutura secundária da proteína é afetada pelo pH, de maneira que uma maior quantidade de folhas beta foi detectada em valores mais altos. Esse mesmo fator influencia também a sua estrutura terciária, de maneira que em valores mais alcalinos as regiões próximas aos resíduos de triptofano da proteína interagem mais com o meio. No entanto, ensaios de espalhamento de luz dinâmico indicaram formação de oligômeros em todos os pHs testados, havendo picos monodispersos, indicando a capacidade de cristalização da proteína em todas as condições. No entanto, imagens de microscopia revelam que os arranjos formados nessas condições não estão de acordo com o normalmente observado na superfície celular desse organismo, algo que foi somente possível em condições de alta salinidade. A concentração de íons de sódio, magnésio e cálcio no meio afeta a estrutura secundária e terciária da proteína, influenciando assim a sua propriedade de auto-arranjo. Nos ensaios de Langmuir-Blodgett, foi observada a cristalização das proteínas sobre as diferentes superfícies lipídicas, sugerindo assim um possível potencial no uso dessas proteínas para produção de envelopes celulares artificiais. Foi também possível a expressão de proteínas de camada S de *H. volcanii* em *E. coli*.

Abstract

The presence of a protein surface layer, known as the S-layer, is commonly found in prokaryotic cell envelopes. This layer is composed of proteins that self-assemble into a paracrystalline surface structure, a property that has been extensively used in biotechnological research. Despite its detection in almost all archaea described to date, there are very few reports in the literature using these proteins for applied purposes. Furthermore, studies describing structural aspects of these proteins are scarce. Thus, the objective of the present study was to investigate the structural properties of the *Haloferax volcanii* S-layer protein, use them for production of biomimetic S-layer supported lipid platforms and heterologous expression of S-layer fusion proteins in *E. coli*. The S-layer proteins were purified directly from *H. volcanii* cells and their structural properties were evaluated through dynamic light scattering, circular dichroism and fluorescence spectroscopy. Transmission electron microscopy was used for analyses of the protein's self-assembly properties as well as *H. volcanii* cell envelope preparations. Lipid monolayers using DPPE, DPPC and DPhPE were produced through Langmuir-Blodgett. The protein's secondary structure is affected by pH values in the medium, with higher beta sheet detection in more alkaline values. This factor also affects the protein's tertiary structure, with higher tryptophan exposure to the environment in higher pH. Dynamic light scattering essays revealed oligomer formation in all pH values evaluated, indicating that the protein's self-assembly process occurs in these conditions. However, micrograph images showed that these oligomers do not resemble the lattice found on the *H. volcanii* cell surface, and correct lattice formation was only achieved in higher salt concentrations. The concentrations of sodium, magnesium and calcium ions in the environment affect the protein's secondary and tertiary structures, which influences the protein's functional properties. On the Langmuir-Blodgett essays, an increase of surface pressure was detected on all lipid monolayers tested, indicating a potential use of the *H. volcanii* S-layer proteins in artificial lipid platform production. It was also possible to isolate the protein's encoding gene and heterologous protein expression was successful in *E. coli* cells.

1. Introdução

1.1 O Domínio *Archaea*

Até a década de 70, os sistemas de classificação dos seres vivos, baseados essencialmente em caracteres morfológicos, mostravam-se bastante adequados para organismos macroscópicos (Whittaker, 1969). No entanto, o mesmo não podia ser dito em relação aos microrganismos, de maneira que até a segunda metade do século XX, o estudo das suas relações filogenéticas era considerado impossível (Schleifer, 2009). Em 1965 foi postulado que o genoma de um organismo poderia ser considerado o principal registro de sua história evolutiva (Zuckerandl e Pauling, 1965). Tal postulado foi de grande importância para a microbiologia, uma vez que microrganismos poderiam ser identificados e classificados a partir de marcadores filogenéticos moleculares e a comparação desses marcadores em diferentes organismos levaria a um maior entendimento das suas relações filogenéticas (Schleifer, 2009). Nesse contexto, rRNAs são de especial importância para estudos dessa natureza, uma vez que genes de rRNA 16S ou 18S são encontrados em todas as formas celulares, possuindo homologia funcional e evolutiva (Fox *et al.*, 1977; Olsen *et al.*, 1986).

Assim, a partir dos resultados obtidos nas análises comparativas de sequências de rRNA 16S de bactérias já bastante conhecidas com aquelas de um grupo de bactérias ainda pouco caracterizado, as até então denominadas bactérias metanogênicas, Woese e Fox propuseram, em 1977, que os procariotos fossem divididos em dois reinos. Nesta divisão, o reino Eubacteria seria composto pelas bactérias já bem conhecidas, enquanto o reino Archaeobacteria seria composto pelas bactérias metanogênicas. Essa

denominação foi adotada pelo fato dos organismos metanogênicos serem considerados, à época, organismos ancestrais de bactérias. No entanto, estudos posteriores revelaram que as chamadas archaeobactérias apresentavam características bastante distintas daquelas encontradas tanto em bactérias e quanto em eucariotos.

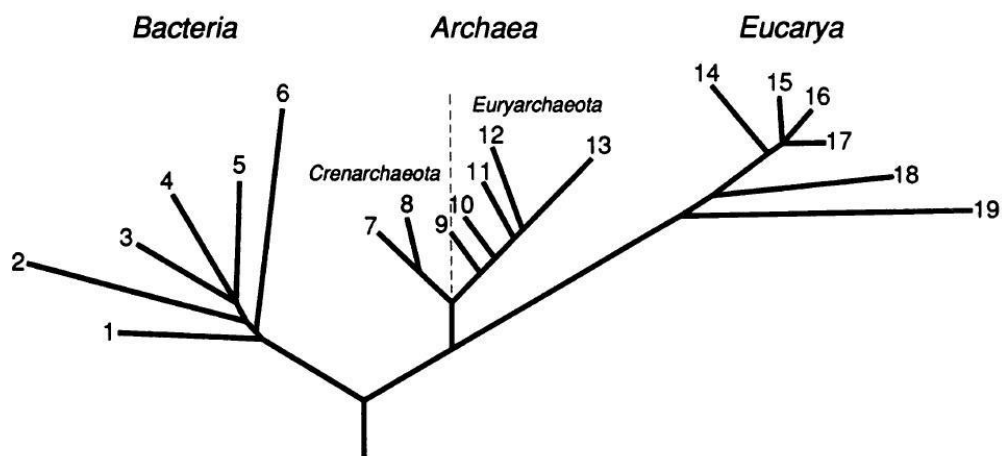


Figura 1. Árvore filogenética universal, na qual é possível observar o posicionamento filogenético dos três domínios da vida. *Bacteria*: 1- Thermotogales, 2- Flavobactérias e organismos relacionados, 3- Cianobactérias, 4- Bactérias púrpuras, 5- Bactérias Gram-positivas, 6- Bactérias verdes e não sulfurosas; *Archaea*: Filo Crenarchaeota: 7- Pyrodictium, 8- Thermoproteus, Filo Euryarchaeota: 9- Thermococcales, 10- Methanococcales, 11- Methanobacteriales, 12- Methanomicrobiales, 13- Halófilos; *Eucarya*: 14- Animais, 15- Ciliados, 16- Plantas verdes, 17- Fungos, 18- Flagelados, 19- Microsporídeos (Woese *et al.*, 1990).

Por essa razão, Woese e colaboradores propuseram, em 1990, que os seres vivos fossem divididos em três domínios da vida: *Bacteria*, *Archaea* e *Eucarya* (Figura 1) (Woese *et al.*, 1990). O nome archaeobacteria foi abandonado, sendo substituído pelo termo *Archaea*. Essa mudança ocorreu devido a análises comparativas de rRNAs 16S e 18S que revelaram que o domínio *Archaea* não consistia em um grupo ancestral de bactérias, uma vez que, apesar de procarióticos, exibiam estreita relação com organismos do

domínio *Eukarya*. O domínio *Archaea* se assemelha ao domínio *Eukarya* no que diz respeito aos genes informacionais, associados à replicação, transcrição e tradução. No entanto, os genes operacionais, envolvidos em vias metabólicas, são mais similares ao domínio *Bacteria* (Rivera *et al.*, 1998). Além dessas e outras características comuns com os outros dois domínios, o domínio *Archaea* também apresenta características únicas.

Quando o domínio *Archaea* foi proposto em 1990, os organismos analisados até aquele momento já eram agrupados em dois filos distintos: Euryarchaeota e Crenarchaeota. No entanto, com o avanço das técnicas de sequenciamento e a aplicação de diferentes métodos de biologia molecular independentes de cultivo, uma série de novos filos foram propostos nos últimos anos: Korarchaeota, Nanoarchaeota, Thaumarchaeota, Aigarchaeota, Geoarchaeota, Parvarchaeota, Aenigmarchaeota, Diapherotrites, Nanohaloarchaeota, Bathyarchaeota, Woesearchaeota, Pacearchaeota, Lokiarchaeota,, Thorarchaeota e Verstraetearchaeota (Barns *et al.*, 1996; Huber *et al.*, 2002; Brochier-Armanet *et al.*, 2008; Nunoura *et al.*, 2011; Kozubal *et al.*, 2013; Rinke *et al.*, 2013; Meng *et al.*, 2014; Castelle *et al.*, 2015; Spang *et al.*, 2015; Seitz *et al.*, 2016; Vanwonterghem *et al.*, 2016). Apesar disso, até o momento apenas cinco filos são formalmente aceitos de acordo com o *List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature* (Euzéby, 1997; Parte, 2013): Euryarchaeota, Crenarchaeota, Korarchaeota, Nanoarchaeota e Thaumarchaeota. Dessa maneira, a filogenia de *Archaea* está constantemente sendo discutida, com novas árvores filogenéticas tendo sido geradas para afiliar esses novos grupos e esclarecer as relações evolutivas desses organismos, como ilustrado na Figura 2 (Adam *et al.*, 2017).

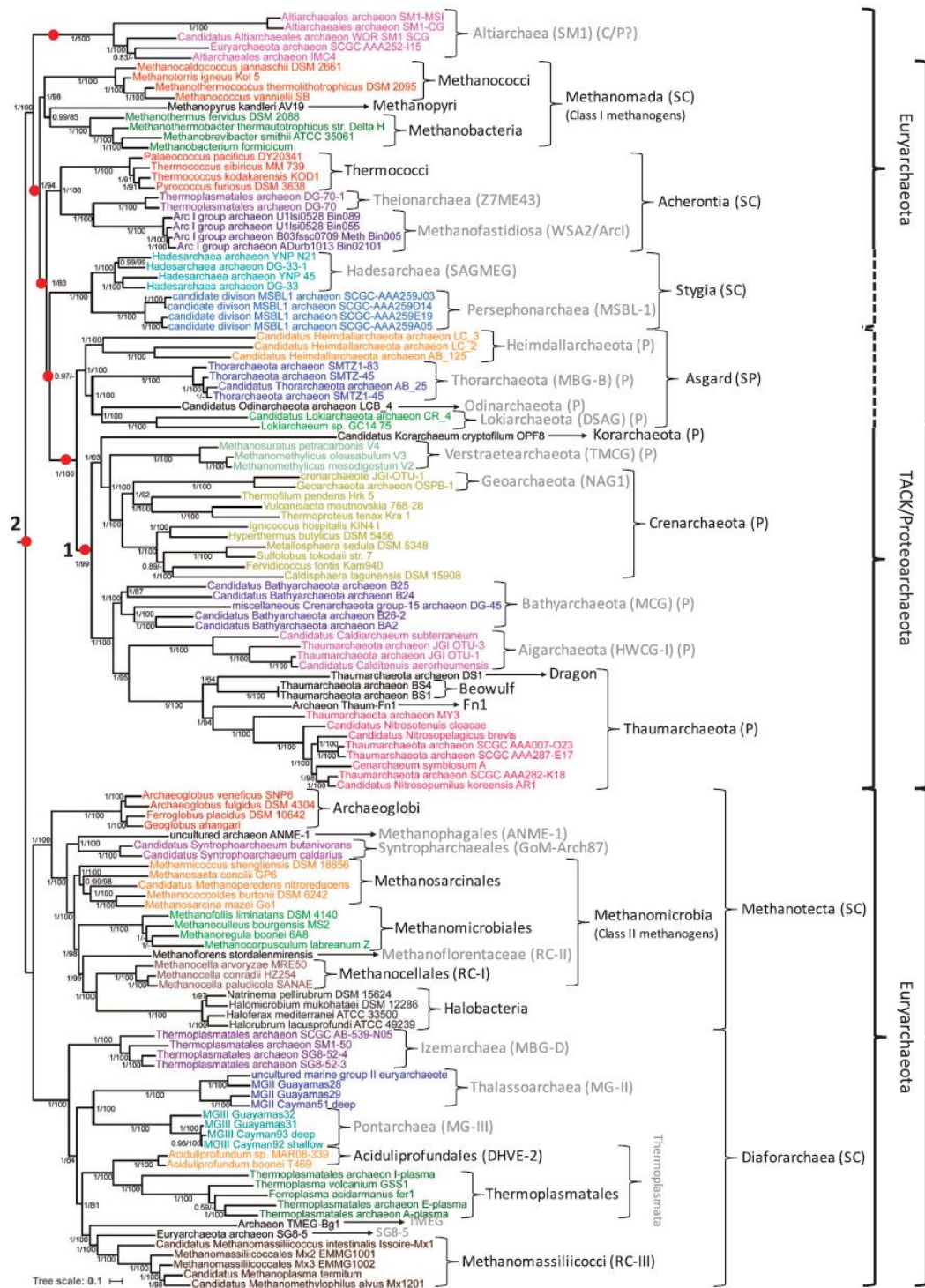


Figura 2. Árvore filogenética atualizada de *Archaea* baseada em 41 genes marcadores. Os grupos indicados em cinza não possuem representantes cultivados. C= Classe; P= Filo; SC= Super Classe; SP= Super Filo (Adam *et al.*, 2017).

Os critérios utilizados para o reconhecimento formal de táxons segundo o *List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature* são: citações no *Approved Lists of Bacterial Names*; publicações nos periódicos *International Journal of Systematic Bacteriology* (IJSB) e *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (IJSEM); publicações em listas de validação. Assim, apesar de existirem cinco filos de *Archaea* formalmente reconhecidos e muitos outros propostos, será dada atenção especial ao filo Euryarchaeota devido ao fato de o organismo modelo para a realização deste trabalho ser um halófilo moderado pertencente a esse grupo.

É interessante apontar que os organismos há muitos anos classificados como pertencentes ao filo Euryarchaeota se mantiveram nesse filo, mesmo após a descrição de inúmeros novos isolados e/ou genomas, enquanto vários organismos inicialmente classificados como do filo Crenarchaeota passaram a ser classificados em outros filos a partir de estudos mais recentes.

O filo Euryarchaeota é composto por organismos com fisiologias bastante distintas, em contraste com o filo Crenarchaeota, composto na maior parte por organismos hipertermófilos. Entre os grupos pertencentes a esse filo, podemos citar organismos metanogênicos, halófilos, redutores de sulfato, hipertermófilos. Os metanogênicos são anaeróbicos estritos e seu metabolismo é único, utilizando o carbono como aceptor final de elétrons. Durante o processo de obtenção de energia, estes organismos liberam metano como um dos seus produtos (Thauer, 1998).

Archaeas halófilas habitam ambientes hipersalinos (DasSarma e DasSarma, 2012) como lagoas de sal, o Mar Morto, salmouras naturais e

salternas marinhas (San-Lotter e Fendrihan, 2015). Alguns desses microrganismos exibem crescimento ótimo em concentrações de sal próximas ao ponto de saturação e, assim, várias adaptações são necessárias para a sua sobrevivência. De maneira geral, haloarchaeas apresentam uma concentração intracelular alta de íons de potássio para que ocorra o equilíbrio osmótico com a alta concentração de íons de sódio no ambiente (Ginzburg *et al.*, 1970; Oren, 1999). Além disso, as proteínas desses organismos são comumente ricas em resíduos de aminoácidos expostos negativamente carregados (Ng *et al.*, 2000; Kennedy *et al.*, 2001; Baliga *et al.*, 2004), de maneira a favorecer sua solubilidade em condições de alta salinidade (Mevarech *et al.*, 2000).

Devido à facilidade de manipulação em condições laboratoriais (Litchfield, 2011), haloarchaeas são frequentemente utilizadas como organismos modelo para *Archaea*. Essa facilidade se dá pelo fato de não ser necessário o cultivo em altas temperaturas ou condições de anaerobiose. Além disso, as altas concentrações de sal utilizadas na confecção dos meios de cultura para esses organismos restringem bastante a possibilidade de contaminação.

O organismo *Haloferax volcanii*, em particular, é bastante utilizado como modelo de estudo para o entendimento dos diferentes processos biológicos desse domínio da vida (Allers e Ngo, 2003; Hartman *et al.*, 2010). Essa haloarchaea foi inicialmente isolada de sedimentos do Mar Morto (Mullakhanbhai e Larsen, 1975) e seu crescimento ótimo ocorre em concentrações de NaCl entre 1,7 a 2,5 M, 45 °C e pH levemente ácido (Garrity *et al.*, 2001). As células de *H. volcanii* têm de 1 a 3 µm de diâmetro, podendo se apresentar sob a forma de discos curvos (Garrity *et al.*, 2001) (Figura 3).

Como muitas archaeas, a parede celular de *H. volcanii* é composta por uma camada de superfície proteica altamente ordenada (camada S) ancorada diretamente à superfície celular (Albers e Meyer, 2011).

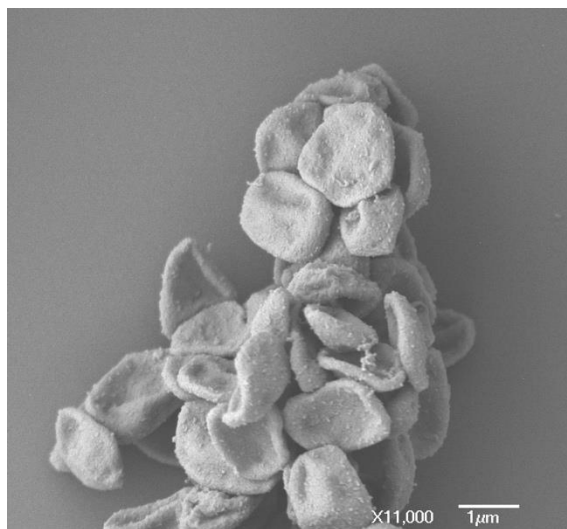


Figura 3. Microscopia eletrônica de varredura evidenciando a morfologia celular da archaea *Haloferax volcanii* (Garrity *et al.*, 2001).

1.2. O envelope celular de *Archaea*

Os lipídeos encontrados nas membranas de *Archaea* são bastante diferentes dos encontrados nas membranas bacterianas e eucarióticas. Em eucariotos e bactérias, os ácidos graxos são ligados a uma molécula de glicerol-3-fosfato por uma ligação do tipo éster. Em archaeas, não existem cadeias de ácidos graxos, mas sim cadeias laterais de hidrocarbonetos que se ligam a uma molécula de glicerol-1-fosfato por uma ligação do tipo éter (Kates *et al.*, 1993). Outra característica particular de *Archaea* é a presença de membranas estruturadas como monocamadas lipídicas, especialmente em membros hipertermófilos. Quando as membranas ocorrem como monocamadas, sua fluidez é modulada por meio da ciclização de determinados

componentes da cadeia lateral de hidrocarbonetos (DeRosa *et al.*, 1991). A parede celular em *Archaea* difere da de *Bacteria* por não apresentar peptidoglicano e, em seu lugar, uma série de diferentes componentes foram descritos (Figura 4).

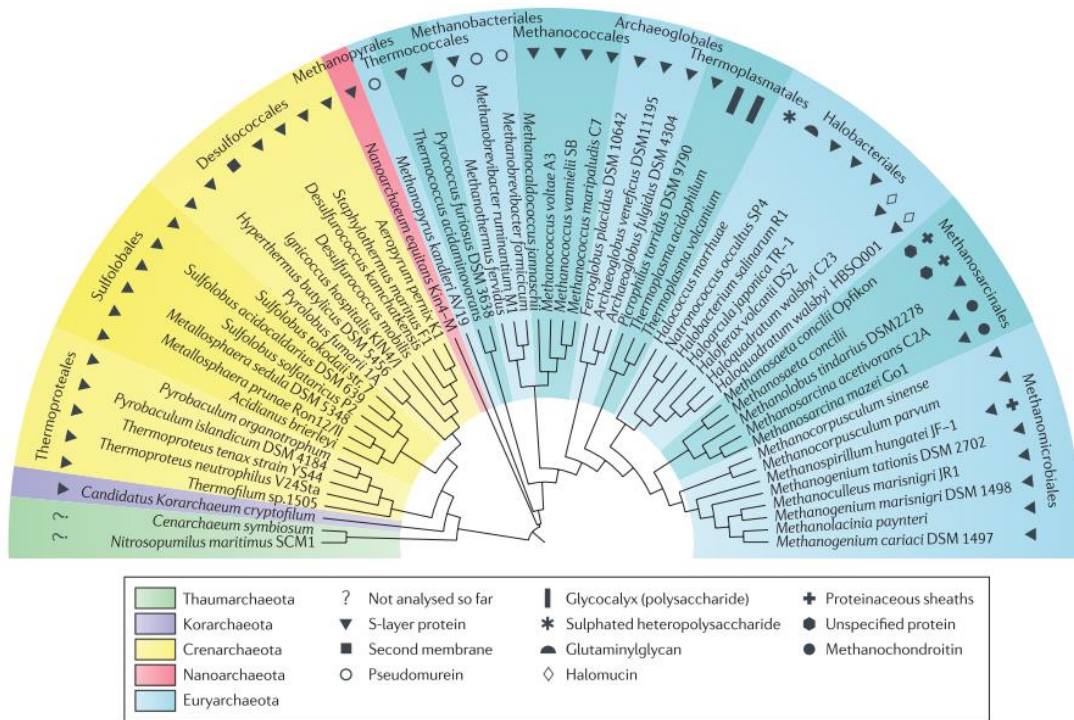


Figura 4. Composição da parede celular de representantes de alguns filões de *Archaea* (Albers e Meyer, 2011).

A pseudomureína é um polímero similar ao peptidoglicano, que apresenta uma espessura média de 15 a 20 nm (Kandler e Koenig, 1993). Esse componente de parede ocorre apenas em alguns grupos de *Archaea*, especialmente em organismos metanogênicos. Dentre as diferenças dessa estrutura e o peptidoglicano de bactérias, podemos citar a ocorrência de ácido N-acetiltalosaminurônico ao invés de ácido N-acetilmurâmico. Além disso, a ligação entre o ácido N-acetiltalosaminurônico e a N-acetilglucosamina é do tipo $\beta 1 \rightarrow 3$, enquanto que no peptidoglicano a ligação entre o ácido N-

acetilmurâmico e a N-acetilglucosamina é do tipo $\beta 1 \rightarrow 4$. Na pseudomureína, não ocorrem aminoácidos na conformação D nas ligações cruzadas. Alternativamente, a parte peptídica da molécula é composta normalmente por três aminoácidos na conformação L (ácido glutâmico, alanina e lisina). É interessante notar que apesar da similaridade com o peptidoglicano, não foi encontrada homologia entre as proteínas envolvidas na síntese da pseudomureína e as proteínas envolvidas na síntese do peptidoglicano, sugerindo que as duas vias evoluíram separadamente (Konig *et al.*, 1994; Scheffers e Pinho, 2005; Claus e Koenig, 2010).

A metanocondroitina é um polímero de parede celular produzido por agregados celulares de algumas espécies do gênero *Methanosarcina* (Kreisl e Kandler, 1986). Essa estrutura consiste em um polímero fibrilar, composto por repetições de duas moléculas de N-acetilgalactosaminas e uma molécula de ácido glucurônico. É similar à condroitina produzida por vertebrados como componente de matriz do tecido conjuntivo (Kjellen e Lindahl, 1991). No entanto, a metanocondroitina difere da condroitina devido à proporção de moléculas de N-acetilgalactosaminas para moléculas de ácido glucurônico e por não ser um composto sulfatado.

Apesar da variedade de componentes de parede celular descritos em *Archaea*, é interessante notar que uma camada proteica paracristalina de superfície denominada camada S (do inglês *S-layer*), está presente no envelope celular de um expressivo número de organismos desse domínio (Figura 4) (Albers e Meyer, 2011).

1.3. Camada S

A camada S pode ser encontrada tanto em archaeas quanto em bactérias e é geralmente composta por uma única espécie de proteína ou glicoproteína com massa molecular de 40 a 200 kDa, frequentemente associada à membrana citoplasmática (Sara e Sleytr, 1996). É importante apontar que existem casos em que a camada S é composta por duas espécies de proteína distintas (Albers e Meyer, 2011).

Uma característica interessante das proteínas de camada S consiste em sua capacidade de se agrupar em arranjos cristalinos simétricos bidimensionais. Tendo em vista que esse componente de parede celular é encontrado em muitos organismos procarióticos, proteínas de camada S consistem em um dos biopolímeros mais abundantes da biomassa terrestre, sendo produzidas em quantidades elevadas na célula (Pum *et al.*, 2013). Apesar de inicialmente a função da camada S não ter sido entendida, hoje se sabe que ela desempenha papéis de proteção celular, reconhecimento de superfície, manutenção de forma celular, entre outros (Sleytr *et al.*, 2014).

Dependendo do organismo, uma unidade morfológica da camada S consiste de uma (p1), duas (p2), três (p3), quatro (p4) ou seis (p6) cópias idênticas de uma determinada proteína ou glicoproteína (Figura 5). O espaço entre as proteínas que formam a camada S varia de 2,5 a 35 nm (Sleytr *et al.*, 2007). Como camadas S são arranjos monomoleculares de subunidades idênticas, os poros formados apresentam tamanhos e morfologias idênticos (Sara e Sleytr, 2000).

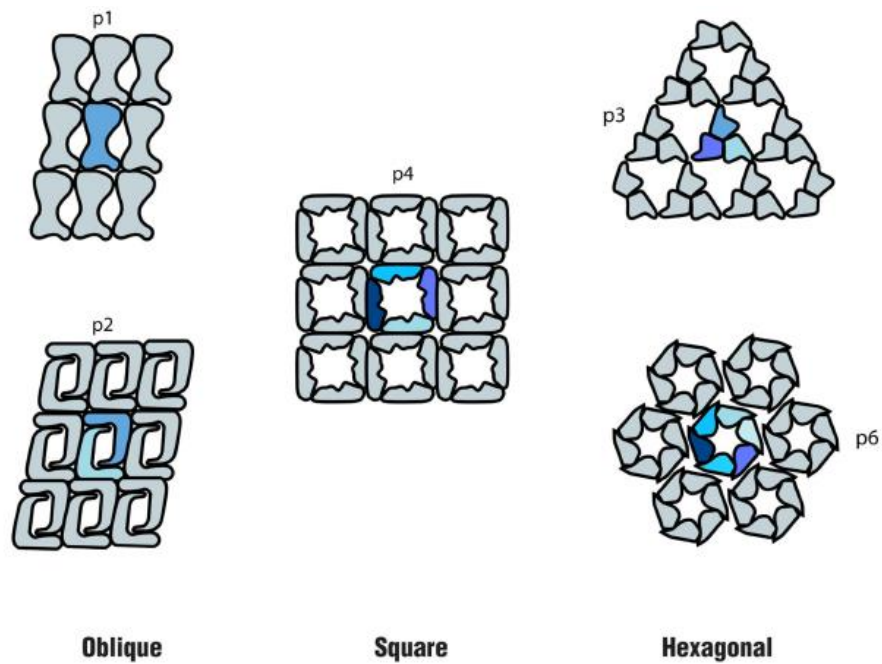


Figura 5. Tipos de simetria observados nos arranjos cristalinos de camadas S. (Rodrigues-Oliveira *et al.*, 2017).

Métodos de microscopia eletrônica são bastante utilizados para o estudo e detecção de camada S, possibilitando estimar detalhes do arranjo cristalino e tamanho dos poros (Figura 6) (Beveridge e Graham, 1991). Os poros chegam a compor 70% da área ocupada pela camada S, de maneira que a face externa é comumente mais hidrofílica e a face interna mais hidrofóbica (Sleytr *et al.*, 1996). A maioria das proteínas que compõe as diferentes camadas S apresenta ponto isoelétrico levemente ácido (pI 3-5), com cerca de 50-60% resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e poucos resíduos sulfurados (Sara e Sleytr, 2000). Muitas proteínas que compõem a camada S são *N*- ou *O*-glicosiladas, geralmente em resíduos de Asp e Ser ou Thr (Messner e Sleytr, 1992; Jarrell *et al.*, 2014). Além disso, outros estudos indicam que em alguns organismos há regiões da proteína que não são essenciais à formação do

arranjo cristalino, sendo este mantido mesmo quando há deleção de determinados trechos do gene que a codifica (Pum *et al.*, 2013).

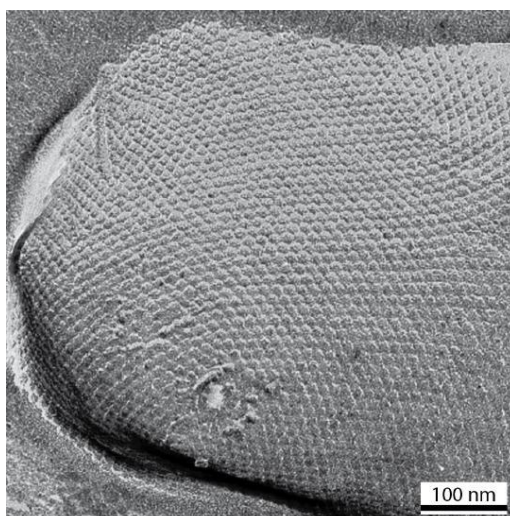


Figura 6. Microscopia eletrônica de transmissão evidenciando a camada S com simetria hexagonal da archaea *Methanocorpusculum sinense* (Pum *et al.*, 2013).

A camada S encontra-se ancorada à superfície do microrganismo, de maneira que as unidades são separadas na presença de detergentes ou agentes capazes de romper ligações de hidrogênio (Debabov, 2004). Mesmo quando separadas, unidades isoladas da camada S possuem a capacidade de recristalização em arranjos regulares quando o agente utilizado na separação é removido (Beveridge, 1994). A propriedade de auto-organização dessas proteínas, originando estruturas cristalinas homogêneas, confere enorme potencial nanotecnológico às camadas S (Debabov, 2004; Sleytr *et al.*, 2007; Ilk *et al.*, 2011, Pum *et al.*, 2013).

1.4. Camada S em *Archaea*

As camadas S de organismos pertencentes aos filos Euryarchaeota e Crenarchaeota são as melhores descritas até hoje. Como a maioria dos representantes cultivados em *Archaea* pertence a esses filos, tal fator contribuiu para descrições morfológicas mais detalhadas de seu envelope celular. Existem estudos que detectaram e descreveram a camada S de archaeas metanogênicas e halófilas antes mesmo da proposta da classificação dos seres vivos em três domínios da vida (Steensland e Larsen, 1969; Mullakhanbhai e Larsen, 1975; Baumeister *et al.*, 1982; Nußer e König, 1987).

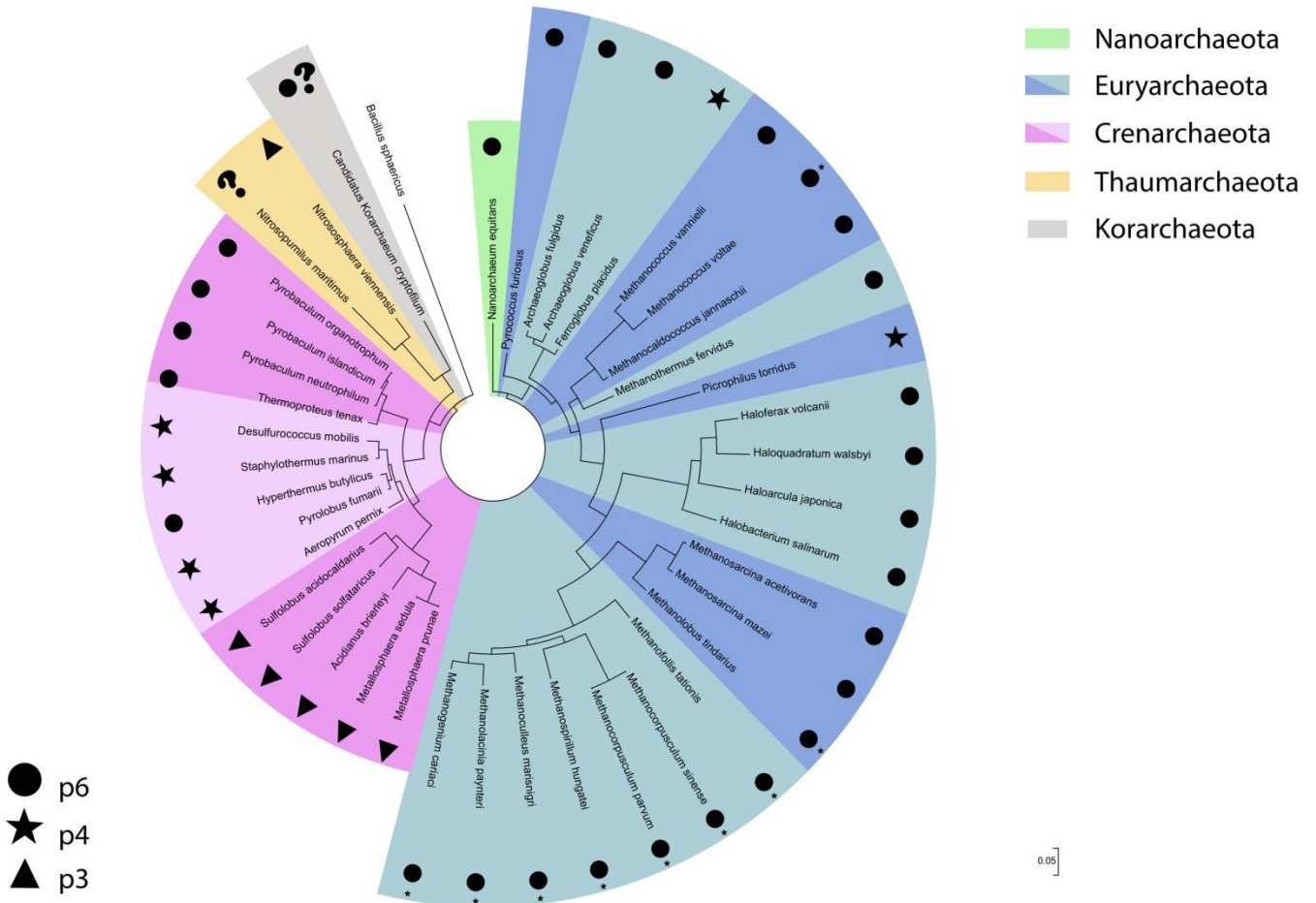


Figura 7. Distribuição das diferentes simetrias de camada S nos filos de *Archaea* em uma árvore filogenética construída a partir de genes que codificam o rRNA 16S. A bactéria *Bacillus sphaericus* foi utilizada como grupo externo (Rodrigues-Oliveira *et al.*, 2017).

Ao se comparar a camada S das espécies de archaeas descritas até o momento, é possível observar uma predominância da simetria hexagonal em números absolutos (Figura 7) (Rodrigues-Oliveira *et al.*, 2017). No entanto, ao se observar a distribuição dos tipos de simetria de camada S nos diferentes filios, é evidente que a simetria hexagonal é quase completamente dominante em Euryarchaeota, principalmente em organismos halófilos e metanogênicos. Embora tal simetria seja também detectada em membros de Crenarchaeota, outras simetrias são também comuns, havendo uma correlação entre o tipo de simetria de camada S e as principais ordens desse filo. Como a descrição do envelope celular de representantes dos demais filios de *Archaea* é ainda bastante limitada, torna-se difícil traçar um padrão global para este domínio da vida.

Como mencionado anteriormente, existem casos em que a camada S é composta por duas proteínas distintas. Em *Archaea*, todas as descrições de camadas S compostas por duas proteínas foram feitas na ordem Sulfolobales do filo Crenarchaeota. A camada S de *Sulfolobus acidocaldarius* foi bastante estudada ao longo do tempo e é composta por duas proteínas altamente glicosiladas: SlaA e SlaB (Grogan, 1989; Grogan, 1996; Veith *et al.*, 2009). Essas proteínas estão associadas de maneira não covalente e desempenham papéis estruturais distintos, de maneira que as glicoproteínas SlaA formam a camada externa altamente organizada e as proteínas SlaB ancoram a camada S à membrana plasmática. Análises moleculares demonstraram que os genes *slaA* e *slaB* estão adjacentes no cromossomo e são transcritos como operons bicistrônicos, uma característica conservada na ordem Sulfolobales (Veith *et al.*, 2009).

A glicosilação da proteína SlaA de *S. acidocaldarius* foi investigada e esta apresenta 31 sítios preditos de *N*-glicosilação (Peyfoon *et al.*, 2010; Meyer e Albers, 2013). No entanto, um terço desses sítios está concentrado na região próxima ao C-terminal da proteína, levando a uma notória densidade de glicosilação nessa região. Essa propriedade foi observada na sequência de aminoácidos dessa proteína em todos os membros da ordem Sulfolobales, de maneira que foi proposto que essa alta densidade de glicosilação possa ser uma adaptação a ambientes termoacidófilos (Meyer e Albers, 2013).

A camada S de *S. acidocaldarius* desempenha um papel na ancoragem do flagelo (Banerjee *et al.*, 2015). A proteína flagelar FlaF se liga à camada S e essa interação ocorre no espaço pseudoperiplasmático, sendo essa proteína responsável pelo ancoramento do flagelo à superfície celular. Curiosamente, esse estudo revelou uma similaridade estrutural entre FlaF e a proteína de camada S da bactéria *Geobacillus setearothermophilus*.

Staphylothermus marinus, pertencente à ordem Desulfurococcales do filo Crenarchaeota, teve seu envoltório celular descrito em detalhes. Esse organismo fermentador de peptídeos é hipertermófilo e sua camada S apresenta uma simetria do tipo p4, com um grau de ordenação menor que o normalmente observado em outros organismos (Peters *et al.*, 1995). Diversos estudos (Peters *et al.*, 1995; Peters *et al.*, 1996; Mayr *et al.*, 1996; Stetefeld *et al.*, 2000) desempenharam um papel fundamental na determinação estrutural da unidade morfológica da camada S de *S. marinus*. Essa unidade morfológica, chamada de *tetrabrachion*, consiste em uma haste de 70 nm de comprimento, composta por quatro glicoproteínas idênticas que terminam em quatro “braços” que se caracterizam por possuírem alta densidade de estruturas secundárias

em folhas β (Figura 8a). Esses “braços” têm 24 nm de comprimento e são responsáveis pela conectividade entre as unidades morfológicas da camada S desse organismo (Figura 8b) (Peters *et al.*, 1995). Uma propriedade particular da camada S de *S. marinus* consiste na presença de duas proteínas globulares com atividade proteolítica ligadas à haste do *tetrabrachion*, localizadas a 32 nm da região onde os “braços” começam (Peters *et al.*, 1995). Esse é o único caso em *Archaea* de um componente de camada S com atividade enzimática. Tal propriedade também está presente nas camadas S das bactérias *Clostridium difficile* (Calabi *et al.*, 2001), *Bacillus anthracis* (Ahn *et al.*, 2006) e *Lactobacillus acidophilus* (Prado-Acosta *et al.*, 2008).

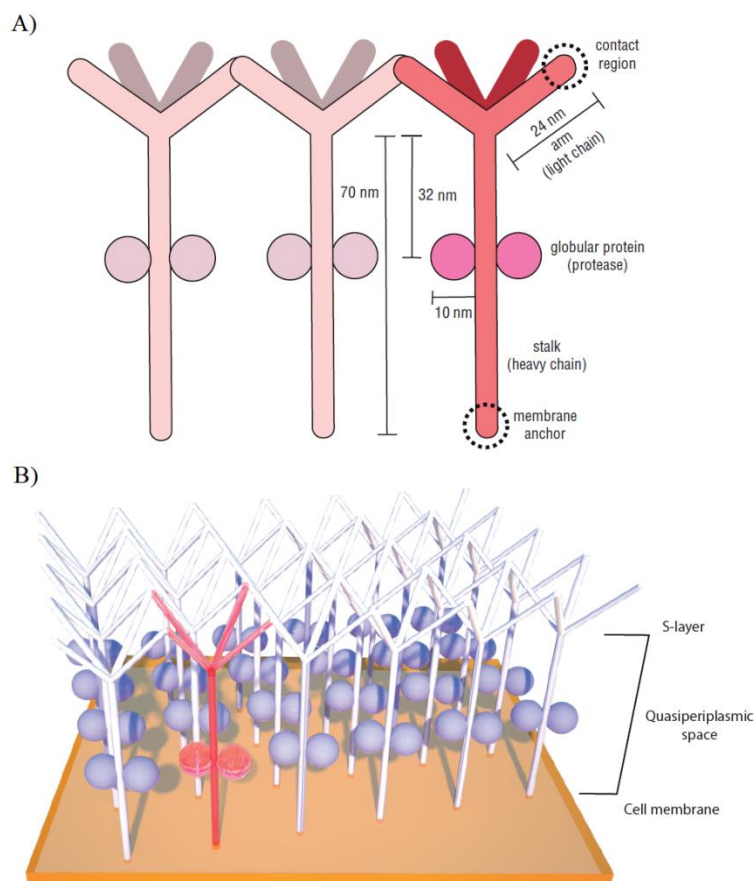


Figura 8. Componentes estruturais do *tetrabrachion* de *Staphylothermus marinus* (A) e ilustração esquemática da interação entre as unidades morfológicas na superfície celular (B) (Rodrigues-Oliveira *et al.*, 2017).

Essa protease, denominada STABLE, é bastante resistente ao calor e agentes desnaturantes, especialmente quando associada ao *tetrabrachion* (Mayr *et al.*, 1996), apresentando alto espectro de afinidade em relação aos substratos. Por clivar peptídeos em regiões que sucedem resíduos de Glu, foi proposto que essa enzima poderia desempenhar um papel de quebra do *tetrabrachion* durante o processo de síntese da camada S e divisão celular, devido à presença de um sítio de clivagem entre o resíduo Glu700 e Glu701 das proteínas que formam essa estrutura (Peters *et al.*, 1996). Também foi sugerido que STABLE poderia desempenhar um papel de degradação de proteínas no ambiente, favorecendo o metabolismo de fermentação de peptídeos de *S. marinus* (Fiala *et al.*, 1986; Peters *et al.*, 1996).

Como mencionado anteriormente, as camadas S de organismos pertencentes ao filo Euryarchaeota também foram alvo de diversos estudos, principalmente se tratando de organismos metanogênicos e halófilos. Alguns estudos compararam a camada S de archaeas metanogênicas mesófilas com aquela de termófilas. As proteínas de camada S de *Methanococcus vannielli*, *Methanococcus thermolithotrophicus* e *Methanocaldococcus jannaschii* apresentam composição de aminoácidos comparável (Nußer e König, 1987; Akca *et al.*, 2002), apesar desses organismos terem temperaturas ótimas de crescimento distintas (37, 65 e 85 °C, respectivamente). Diversos sítios de N-glicosilação foram detectados ao se analisar a sequência de aminoácidos desses organismos (Akca *et al.*, 2002). Por muito tempo a função da glicosilação em proteínas de camada S de metanogênicos não era entendida. No entanto, recentemente foi detectada uma maior densidade de glicosilação nessas proteínas de archaeas metanogênicas hipertermófilas, sugerindo um

papel na sobrevivência desses organismos em altas temperaturas (Wildgruber *et al.*, 1982; Zabel *et al.*, 1984; Meyer e Albers, 2013; Jarrell *et al.*, 2014). É interessante notar que apesar de apresentar similaridades às proteínas de camada S de outros organismos metanogênicos, a proteína de camada S de *M. jannaschii*, um organismo hipertermófilo, possui um discreto aumento em sua hidrofobicidade, o que talvez contribua com a estabilidade do arranjo cristalino em temperaturas altas (Jaenicke *et al.*, 1985).

Quanto à estrutura secundária de proteínas de camada S de metanogênicos, uma maior quantidade de folhas-beta foi observada em *Methanothermus fervidus* e *Methanothermus sociabilis* (Brockl *et al.*, 1991), quando comparados a organismos mesófilos (Baumeister *et al.*, 1982; Bingle *et al.*, 1985; Engelhardt *et al.*, 1986). Como essas estruturas proporcionam interações inter- e intramoleculares (Jaenicke, 1987), um estudo de Brockl *et al.* (1991) sugeriu que essa maior quantidade de folhas-beta poderia ter um papel na formação do arranjo cristalino da camada S em ambientes termófilos.

O envelope celular do organismo mesófilo *Methanosarcina acetivorans* despertou o interesse da comunidade científica desde a sua descrição. Quando em ambientes de água doce, agregados de quatro células são formados, sendo cada célula envolta por uma camada de metanocondroitina e uma camada S. No entanto, quando em ambientes marinhos, as células são encontradas isoladas e seu envelope é composto apenas por uma camada S (Sowers *et al.*, 1984; Sowers *et al.*, 1993; Kreisl e Kandler, 1986; Baumeister e Lembcke, 1992). Em *M. acetivorans* e *Methanosarcina mazei*, dois domínios de função desconhecida DUF1608 duplicados foram detectados nas suas proteínas de camada S (Francoleon *et al.*, 2009).

Apesar de apresentarem propriedades únicas e de alto interesse biotecnológico, são ainda escassos os modelos estruturais de proteínas de camada S. No que se refere ao domínio *Archaea*, o único estudo feito até o momento utilizou a proteína de *M. acetivorans* como modelo, resultando na determinação da estrutura do domínio DUF1608 (Arbing *et al.*, 2012). A proteína de camada S de *M. acetivorans* é composta por um peptídeo sinal, dois domínios DUF1608 duplicados e um domínio de ancoragem à membrana. A partir da determinação da estrutura do DUF1608, foi possível produzir um modelo funcional em que a formação do arranjo cristalino hexagonal pode ser observada. Além disso, os resultados obtidos nesse estudo indicam que a camada S de *M. acetivorans* é negativamente carregada e atua como uma barreira de tamanho e carga natural para a célula, restringindo o acesso molecular ao espaço periplasmático. É interessante apontar que foi detectada uma homologia estrutural entre o domínio DUF1608 dessa proteína de camada S e proteínas de envelope viral.

Com a exceção de espécies do gênero *Halococcus* e algumas linhagens de *Haloquadratum walsbyi*, a maioria das haloarchaeas apresentam apenas camada S como componente de parede celular. Quando comparadas às proteínas de camada S de organismos metanogênicos, as proteínas de haloarchaeas mostram-se mais homogêneas. Assim, é possível observar maior similaridade quanto às sequências de DNA e aminoácidos, além de maior comparabilidade do perfil de hidrofobicidade dessas proteínas. A proteína de camada S melhor estudada em archaeas halófilas é aquela de *Haloferax volcanii*, principalmente em relação às modificações pós-traducionais.

1.5. A proteína de camada S de *Haloferax volcanii*

A proteína de camada S de *H. volcanii* apresenta diversas similaridades com a de outros organismos halófilos, como o halófilo extremo *Halobacterium salinarum* (Trachtenberg *et al.*, 2000), apesar de haver menor similaridade de sequência na região N-terminal dessas duas proteínas, sendo possível haver diferenças estruturais mais significativas. Ao se analisar a estrutura primária da proteína é possível observar a presença de um peptídeo sinal de 34 aminoácidos, assim como um domínio de ancoragem à membrana próximo à porção C-terminal. Esse domínio é precedido por *clusters* de resíduos de Thr que sofrem O-glicosilação. Os *clusters* de Thr parecem desempenhar papel como elementos espaçadores entre o domínio de ancoragem à membrana e regiões mais distantes da proteína (Sumper *et al.*, 1990).

Reconstruções tridimensionais do envelope celular de *H. volcanii* (Kessel *et al.*, 1988) mostraram que a camada S está disposta em complexos de 12,5 nm de altura, sendo compostos por um domínio em forma de domo de 4,5 nm, seguido de um elemento espaçador O-glicosilado de 6,0 nm e um domínio globular pequeno de 2,0 nm, situado na face externa da membrana plasmática (Figura 9). Tendo em vista que a camada S é o único componente de envelope celular de *H. volcanii*, esse modelo sugere que esta atua como uma barreira molecular para a célula. Um estudo utilizando preparações de envelopes celulares de *H. volcanii* demonstrou que a estabilidade estrutural da camada S é dependente da concentração de NaCl e cátions divalentes (Cohen *et al.*, 1991), uma propriedade previamente observada em *H. salinarum* (Brown, 1964; StoECKenius e Rowen, 1967; Steensland e Larsen, 1969).

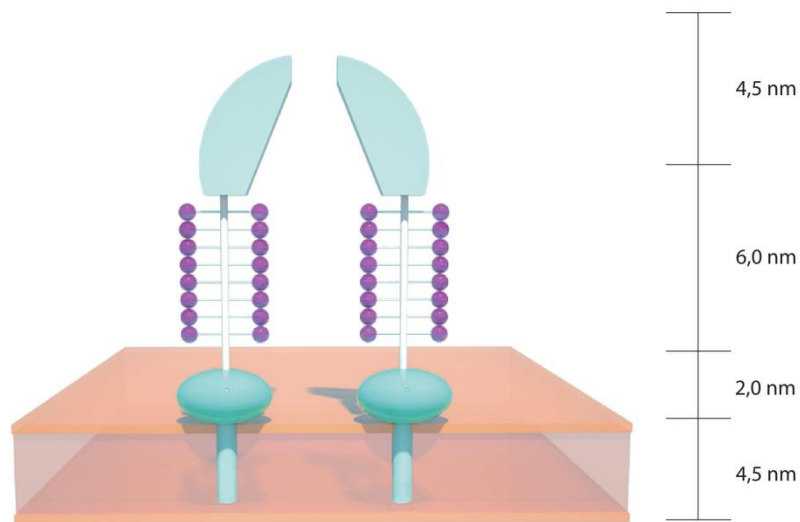


Figura 9. Estrutura em forma de domo da camada S de *Haloferax volcanii* disposta sobre a superfície celular (Rodrigues-Oliveira *et al.*, 2017).

Como mencionado anteriormente, a proteína de camada S de *H. volcanii* tem sido amplamente utilizada como modelo para estudos que abordam modificações pós-traducionais em *Archaea*, sendo o processo de N-glicosilação da proteína bastante detalhado. Um pentassacarídeo composto por uma molécula de hexose, um metil éster de ácido hexurônico, duas moléculas de ácido hexurônico e uma manose é ligado a determinados resíduos de Asn (Asn-13 e Asn-83) (Abu-Qarn *et al.*, 2007; Guan *et al.*, 2010; Magidovich *et al.*, 2010). As proteínas envolvidas no processo glicosilação foram identificadas (AglJ, AglG, AgII e AgIE) e adicionam os quatro primeiros sacarídeos a um carreador de dolicol fosfato (Guan *et al.*, 2010) enquanto a proteína AgID liga a manose final a um carreador de dolicol fosfato distinto (Abu-Qarn *et al.*, 2008; Yurist-Doutsch *et al.*, 2008; Kaminski *et al.*, 2010). AgIB transfere os primeiros quatro sacarídeos para a proteína de camada S (Abu-Qarn *et al.*, 2007). A manose final é transferida do outro carreador de dolicol fosfato para a proteína,

sendo esse processo dependente de AgIR e AgIS. AgIR inverte o carreador de dolicol fosfato ligado à manose e AgIS transfere a manose para a proteína (Figura 10) (Guan *et al.*, 2010; Calo *et al.*, 2011; Cohen-Rosenzweig *et al.*, 2012; Kaminski *et al.*, 2012; Jarrell *et al.*, 2014). É interessante ressaltar que a concentração salina no meio afeta o processo de *N*-glicosilação da proteína, havendo relatos na literatura de modificações desse processo no que diz respeito aos sítios de glicosilação e sacarídeos utilizados em resposta a variações de salinidade (Abu-Qarn *et al.*, 2007; Guan *et al.*, 2012).

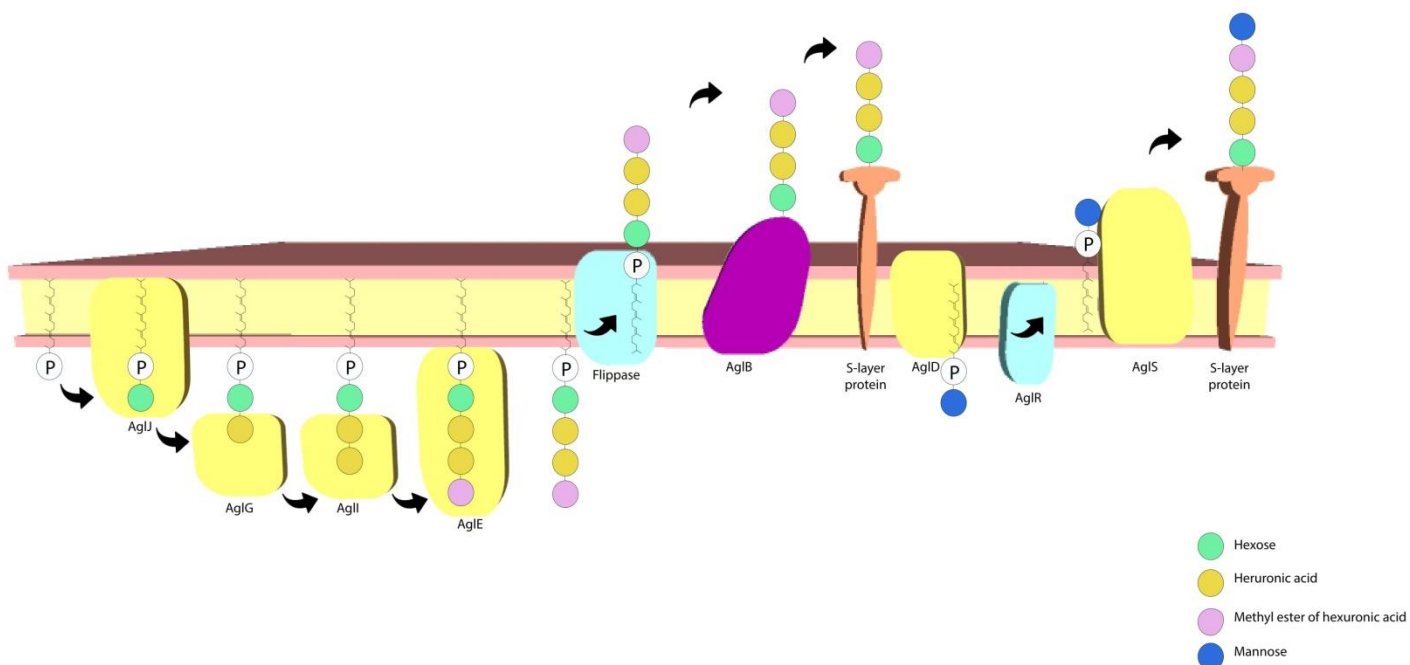


Figura 10. Esquema da via de *N*-glicosilação da proteína de camada S de *Haloferax volcanii* (Rodrigues-Oliveira *et al.*, 2017).

O processo de *N*-glicosilação do resíduo Asn-498 é um processo distinto, que depende de concentrações salinas mais baixas e envolve um tetrassacarídeo (Kaminski *et al.*, 2013). Além disso, células de *H. volcanii* apresentaram crescimento limitado em altas concentrações salinas quando houve deleção de genes envolvidos na via de *N*-glicosilação da proteína de

camada S (Abu-Qarn *et al.*, 2007). Isso indica que esse processo desempenha um papel importante na manutenção de um envelope celular estável em ambientes de alta salinidade.

Outras formas de modificações pós-traducionais foram descritas para a proteína de camada S de *H. volcanii*. A proteína passa por um processo de maturação que ocorre após sua translocação através da membrana plasmática e esse passo é dependente de íons de magnésio (Eichler, 2001). Durante esse processo, compostos lipídicos se ligam à porção C-terminal da proteína, um processo mediado por ácido mevalônico (Konrad e Eichler, 2002). Essas modificações geram duas populações de proteínas de camada S em *H. volcanii*: uma ancorada à membrana por intermédio de um domínio transmembrânico localizado na porção C-terminal da proteína e outra que sofre modificações lipídicas e está associada à membrana de maneira dependente de cátions divalentes (Sumper *et al.*, 1990; Kandiba *et al.*, 2013). Recentemente, foi demonstrado que nessa segunda população a região C-terminal da proteína é removida por uma archaeosortase (ArtA) e essa enzima age em um motivo de prolina-glicina-fenilalanina conservado (PGF), sendo as modificações lipídicas dependentes da ação de ArtA (Abdul-Halim *et al.*, 2015). Esses estudos contribuem para um melhor entendimento dos processos de modificações pós-traducionais de proteínas de camada S de *Archaea*.

1.6. Aplicações biotecnológicas de proteínas de camada S

Devido à propriedade intrínseca de auto-arranjo das proteínas S, estas possuem grande potencial de utilização em processos biotecnológicos. Até o momento, a grande maioria dos trabalhos que descrevem o potencial biotecnológico de proteínas de camada S foi realizada com proteínas de origem bacteriana, embora proteínas de *Archaea* venham recebendo maior atenção recentemente.

Uma interessante aplicação biotecnológica de proteínas de camadas S consiste na construção de membranas de ultrafiltração. Membranas de ultrafiltração baseadas em camadas S apresentam vantagens sobre outras membranas, devido à uniformidade dos poros quanto à forma e tamanho (Debabov, 2004). Já existem membranas de ultrafiltração construídas a partir de proteínas de camada S de *Bacillus stearothermophilus* e outras espécies do gênero *Bacillus* (Sara e Sleytr, 1987), cujos poros variam de 2 a 8 nm de diâmetro (Sleytr e Sara, 1987).

Tendo em vista a capacidade de arranjo cristalino de proteínas de camada S, haptenos ligados quimicamente a essas proteínas podem configurar vacinas com novas propriedades. De fato, existem estudos mostrando uma boa eficiência de carregamento de haptenos de baixa massa molecular, quando ligados a proteínas de camada S (Malcolm *et al.*, 1993). Em vacinas antitumorais, foi observado que haptenos como oligossacarídeos de mucina e antígenos T e Ley, associados a tumores epiteliais, não induziam uma resposta imune adequada quando injetados sozinhos. No entanto, quando ligados quimicamente à camada S de *Bacillus alevi*, *Bacillus stearothermophilus* e

Clostridium thermohygro sulfuricum foi possível observar uma ativação de macrófagos e linfócitos T contra células tumorais (Sleytr *et al.*, 1991).

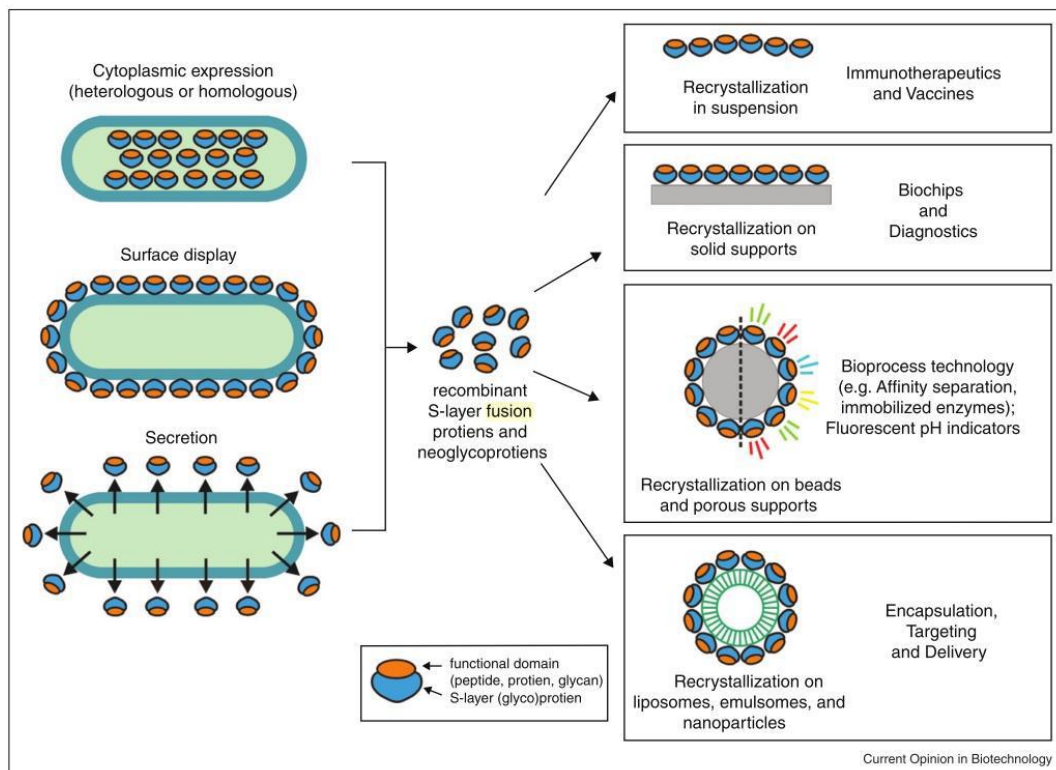


Figura 11. Diferentes estratégias para a obtenção de proteínas de camada S fusionadas a proteínas de interesse e suas possíveis aplicações em nanobiotecnologia. (Ilk *et al.*, 2011).

Abordagens genéticas expandem o potencial biotecnológico de proteínas de camada S, pois permitem a modificação das propriedades naturais dessas proteínas. No entanto, para que tais aplicações biotecnológicas tornem-se viáveis, as proteínas de camada S devem ser capazes de manter sua capacidade de auto-arranjo após a inserção ou fusão com proteínas ou domínios exógenos. Até o momento, as estratégias para a produção de proteínas de camada S geneticamente modificadas envolvem sua clonagem, expressão heteróloga e purificação em células hospedeiras, comumente *Escherichia coli* (Ilk *et al.*, 2011) (Figura 11). Estudos recentes descrevem a

obtenção de fusões gênicas onde foram produzidas proteínas de camada S híbridas a serem utilizadas em processos de sensoriamento e diagnóstico (Figura 12) (Egelseer et al., 2010), produção de vacinas conjugadas (Bohle et al., 2004) e construção de biomarcadores fluorescentes (Kainz et al., 2010).

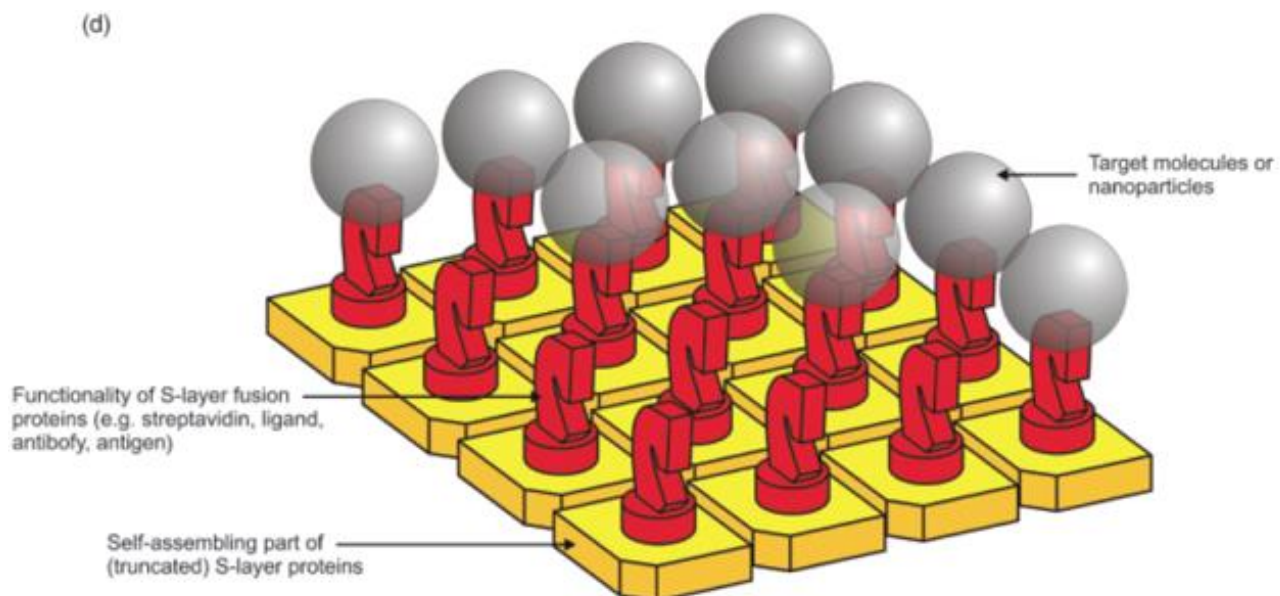


Figura 12. Esquema representando a obtenção de proteínas de camada S híbridas, fusionadas a produtos de interesse, para a detecção de moléculas alvo. (Sleytr et al., 2007).

1.7. Uso de proteínas de camada S para estabilização de membranas lipídicas

A importância de membranas celulares nos sistemas biológicos motivou a criação modelos que possibilitem o estudo e caracterização dessas estruturas. Camadas lipídicas immobilizadas em suportes sólidos representam uma das classes mais promissoras de modelos para membranas, de maneira a possibilitar a sua caracterização por diversas técnicas sensíveis a superfícies (Jackman et al., 2012; Schuster e Sleytr, 2014). Como a fixação de membranas lipídicas em superfícies sólidas tende a diminuir sua fluidez, uma camada

polimérica pode ser adicionada entre a membrana e o suporte sólido, a fim de otimizar tal sistema (Schindler, 1989; Sackmann, 1996). Como previamente mencionado, as subunidades da camada S tem a tendência de cristalização, inclusive quando associadas a bicamadas lipídicas, o que confere maior estabilidade a essas estruturas, sem perdas significativas de suas propriedades (Pum *et al.*, 1993). Dessa maneira, foi possível observar na literatura estudos em que proteínas de camada S de bactérias foram reconstruídas em bicamadas lipídicas (Schuster *et al.*, 1998), monocamadas fosfolipídicas (Wetzer *et al.*, 1998) e lipossomas (Kupcu *et al.*, 1995). Os resultados revelam que o uso de proteínas de camada S como suporte para membranas lipídicas possibilita a mimetização de propriedades fundamentais de membranas celulares, incluindo fluidez, propriedades eletroquímicas, incorporação de proteínas integrais de membrana, além de aumentar a longevidade do sistema (Schuster e Sleytr, 2014). Esses modelos de membranas consistem normalmente em uma monocamada lipídica do tipo tetraéter ou uma bicamada fosfolipídica artificial que substituem a membrana citoplasmática, onde proteínas de camada S isoladas são organizadas em arranjos monomoleculares ao longo da superfície lipídica (De Rosa, 1996; Nicolini, 1996; Gliozzi *et al.*, 2002; Schuster e Sleytr, 2014).

Proteínas integrais de membrana representam uma classe de proteínas importantes para o funcionamento celular. Além disso, são proteínas de grande interesse na indústria farmacêutica, tendo em vista que aproximadamente 60% dos 430 alvos de fármacos conhecidos são proteínas desta classe (Bleicher *et al.*, 2003; Ellis e Smith, 2004). No entanto, devido às dificuldades técnicas envolvidas no estudo dessas proteínas, membranas biomiméticas apoiadas em

proteínas de camada S consistem em modelos promissores por permitirem a reconstituição de proteínas de membrana nesses sistemas (Demarche *et al.*, 2011; Tiefenauer *et al.*, 2012; Shen *et al.*, 2013), como pode-se observar no esquema ilustrado na Figura 13.

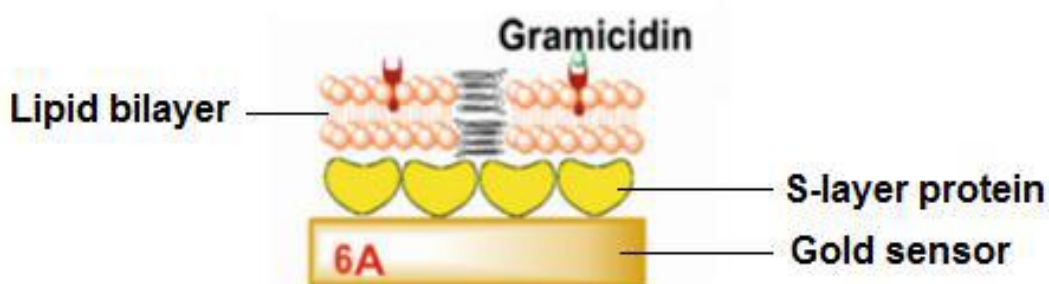


Figura 13. Ilustração de uma bicamada lipídica apoiada em proteínas de camada S, sobre um suporte sólido, em que foi possível observar a incorporação da proteína gramicidina na bicamada lipídica (Dammati *et al.*, 2015).

Lipossomas são sistemas esféricos, compostos por uma bicamada fosfolípídica e um cerne aquoso (Bangham *et al.*, 1965). Tais sistemas apresentam interesse médico devido ao fato de poderem ser usados como nano carreadores de fármacos para o tratamento de diferentes doenças (Andresen *et al.*, 2005; Vyas *et al.*, 2006). No entanto, essas estruturas apresentam baixa estabilidade e foi possível verificar-se que a presença de uma camada S aderida ao sistema estabilizou lipossomas em situações de estresse mecânico e térmico (Schuster e Sleytr, 2014). Dessa maneira, a aplicabilidade desses sistemas é de grande interesse, pois apesar de sua importância médica, lipossomas normalmente sofrem estresse durante o seu transporte pelo sistema vascular (Mader *et al.*, 1999).

É interessante notar que a presença da camada S como único componente do envelope celular é comum em archaeas (Alber e Meyer, 2011), de maneira que o desenvolvimento de modelos de membrana a partir do uso de proteínas de camada S sobre um suporte sólido constitui uma estratégia biomimética baseada na estrutura do envelope celular desses organismos (Schuster e Sleytr, 2009; Schuster e Sleytr, 2014; Damiati *et al.*, 2015). Apesar disso, até o momento todas as construções de modelos de plataformas lipídicas utilizando este princípio foram feitas utilizando-se proteínas de camada S de bactérias (Schuster e Sleytr, 2009).

1.8. Estudos aplicados utilizando proteínas de camada S de *Archaea*

Existem poucos estudos que descrevem aplicações de camada S de organismos do domínio *Archaea*. O estudo de maior visibilidade foi realizado com *Sulfolobus acidocaldarius* (Selenska-Pobell *et al.*, 2011). Nesse estudo, utilizaram a camada S desse organismo como modelo para a construção de nanopartículas de ouro (Au). As propriedades dessas nanopartículas apresentaram diferenças significativas em relação às produzidas utilizando a camada S de bactérias como molde. Foi possível observar um tamanho menor dessas nanopartículas (2,5 nm) em comparação ao normalmente encontrado em nanopartículas obtidas a partir de camada S de bactérias (4 nm). Além disso, as nanopartículas obtidas a partir de camada S dessa archaea apresentaram um forte caráter paramagnético. Assim, pode-se prever um grande potencial de aplicabilidade dessas proteínas, tendo em vista a importância de nanopartículas magnéticas no campo da biotecnologia (Pankhurst *et al.*, 2003; Ito *et al.*, 2005).

Como previamente mencionado, a maioria das archaeas caracterizadas até o momento apresenta camada S como parte integrante de seu envelope celular, sendo frequentemente o único componente de parede celular em algumas espécies (Albers e Meyer, 2011). O fato de muitas archaeas apresentarem apenas a camada S em sua superfície celular confere alto potencial biotecnológico a essas proteínas devido ao fato destas se encontrarem naturalmente ligadas a uma membrana lipídica. Assim, pode-se especular uma maior facilidade na construção de envelopes celulares miméticos, geração de plataformas lipídicas estáveis para reconstituição de proteínas de interesse, estabilização de lipossomas e construção de membranas de sensoriamento diagnóstico a partir da utilização destas proteínas de *Archaea* (Damiati *et al.*, 2015).

1.9. Justificativa

Como a literatura científica é escassa em relação aos estudos estruturais de proteínas de camada S de *Archaea* e tendo em vista a facilidade de cultivo da archaea halófila *Haloferax volcanii*, tal espécie foi escolhida como modelo de estudo nesse trabalho. Além disso, sua proteína de camada S encontra-se bastante caracterizada quanto à sua organização na superfície celular e às modificações pós traducionais sofridas. Por outro lado, não existem estudos caracterizando a sua estrutura secundária e terciária. Assim, o presente estudo teve como objetivo principal a caracterização estrutural de proteínas de camada S da archaea *Haloferax volcanii*, seu potencial uso na construção de envelopes celulares biomiméticos, bem como a obtenção de fusões gênicas produzidas a partir do gene da proteína S de *H. volcanii* ligado a genes de interesse.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

- Caracterização estrutural de proteínas de camada S de *Haloferox volcanii* e sua utilização na construção de envelopes celulares biomiméticos.

2.2. Objetivos específicos

- Isolamento e purificação de proteínas de camada S diretamente a partir de culturas de *H. volcanii*.
- Obtenção e caracterização do gene codificador da proteína de camada S de *H. volcanii* por meio de Reações de Polimerização em Cadeia (PCR).
- Isolamento e purificação de proteínas de camada S obtidas por expressão heteróloga em células de *E. coli*.
- Caracterização das estruturas secundária e terciária das proteínas de camada S obtidas.
- Caracterização do processo de auto-arranjo das proteínas obtidas, sob diferentes condições físico-químicas.
- Construção de sistemas de membranas lipídicas estabilizados por proteínas de camada S de *H. volcanii*.

3. Materiais e Métodos

3.1. Cultivo e manutenção das células de *Haloferax volcanii*

Células liofilizadas da linhagem DS2 de *H. volcanii* foram gentilmente cedidas pelo banco de culturas da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) para a realização desse trabalho. O cultivo foi feito em meio *Halobacterium* (ATCC 974, Tabela 1) líquido e as culturas foram mantidas por 48 horas a 37°C. Estas foram, em seguida, mantidas à temperatura ambiente, conforme descrito por Dyll-Smith *et al.*, 2008, sendo repicadas mensalmente.

Tabela 1. Componentes do meio de cultura *Halobacterium* (ATCC 974)

NaCl	12,50 g
MgCl ₂ •6H ₂ O	5,00 g
K ₂ SO ₄	0,50 g
CaCl ₂ •6H ₂ O	0,02 g
Triptona	0,50 g
Extrato de Levedura	0,50 g
H ₂ O qsp	100,00 mL

Ajustar pH para 6,8 e esterilizar em autoclave.

3.2. Extração de DNA total de *Haloferax volcanii*

O DNA foi extraído por lise osmótica. Células de *H. volcanii* necessitam de altas concentrações de sal para o crescimento, de maneira que a adição de água destilada causa a sua lise. Assim, 1 mL da cultura foi centrifugado por 1 minuto a 12000 x g, 4 °C. Em seguida, o sedimento de células foi ressuspensão em 400 µL de água destilada e as células foram mantidas a 68°C por 10 minutos, para inativar as nucleases.

3.3. Ensaios de PCR para amplificação do gene da proteína de camada S de *Haloferax volcanii*

Baseado no genome completo de *H. volcanii* (número de acesso: CP001956.1), foram desenhados iniciadores (HvoSLFor 5'– ATG ACA AAG CTC AAA GAT CAA ACG CG -3'; HvoSLRev 5'-TTA GTT CTC GCG GCG GAG TG -3') visando a amplificação do gene completo da proteína de camada S desse organismo por PCR. Após ensaios prévios empregando-se um com gradiente de temperatura e testes com diferentes concentrações de DNA, os ensaios de PCR foram realizados de acordo com as seguintes condições: 1x de tampão de reação (Invitrogen), 2.0 mM de MgCl₂, 0.5 μM de cada iniciador, 200 μM de dNTPs, 400 ng/mL de BSA (Soroalbumina bovina) e 1.5 U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen) em sistemas de 50 μL e 20 ng de DNA total. As condições de ciclagem consistiram em uma desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos onde houve: desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento dos iniciadores a 57°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 2 minutos. Em seguida foi feita a extensão final a 72°C por 5 minutos.

3.4. Purificação dos amplicons obtidos e clonagem no vetor pGEM T easy®

Os fragmentos de 2484 pb amplificados nos ensaios de PCR foram purificados utilizando-se o kit QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen), conforme as instruções do fabricante. Após a purificação, os fragmentos foram ligados ao vetor pGEMT-Easy® (Promega), novamente conforme as instruções do fabricante. O sistema de ligação foi mantido por 1 hora à temperatura ambiente e em seguida armazenado a 10°C por uma noite.

3.5. Preparo de células competentes de *Escherichia coli* DH5α e transformação por choque térmico

Foi feito um pré-inóculo de *E. coli* DH5α em 5 mL de meio LB (triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%) e incubado a 37 °C por uma noite. Um volume de 300 µL desta cultura foi transferido para um frasco Erlenmeyer contendo 30 mL de meio LB, sendo então incubado a 37 °C sob agitação (220 rpm) até atingir a densidade óptica (OD₆₀₀) de 0,2 a 0,3. Em seguida, a cultura foi centrifugada a 1250 g, por 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de células ressuspensas em 15 mL de cloreto de cálcio (CaCl₂) 100 mM gelado. As células ressuspensas foram incubadas em gelo por 20 a 30 minutos e então centrifugadas a 310 g, por 10 minutos, a 4°C. O sedimento de células foi ressuspensas em 1 mL de CaCl₂ 100 mM gelado e incubadas em gelo por um período mínimo de 1 hora. Alíquotas de 100 µL dessas células foram misturadas a volumes de 5 a 10 µL dos sistemas de ligação e incubadas em gelo por 30 minutos. Após este período, procedeu-se ao choque térmico, por meio de incubação dos sistemas de transformação em banho a 37 °C por 5 minutos. Ao final desse tempo, foi adicionado 1 mL de meio LB a cada sistema, sendo estes incubados a 37 °C por 1 hora. Assim como na transformação por eletroporação, alíquotas de 25 a 200 µL do sistema de transformação foram inoculadas em placas contendo meio LB ágar (1,5%) suplementado com IPTG (0,5 mM), Xgal (0,00625%) e ampicilina (150 µg/mL). A semeadura foi feita por espalhamento, utilizando-se pérolas de vidro estéreis, sendo as placas incubadas em uma estufa a 37 °C por 16 a 24 horas.

3.6. Seleção de clones recombinantes e estocagem

Os clones recombinantes foram selecionados com palitos estéreis e incubados a 37 °C por uma noite em 5 mL de meio LB contendo 150 µg/mL de ampicilina. Após a incubação, alíquotas das culturas foram estocadas a -20°C em frascos contendo glicerol 35%.

3.7. Extração de DNA plasmidial

Alíquotas dos clones recombinantes foram inoculados em 5 mL de meio LB com ampicilina (150 µg/ml) e incubados a 37°C por uma noite. A cultura foi então transferida para um tubo tipo eppendorf e centrifugada a 3500 g por 5 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o mesmo procedimento foi repetido por duas vezes, no intuito de se obter um sedimento com maior quantidade de células. O sedimento de células foi então ressuspense em 100 µL de solução I (50 mM de glicose, 25 mM de tampão Tris-HCl, pH 8,0 e 10 mM de EDTA) e mantido à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 200 µL de solução II (0,2 M de NaOH, 1% SDS), preparada na hora do uso. Após a homogeneização suave, o sistema foi incubado em gelo por 5 minutos. Ao fim desse tempo, foram adicionados 150 µL da solução III (acetato de potássio 3 M, ácido acético glacial 2 M, pH 4,8). Novamente foi feita a homogeneização suave das soluções e incubação em gelo por 5 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 12000 g por 5 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo tipo eppendorf, quando foram adicionados 6 µL de RNase A (20 mg/mL), sendo os tubos incubados a 37°C por 1 a 2 horas. Após esse tempo, foi adicionado 1 volume (400 µL) de clorofane (25 fenol:24 clorofórmio:1 álcool iso-amílico) e os tubos centrifugados

a 7000 g por 3 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde ocorreu adição de 2,5 a 3 volumes de etanol 100% gelado. Os tubos foram mantidos por uma noite a -20°C. Em seguida, estes foram centrifugados a 12000 g por 5 minutos a 4°C, o etanol 100% descartado, adicionando-se então 300 µL de etanol 70% gelado. Os tubos foram centrifugados novamente sob as mesmas condições e o etanol 70% foi descartado. Os tubos foram então invertidos e mantidos à temperatura ambiente para secar. O DNA sedimentado foi ressuspensão em 50 µL de H₂O milli-Q e armazenado em um freezer a -20°C. A qualidade e concentração dos DNAs plasmidiais foram analisadas por meio de eletroforese em gel de agarose.

3.8. Sequenciamento de DNA

O sequenciamento dos fragmentos amplificados presentes nos plasmídeos recombinantes foi feito pelo método de Sanger utilizando-se os serviços da empresa Macrogen Inc. (Coreia do Sul).

3.9. Análise de sequências

A qualidade das sequências de DNA obtidas foi verificada por meio do algoritmo PHRED (Ewing 1998), sendo selecionadas sequências com valor de PHRED acima de 31 em 400 nucleotídeos. As sequências que apresentaram qualidade satisfatória foram então submetidas a análises comparativas com o banco de dados não redundante *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), utilizando-se a ferramenta Blast (Altschul *et al.*, 1990). O programa BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) foi utilizado para gerar

gráficos de perfil de hidrofobicidade de Kyte e Doolittle a partir da sequência predita de aminoácidos da proteína, além da sua massa molecular estimada.

3.10. Digestão, ligação dos fragmentos ao vetor de expressão e transformação

Após a confirmação da identidade dos fragmentos amplificados como o gene completo codificador da proteína de camada S de *H. volcanii*, os plasmídeos recombinantes (pGEMT-Easy) foram digeridos com a enzima de restrição *NotI* a fim de liberar um fragmento de DNA contendo o gene completo, visando sua ligação no vetor de expressão pET28a, também digerido com a mesma endonuclease. A enzima T4 DNA ligase foi utilizada para ligar o gene da proteína de camada S ao vetor de expressão, o qual foi então transformado em células de *E. coli*, linhagem BL 21 (DE3) pLysS, de acordo com o protocolo descrito anteriormente, com as seguintes modificações: não houve a adição de X-gal e IPTG ao meio de cultura e canamicina (50 µg/ml) foi adicionada de maneira a substituir a ampicilina.

3.11. Triagem dos clones recombinantes para indução da expressão

Após a seleção de clones recombinantes contendo o vetor de expressão, o DNA plasmidial foi extraído conforme descrito anteriormente, e utilizado como molde para novos ensaios de PCR utilizando-se iniciadores específicos para o gene da proteína de camada S. O DNA plasmidial dos clones que apresentaram amplificação nesses ensaios de PCR foi então digerido com a enzima de restrição *SacI* para verificar se o gene de interesse havia sido clonado na orientação correta para sua tradução.

3.12. Indução da expressão do gene codificador da proteína de camada S de *H. volcanii* em células de *E. coli*

Após a seleção de clones contendo o vetor de expressão com o gene que codifica a proteína de camada S na orientação certa, foi feita então a indução sua expressão, como descrito a seguir. Uma colônia foi inoculada em um frasco contendo 50 mL de meio LB suplementado com canamicina (50 µg/ml). Em seguida, a cultura foi incubada a 37 °C sob agitação de 200 rpm até que uma densidade óptica (OD₆₀₀) de 0,6 foi atingida. Uma alíquota de 1 mL de cultura foi separada e, em seguida, foi adicionado ao frasco 0,25 mM de IPTG para a indução da expressão do gene. As células foram incubadas por mais 3 horas, com a coleta de alíquotas em intervalos regulares. As alíquotas foram centrifugadas a 12000 g por 5 minutos e as células foram então ressuspensas em 100 µL de tampão de amostra (1 x) para SDS-PAGE [Tris-HCl 125 mmol/L, pH 6,8; SDS 2,0% (v/v); azul de bromofenol 0,05% (m/v); glicerol 20% (v/v) e β-mercaptoetanol 5,0% (v/v)].

3.13. Extração das proteínas de camada S a partir da cultura de *H. volcanii*

As proteínas de camada S de *H. volcanii* foram extraídas diretamente das células em cultura a partir da adaptação do protocolo descrito por Sumper *et al.*, 1990. Frascos contendo 400 mL de cultura foram centrifugados por 30 minutos a 7000 x g, 4°C. As células foram então resuspendidas em 50 mL de uma solução contendo as mesmas concentrações molares dos sais presentes no meio de cultura (150 mM Mg²⁺). EDTA 0,5 M pH 6,8 foi então adicionado, de forma a atingir uma concentração molar final igual a de íons Mg²⁺ presentes na

solução de sais. Os frascos foram então incubados por 30 minutos a 37°C sob agitação (120 rpm). Os esferoplastos foram então removidos por três centrifugações consecutivas a 4°C: 3000 x *g* por 15 minutos, 7000 x *g* por 5 minutos e 13000 x *g* por 10 minutos. O sobrenadante contendo as proteínas de camada S foi então coletado, filtrado e concentrado em membranas de 50 kDa (Amicon®), por meio de centrifugações a 5700 x *g*, 20 °C, até que o volume final do sobrenadante coletado fosse 1,5 mL.

3.14. Quantificação de proteínas

A quantificação das amostras de proteínas foi feita por ensaios de Bradford (Bradford, 1976) por meio do kit Quick Start™ Bradford Protein Assay (Bio-Rad), além de mensurações de absorvância a 280 nm, em espectrofotômetro.

3.15. Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE)

Suspensões da extração de proteínas de camada S de *H. volcanii* foram previamente precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) 10% (v/v), sendo incubadas a 4°C por 30 minutos. Em seguida foram centrifugadas por 15 minutos a 12000 x *g*, 4°C. Foram feitas então duas lavagem do sedimento com acetona 100% refrigerada, sendo os sistemas centrifugados sob as mesmas condições, e os tubos foram invertidos a temperatura ambiente até secarem. As amostras foram então ressuspensas em 20 µL de tampão de amostra para SDS-PAGE. A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida 12%, conforme descrito por Sambrook e Russell, 2006.

3.16. Preparo de células-fantasma de *H. volcanii*

Culturas de *H. volcanii* foram crescidas até o fim da fase exponencial do crescimento ($OD_{600} = 0,5$) e então sua parede celular foi isolada conforme o protocolo de preparo de células-fantasma (do inglês “ghost-cells”) descrito por Kessel *et al.*, 1988. Depois de centrifugadas e o sobrenadante contendo o meio de cultura descartado, as células foram ressuspensas no mesmo volume da cultura inicial em uma solução de sais com as seguintes concentrações: 2,14 M NaCl e 250 mM $MgCl_2$. A suspensão foi congelada em nitrogênio líquido e deixada descongelar à temperatura ambiente. Em seguida, foi feito o tratamento com DNase (10 $\mu g/mL$) por uma hora a 37°C. A suspensão foi então centrifugada por 30 segundos a 14.000 x *g*, o sobrenadante coletado e submetido a uma nova centrifugação por 7 minutos, sob as mesmas condições. O sedimento de células-fantasma resultante foi ressuspensão no mesmo volume em diferentes soluções de sais, contendo os íons $CaCl_2$ (1 e 10 mM), $MgCl_2$ (250 mM) e NaCl (2,14 M), pH 6,8.

3.17. Microscopia Eletrônica de Transmissão

As amostras foram depositadas em *grids* de cobre cobertas por piroloformo por 1 minuto. Para a sua análise por contrastação negativa, foi feita a sua fixação utilizando-se glutaraldeído 2,5% por 5 minutos e as amostras foram coradas com acetato de uranila por 45 segundos. A análise foi feita em um microscópio eletrônico de transmissão operando a 160 kV.

3.18. Ultracentrifugação Analítica

As proteínas obtidas ($A_{280} = 0,250$) foram submetidas a procedimentos de Ultracentrifugação Analítica, uma metodologia em que há um

espectrofotômetro acoplado à ultracentrífuga. As amostras foram centrifugadas em cubetas de quartzo a 42000 rpm (rotor An-60 Ti Beckman Coulter®) a 20°C. Durante o processo de centrifugação foram realizadas 200 mensurações de absorvância a 280 nm em intervalos regulares de 5 minutos ao longo do comprimento da cubeta. Os dados gerados foram analisados utilizando-se os programas SEDFIT e SEDPHAT.

3.19. Análise da estrutura secundária por dicroísmo circular

A estrutura secundária da proteína de camada S de *H. volcanii* foi analisada por meio de Dicroísmo Circular (CD) em um espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco Corporation, Tokyo, Japan), equipado com um sistema de controle de temperatura Peltier (Analytical Instruments, Japan). Os espectros foram obtidos em cubeta de 0,1 cm a 25°C. Os ensaios de análise da estrutura em diferentes valores de pH foram realizados empregando-se a proteína purificada na concentração de 0,32 mg/mL. Os tampões utilizados nos ensaios foram acetato de sódio (2 mM) pH 4,0; Tris-HCl (2 mM) pH 7,0 e 8,5. Nos ensaios de interação com íons e sais, a proteína (0,13 mg/mL) foi incubada na presença de CaCl₂ (1 e 10 mM), MgCl₂ (250 mM) e NaCl (2,14 M), pH 6,8. Os espectros obtidos na região distante do UV foram corrigidos pela subtração da contribuição dos tampões. As elipticidades obtidas foram convertidas em elipticidade molar ([θ]) (grau.cm².dmol⁻¹) com base na massa calculada por resíduo de 115 Da. A interferência do pH, íons e da temperatura na estrutura secundária foi estimada a partir dos espectros ajustados utilizando o programa CD Spectra Deconvolution Vs 2.1 CDNN.

As curvas de termoestabilidade foram obtidas em 218 nm para os pHs 4,0 e 7,0 com variação de temperatura de 25 a 95°C a cada 0,2°C/min. Concomitantemente, espectros na região distante do ultravioleta (190-260 nm), com intervalos de 10°C, foram registrados. As curvas de desnaturação térmica foram obtidas considerando os valores de elipticidade molar ($[\theta]$) versus temperatura (Pace *et al.*, 1989).

3.20. Análise da estrutura terciária por espectroscopia de fluorescência

As medidas de fluorescência foram realizadas em um Espectrofluorímetro Jasco FP-650 (Jasco Corporation, Tokyo, Japan) acoplado a um controlador de temperatura do tipo Peltier (Jasco Analytical Instruments, Japan). Modificações conformacionais da proteína (0,032 mg/mL) foram analisadas em diferentes pHs, utilizando-se os tampões acetato de sódio 10 mM com pH variando de 3,5 a 5,5 e Tris-HCl com pH de 6,0 a 9,0 com intervalo de 0,5. Para os ensaios de interação com íons, a proteína (0,043 mg/mL) ressuspensa em água foi incubada na presença de CaCl₂ (1 e 10 mM), MgCl₂ (250 mM) e NaCl (2,14 M), pH 6,8. Os espectros foram obtidos na faixa de 300-400 nm, após a excitação em 295 nm a 25°C, mantendo os *slits* de excitação e emissão em 5 nm.

3.21. Análise da tendência à oligomerização por espalhamento de luz dinâmico (ELD)

A proteína purificada (0,320 mg/mL) foi analisada em valores de pH entre 5,0 e 9,0 por ELD, 25°C. Para essa análise, foram utilizados os tampões acetato de sódio 10 mM (pH 5,0) e Tris HCl 10 mM (pH 6,0-9,0). As medidas

foram realizadas no ZetaSizer Nano (Malvern Instruments Limited, Worcestershire, United Kingdom), nas temperaturas de 20-45°C, com intervalos de 5°C. Nos ensaios onde houve variação da temperatura, o tampão utilizado foi TrisHCl 10 mM pH 7,0. A influência do pH e da temperatura na estrutura da proteína em solução foi avaliada a partir dos parâmetros obtidos, como massa molecular, diâmetro hidrodinâmico (Dh) e polidispersividade (Pd). As formas oligoméricas foram definidas a partir dos valores da Pd e Dh.

3.22. Langmuir-Blodgett

Monocamadas fosfolípídicas foram produzidas utilizando-se os seguintes lipídeos: 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPPE), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC) e 2,3-di-O-fetil-sn-glicero-fosfoetanolamina (DphPE). O DPPE é um lipídeo comumente encontrado em membranas celulares de diversos mamíferos (Myller *et al.*, 2010), enquanto o DPPC é muito utilizado em estudos de membranas celulares, podendo ser encontrado entre os surfactantes pulmonares (Albon, 1978). Já o DphPE é um fosfolípideo comumente encontrado na membrana plasmática de *Archaea* (Nishimura *et al.*, 2006). As monocamadas foram produzidas ao se espalhar os lipídeos (solubilizados em clorofórmio) na superfície de uma solução aquosa (TrisHCl 500 µM pH 7,0 + CaCl₂ 10 mM), havendo compressão (10 cm²/min) por uma barreira de teflon até se obter uma pressão de superfície inicial de em torno de 15 mN/m. O equipamento Langmuir utilizado (611, NIMA, Coventry, Inglaterra) é equipado com um medidor de pressão de superfície. A solução de proteínas de camada S de *H. volcanii* (1 mL a A₂₈₀=0,145, solubilizada em água Milli-Q)

foi adicionada à fase aquosa e o aumento na pressão de superfície foi registrado por 2 horas a intervalos de 30 minutos.

4. Resultados e Discussão

4.1. Isolamento do gene que codifica a proteína de camada S de *Haloferox volcanii* e sua expressão em *Escherichia coli*

4.1.1. Extração de DNA total de *H. volcanii*

A extração de DNA total realizada a partir da lise osmótica de células de *Haloferax volcanii* resultou em uma preparação de DNA de alta qualidade, com discreto grau de degradação (Figura 14). Além disso, foi possível obter quantidade suficiente de DNA para a realização dos ensaios de PCR subsequentes.

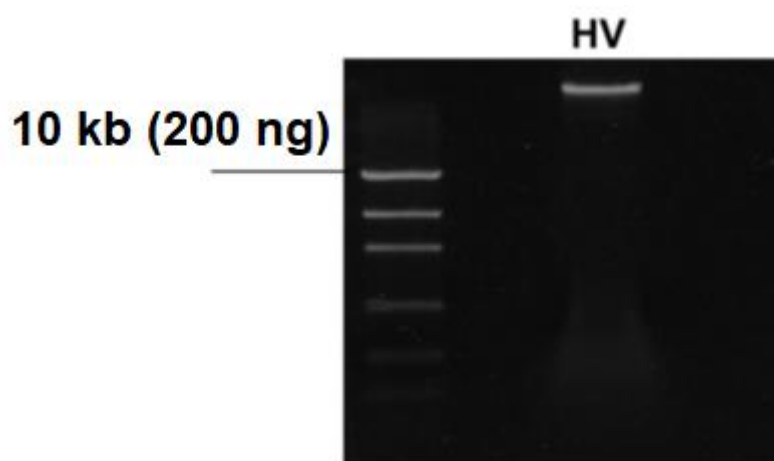


Figura 14. Perfil eletroforético em gel de agarose 1% da amostra de DNA total extraído a partir da cultura de células de *Haloferax volcanii* por lise osmótica, conforme descrito por Dyll-Smith *et al.*, 2008. Marcador de massa molecular *High DNA Mass Ladder* (Invitrogen).

4.1.2. Ensaios de PCR para amplificação do gene da proteína de camada S de *Haloferax volcanii*

Os ensaios de PCR utilizando os iniciadores HvoSLFor e HvoSLRev, específicos para o gene codificador da proteína de camada S de *H. volcanii* completo resultaram na amplificação de fragmentos do tamanho esperado (2484 pb) em diferentes temperaturas de pareamento dos iniciadores, como ilustrado na Figura 15. No entanto é possível observar a presença de um segundo produto de amplificação, de tamanho menor (aproximadamente 700

pb), indicando a ocorrência de amplificação inespecífica de segmentos de DNA a partir do DNA total de *H. volcanii*.

Devido à amplificação de um produto inespecífico, o fragmento de DNA de interesse foi purificado a partir de sua excisão do gel com o kit QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen). Em seguida os fragmentos amplificados foram ligados ao vetor de clonagem pGEM T Easy® (Promega).

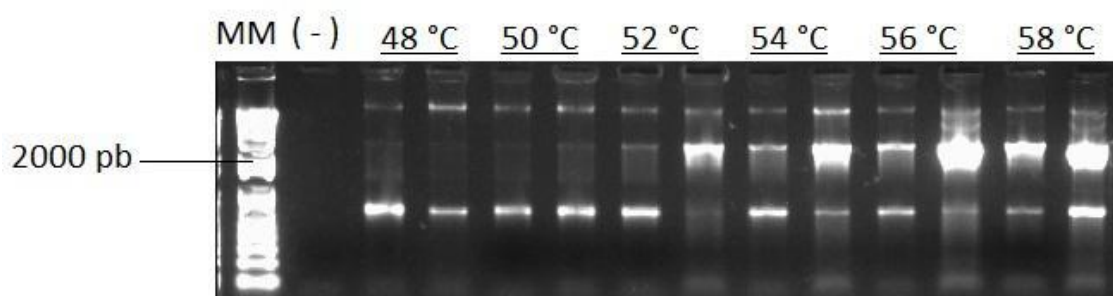


Figura 15. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio contendo produtos de PCR amplificados com os iniciadores HvoSLFor e HvoSLRev utilizando-se o DNA de *Haloferax volcanii* como molde. MM: marcador de massa molecular *1 kb plus ladder* (Invitrogen); (-): controle negativo: sistema de PCR onde foi adicionada água em substituição ao DNA; 48°C-58°C: diferentes temperaturas de pareamento dos iniciadores testadas para a otimização do ensaio de PCR.

4.1.3. Transformação de células de *Escherichia coli* DH5α

Após a ligação dos fragmentos de DNA obtidos nos ensaios de PCR ao vetor pGEM T easy® (Promega), células de *E. coli* DH5α foram transformadas por meio de choque térmico. Após o sistema de transformação ser semeado em placas contendo LB ágar suplementado com Xgal, IPTG e ampicilina, seguido de incubação por uma noite a 37°C, foi possível observar o crescimento de vinte e quatro colônias transformantes. Os clones recombinantes foram selecionados, estocados e tiveram seu DNA plasmidial

extraído, o qual foi então submetido a sequenciamento automático por método de Sanger.

4.1.4. Sequenciamento e análise da qualidade das sequências de DNA

O DNA plasmidial dos 24 clones recombinantes foi submetido ao sequenciamento automático, empregando-se o iniciador universal T7. Das 24 sequências obtidas, 13 apresentaram valores de Phred (Ewing *et al.*, 1998) superiores a 31 em mais de 400 nucleotídeos, sendo que as 11 restantes foram descartadas. Após análises comparativas com o banco de dados não redundante do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), seis sequências apresentaram identidade de 100% com o gene que codifica a proteína de camada S de *Haloferax volcanii*. Vale ainda mencionar que como os iniciadores utilizados no ensaio de PCR foram desenhados de modo a conter as sequências relativas aos códons de iniciação e terminação da tradução da proteína de camada S de *H. volcanii*, estas foram detectadas nas extremidades das seis sequências que exibiram 100% de identidade com o gene alvo, de maneira que a partir do sequenciamento com o iniciador universal T7 três sequências apresentaram o códon ATG na sua extremidade 5' e três o códon TAA.

Curiosamente, as outras sete sequências obtidas apresentaram identidade com um trecho do plasmídeo pHV4 de *H. volcanii*, indicando que os iniciadores propiciaram a amplificação de sequências de DNA distintas daquela desejada. Assim, embora os iniciadores tenham permitido a amplificação do

gene de interesse, estes deverão ser otimizados, a fim de minimizar a possibilidade de ampliações inespecíficas em experimentos futuros.

Como as sequências amplificadas foram ligadas ao vetor pGEMT-Easy, utilizado apenas para a clonagem, um dos clones recombinantes contendo a sequência relativa ao gene da proteína de camada S e cuja sequência possuía na extremidade 5' o códon de iniciação da tradução – ATG - foi selecionado para ser submetido à digestão com endonucleases de restrição, a fim de liberar o inserto para sua posterior clonagem no vetor de expressão pET 28a(+).

4.1.5. Transformação de células de *E. coli* BL 21 (DE3) pLysS com o vetor de expressão pET 28a(+) e seleção de clones para expressão heteróloga

Após a clonagem do fragmento de interesse ao vetor de expressão pET 28a(+), a construção foi transformada em células de *E. coli* BL 21 (DE3) pLysS. Foram obtidos 134 clones recombinantes, os quais foram submetidos a ensaios de PCR utilizando-se iniciadores para o gene da proteína de camada S de *H. volcanii*. Os clones que apresentaram amplificação com estes iniciadores tiveram então o seu DNA plasmidial extraído e digerido com a enzima *SacI*, de maneira a se verificar a orientação do inserto. Dessa maneira, o clone S60 foi selecionado para experimentos de indução da expressão gênica por apresentar o fragmento de interesse na orientação correta.

4.1.6. Indução da expressão do gene que codifica a proteína de camada S de *Haloferax volcanii* em células de *E. coli* BL 21 (DE3) pLysS

O DNA plasmidial do clone S60 foi extraído e utilizado em uma nova transformação, onde as células foram semeadas em placas de Petri com meio LB contendo canamicina (50 µg/mL). No entanto, uma alíquota das células foi semeada em meios contendo 0,5 mM de IPTG (Figura 16a), o qual foi utilizado como indutor da expressão, e outra em placas sem IPTG (Figura 16b).

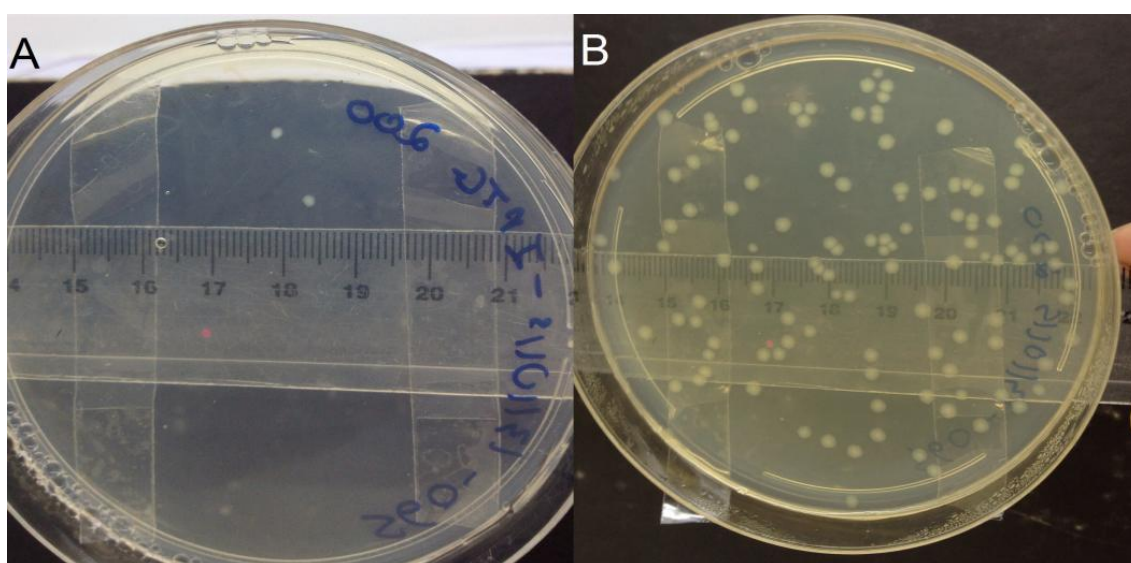


Figura 16. Cultivo de células do clone S60 em ágar LB contendo canamicina (50 µg/mL) com a presença de IPTG (a) ou sem o mesmo (b).

Na figura 16, é possível observar que houve uma notável diferença no crescimento dos clones em ambas as condições. Quando as células foram inoculadas em meio contendo o indutor de expressão (IPTG) desde o momento inicial, o número de colônias observado foi significativamente inferior àquele observado no meio sem o indutor. Esses resultados sugerem que a proteína provavelmente estava sendo expressa, mas exibindo algum efeito tóxico à célula bacteriana. Essa toxicidade poderia ser devido à quantidade de proteínas expressas pelas células ou devido à natureza físico-química da

proteína. Em geral, as condições iônicas intracelulares de organismos halófilos são bastante distintas daquelas de outros organismos, apresentando uma alta concentração citoplasmática de íons de potássio (Ginzburg *et al.*, 1970; Oren, 1999). Nessas condições, as proteínas desses organismos comumente apresentam ponto isoelétrico ácido e são ricas em aminoácidos negativamente carregados expostos (Ng *et al.*, 2000; Kennedy *et al.*, 2001; Baliga *et al.*, 2004), o que impede a sua precipitação no ambiente intracelular (Mevarech *et al.*, 2000). Assim, tendo em vista que a proteína de camada S de *H. volcanii* apresenta algumas dessas características (Sumper *et al.*, 1990), sua expressão em um organismo com condições intracelulares distintas poderia ter sido prejudicial ao seu funcionamento celular, causando sua morte.

As células provenientes da semeadura em placas sem IPTG foram inoculadas em meio LB líquido contendo canamicina (50 µg/mL) a 37°C até a cultura atingir o fim da fase exponencial de crescimento ($OD_{600}=0,6-0,8$). Neste momento foi adicionado IPTG na concentração de 250 µM, sendo as células incubadas por mais 3 horas. Alíquotas foram recolhidas antes da adição de IPTG e em intervalos de 30 minutos, 1 hora, e 3 horas de crescimento. As células dessas alíquotas foram então resuspendidas em tampão de amostra para SDS-PAGE e submetidas à eletroforese, sendo o perfil das proteínas obtidas ilustrado na Figura 17.

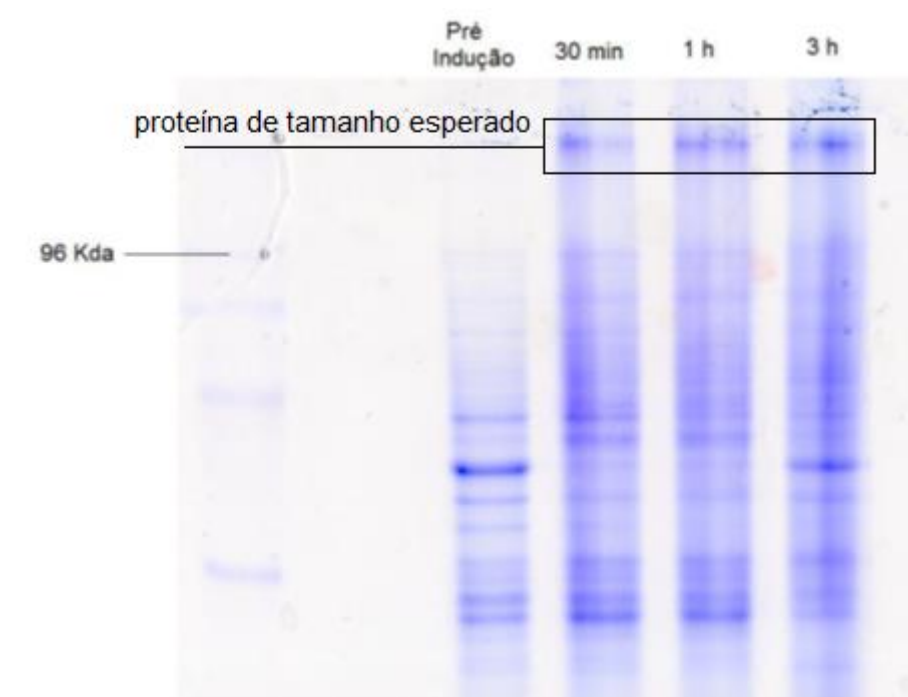


Figura 17. Gel de poliacrilamida corado com *Coomassie Blue* revelando o perfil proteico de células lisadas do clone S60 antes da adição de IPTG e em diferentes intervalos após a sua adição.

Foi possível observar o surgimento de uma banda de alta massa molecular, compatível com aquela observada em preparos de SDS-PAGE de proteínas extraídas a partir da cultura de *H. volcanii* (Sumper *et al.*, 1990), nos tempos de 30 minutos, 1 hora e 3 horas após a adição de IPTG. A massa prevista dessa proteína é de 85,18 kDa. No entanto, existem relatos na literatura indicando que essa proteína apresenta padrão migratório distinto daquele de peptídeos presentes na maioria dos marcadores de massa molecular, resultando em uma superestimação de sua massa (Lechner e Sumper, 1987; Sumper *et al.*, 1990).

Tal resultado indica que a construção genética foi bem sucedida, uma vez que as células de *E. coli* estavam expressando uma proteína cuja massa molecular estava de acordo com o esperado. Vale ressaltar que não existem

estudos visando à aplicação biotecnológica de fusões gênicas utilizando-se proteínas de camada S de archaeas (Schuster e Sleytr, 2009), de maneira que este resultado apresenta um interessante potencial nessa área de pesquisa.

Por outro lado, não foi possível, até o presente momento, purificar a proteína de camada S de *H. volcanii* produzida por expressão heteróloga, uma vez que os clones recombinantes deixavam de expressá-la após os primeiros repiques destes em meios artificiais. Tal resultado está de acordo com outros relatos da literatura, onde a dificuldade de se obter proteínas de camada S de *Archaea* por expressão heteróloga é reconhecida (Schuster e Sleytr, 2009; Schuster e Sleytr, 2014), não havendo até o momento qualquer relato bem sucedido utilizando essa abordagem. Novas construções serão feitas de maneira a aperfeiçoar a expressão heteróloga dessas proteínas utilizando-se diferentes estratégias e outros organismos modelo.

4.2. Caracterização estrutural de proteínas de camada S nativas de *Haloferax volcanii*

4.2.1. Análise da sequência de aminoácidos

A proteína de camada S de *Haloferax volcanii* possui 827 aminoácidos e massa molecular predita de 85,18 kDa. É uma proteína composta por muitos resíduos hidrofílicos e não apresenta resíduos de cisteína (Figura 18). Pouco se sabe sobre os aspectos estruturais dessa proteína, principalmente no que diz respeito às suas estruturas secundária e terciária, não havendo modelos estruturais de proteínas de camada S de archaeas, excetuando-se aquelas do gênero *Methanosarcina* (Arbing *et al.*, 2012). A maioria dos estudos que utiliza tal proteína como modelo aborda aspectos associados às modificações pós traducionais, com especial atenção no processo de *N*-glicosilação (Abu-Qarn *et al.*, 2007; Abu-Qarn *et al.*, 2008; Yurist-Doutsch *et al.*, 2008; Guan *et al.*, 2010; Magidovich *et al.*, 2010; Kaminski *et al.*, 2010).

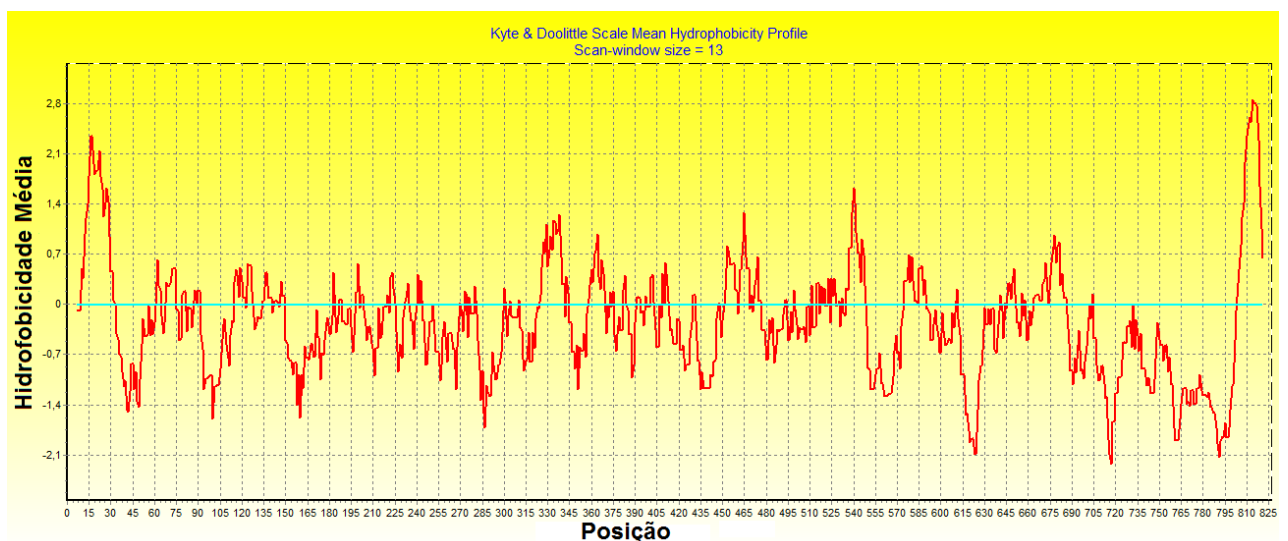


Figura 18. Perfil de hidrofobicidade dos resíduos de aminoácidos da proteína de camada S de *Haloferax volcanii*, segundo o modelo de Kyte e Doolittle (Kyte e Doolittle, 1982).

O perfil de hidrofobicidade obtido (Figura 18) indica que a proteína apresenta pequenos trechos compostos por aminoácidos hidrofóbicos em suas

extremidades, enquanto a porção central da sequência é predominantemente hidrofílica. O segmento hidrofóbico situado na porção N terminal consiste no peptídeo sinal, o qual é composto por 34 aminoácidos (Sumper *et al.*, 1990). Conforme mencionado anteriormente, estudos sugeriram um papel de ancoragem à membrana citoplasmática, mediado pela porção hidrofóbica próxima à extremidade C-terminal da proteína (Sumper *et al.*, 1990). Além disso, os conjuntos de resíduos de treonina adjacentes a esse possível domínio de ancoragem à membrana sofrem O-glicosilação e parecem atuar como elementos espaçadores entre o domínio de ancoragem à membrana plasmática e porções mais distantes da proteína. Além disso, a proteína de camada S de *H. volcanii* possui um grande número de resíduos de aminoácidos ácidos, os quais a conferem um pI de 3,44.

4.2.2. Extração de proteínas de camada S a partir da cultura de *H. volcanii*

A extração das proteínas de camada S a partir da cultura de *H. volcanii*, a partir de um protocolo simples de obtenção de esferoplastos, mostrou-se bastante adequado, resultando na obtenção de proteínas que, quando analisadas por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida, sob condições desnaturantes, revelaram apenas uma banda de alta massa molecular (Figura 19), compatível ao resultado obtido no estudo que propôs tal protocolo de extração de proteínas (Sumper *et al.*, 1990).

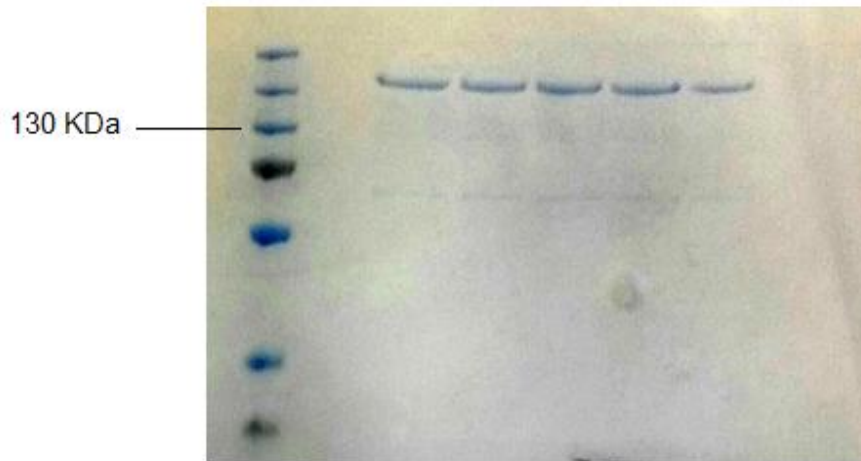


Figura 19. Gel de poli-acrilamida evidenciando a banda obtida a partir da extração de proteínas de camada S de *H. volcanii* realizada no presente estudo.

No entanto, a massa molecular observada no gel de poli-acrilamida mostrava-se bastante superior à massa molecular prevista de 85,18 kDa. Resultados similares foram obtidos com proteínas de camada S de *Halobacterium salinarum*, outra archaea halófila (Lechner e Sumper, 1987). É possível que os carboidratos adicionados à proteína na etapa de glicosilação promovam diferenças em sua massa molecular, quando comparada à massa molecular predita com base nos resíduos de aminoácidos. No entanto, foi especulado (Lechner e Sumper, 1987; Sumper *et al.*, 1990) que os polipeptídeos que compõem a camada S de *H. volcanii* e *H. salinarum* tenham um padrão de interação diferente com o SDS devido à alta quantidade de resíduos hidrofílicos, o que diminuiria a mobilidade eletroforética, resultando em uma superestimação da massa molecular.

4.2.3. Influencia da temperatura na estrutura da proteína de camada S de *H. volcanii*

A estabilidade da proteína de camada S de *H. volcanii* foi avaliada por dicroísmo circular em temperaturas variando entre 25 °C e 95 °C. Os ensaios de desnaturação térmica foram acompanhados na região distante do ultravioleta (260-190 nm) nos pHs 4,0 e 7,0 (Figuras 20-22). Os espectros dicroicos obtidos em pH ácido apresentaram diferença quando comparados aos obtidos em pH neutro (Figura 21-22). Em pH 4,0, a proteína manteve perfil dicroico semelhante em temperaturas de 25°C a 95°C, com pequena alteração do sinal na faixa de 218 nm, indicando que a proteína não desnaturou em função do aumento da temperatura, apresentando apenas pequenas mudanças conformacionais (Figura 21). Em conformidade com os espectros dicroicos, a curva de desnaturação térmica apresentou valores de teta molar semelhantes, variando entre -4.500 para -4.000 degree.cm².dmol⁻¹ e voltagem constante, sugerindo que a proteína de camada S é termoestável em pH 4,0 (Figura 20). A curva de desnaturação obtida em pH 7,0 se manteve constante até 40 °C, de maneira que após tal temperatura houve aumento do sinal dicroico e variação da voltagem, sugerindo a ocorrência de processo de agregação proteica (Figura 20 e 22). Este resultado sugere que parte das moléculas em solução mudou sua conformação formando agregados mediante o aumento da temperatura, enquanto outra parte permaneceu solúvel, conforme observado nos espectros dicroicos. Tal resultado está de acordo com os obtidos nos ensaios de espalhamento de luz dinâmico (ELD), realizados neste mesmo pH (Tabela 2).

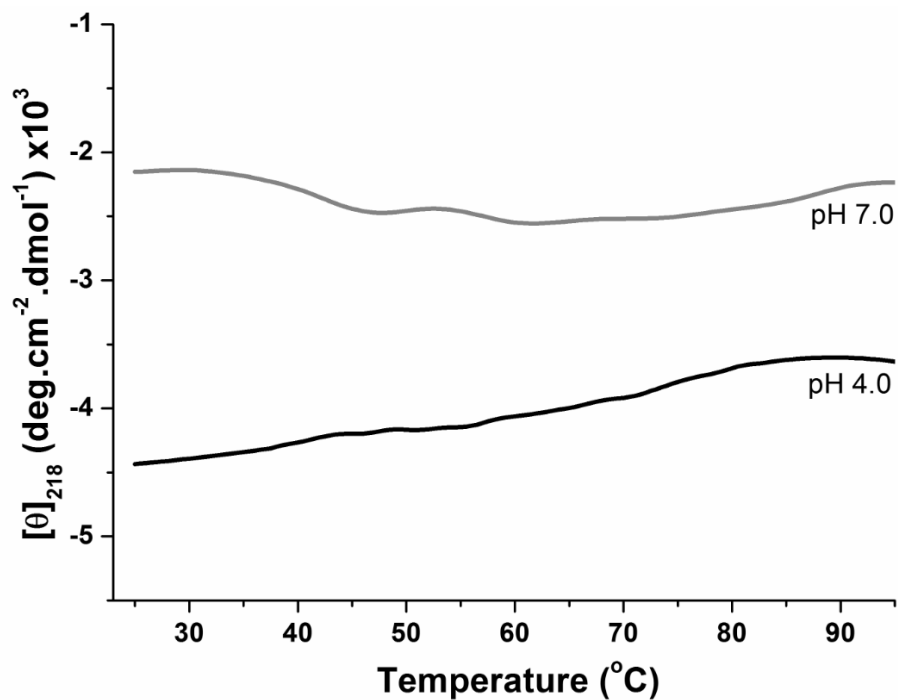


Figura 20. Curvas de desnaturação obtidas por dicroísmo circular para a proteína de camada S de *Haloferax volcanii* nos pHs 4,0 e 7,0.

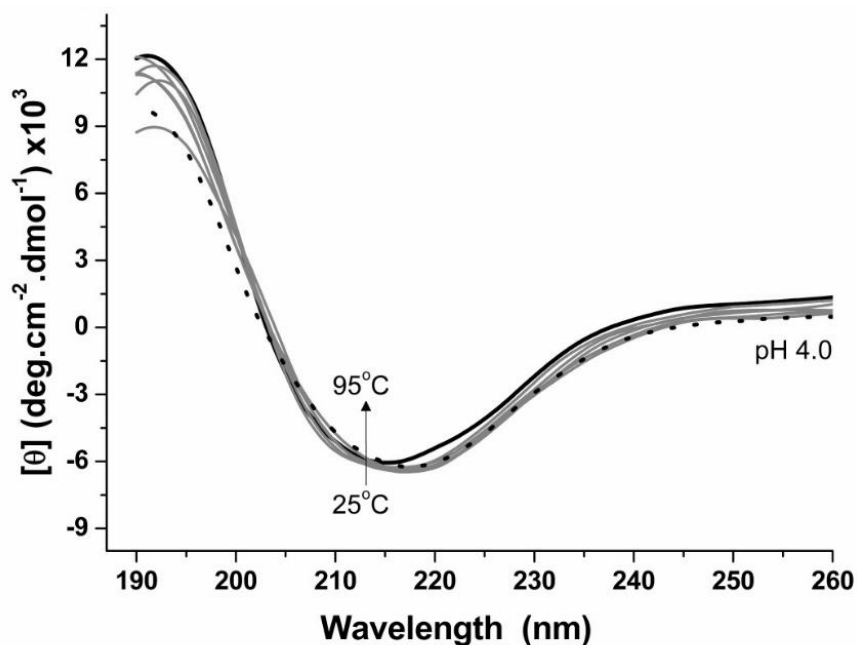


Figura 21. Espectros obtidos por dicroísmo circular (Far-UV) para a proteína de camada S de *Haloferax volcanii* em pH 4,0, com variação de temperatura entre 25 °C e 95 °C.

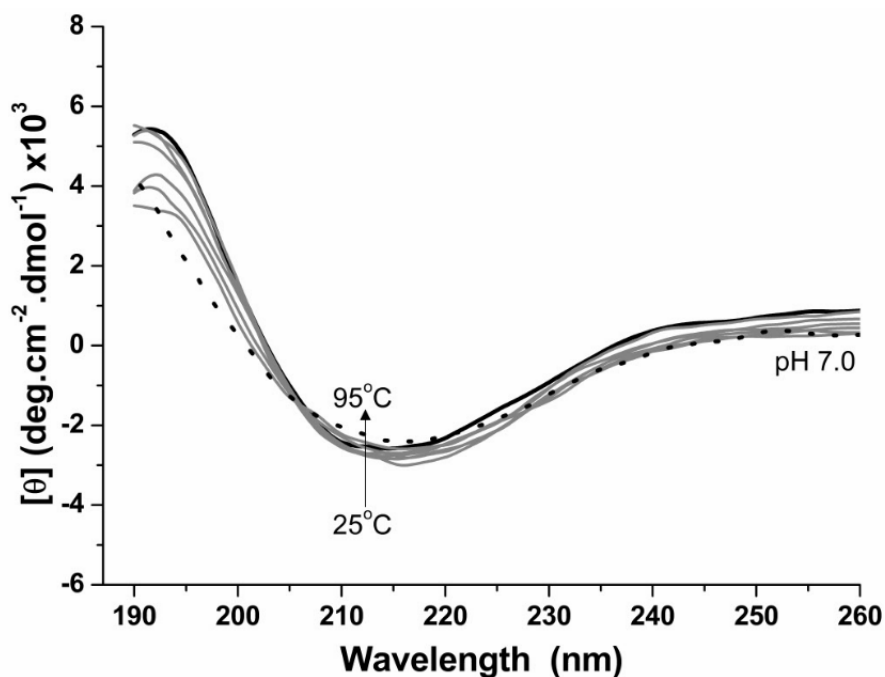


Figura 22. Espectros obtidos por dicroísmo circular (Far-UV) para a proteína de camada S de *Haloferax volcanii* em pH 7,0, com variação de temperatura entre 25 °C e 95 °C.

Os resultados de termoestabilidade dessa proteína possivelmente estão correlacionados à sua sequência primária. Esta consiste em uma proteína composta por 178 aminoácidos carregados em pH neutro (21,5%), o que favorece o processo de agregação proteica nessa faixa, mediante aumento da temperatura. Em pH neutro, resíduos de aminoácidos carregados, como ácido aspártico, ácido glutâmico e histidina, se encontram ionizados, favorecendo a solubilidade da proteína por meio de interação com a água por meio de ligações de hidrogênio. Além disso, a solubilidade é favorecida pela presença de cadeias laterais de aminoácidos ionizados. No entanto, com o aumento da temperatura, essa capacidade de ligação tende a diminuir, o que favorece a ruptura das ligações de hidrogênio, levando a desnaturação e/ou agregação proteica. Em contrapartida, este resultado não foi observado em pH ácido, o

que reforça o argumento de que a presença desses aminoácidos carregados induziria o processo de agregação em valores de pH neutro.

Tabela 2. Análise da tendência à oligomerização por espalhamento de luz dinâmico (ELD) em pH 7,0, mediante variação de temperatura (20 °C – 45°C)

Temperatura (°C)	Nº de picos	Massa (%)	polidispersividade (%)	diâmetro hidrodinâmico (nm)
20	2	1- 59,0	1- 11,3 (M)	1- 15,5 ± 1,7
		2- 41,0	2- 28,5 (P)	2- 56,5 ± 16,8
25	2	1- 54,6	1- 14,9 (M)	1- 18,6 ± 2,8
		2- 45,4	2- 29,2 (P)	2- 59,2 ± 17,7
30	2	1- 54,2	1- 14,5 (M)	1- 19,5 ± 2,9
		2- 45,8	2- 31,3 (P)	2- 59,2 ± 19,4
35	2	1- 50,9	1- 11,2 (M)	1- 18,6 ± 2,1
		2- 49,1	2- 25,1 (P)	2- 56,5 ± 14,6
40	1	100,0	32,5 (P)	62,0 ± 18,8
45	1	100,0	26,0 (P)	62,0 ± 16,3

*M: monodisperso; P: polidisperso

As dimensões da proteína de camada S de *H. volcanii* nativa em solução em pH 7,0 (Tris-HCl 10 mM) foram avaliadas por espalhamento de luz dinâmico (EDL). Para a realização dos ensaios, o módulo *size* foi utilizado por permitir a mensuração do estado oligomérico de amostras em solução. Foi possível observar variações nos valores obtidos para os diferentes parâmetros mensurados com o aumento da temperatura (Tabela 2). Em valores de temperatura entre 20 e 35 °C foram detectadas duas formas oligoméricas distintas, uma monodispersa e outra polidispersa. Em todos os casos, a forma monodispersa representou uma porcentagem maior da massa detectada. No entanto, a proporção entre as duas formas oligoméricas se tornou mais próxima com o aumento da temperatura, de forma que a 35 °C ambas representaram porcentagens quase equivalentes. Em amostras monodispersas, todas as partículas apresentam a mesma forma e tamanho, com uma maior probabilidade de haver cristalização (Lorber *et al.*, 2012). Assim, tendo em vista a maior proporção da forma monodispersa em

temperaturas mais baixas, é possível que tal condição contribua para formas oligoméricas mais estáveis da proteína de camada S de *H. volcanii* em suspensão.

A partir de 40 °C foi possível observar apenas uma forma oligomérica polidispersa, onde foi detectado um aumento no valor de diâmetro hidrodinâmico da amostra, sugerindo a formação de agregados maiores e com menor tendência à cristalização com o aumento da temperatura. Como mencionado anteriormente, esse resultado está de acordo com aqueles obtidos por dicroísmo circular (Figura 20 e 22), onde houve um aumento de sinal em temperaturas superiores a 40 °C, indicando maior tendência de formação de agregados proteicos.

4.2.4. Influencia do pH na estrutura da proteína de camada S de *H. volcanii*

As estruturas secundárias da proteína de camada S foram analisadas na região distante do ultravioleta (190-260 nm) nos pHs 4,0; 7,0 e 8,5, a partir de espectros obtidos a 25°C. Os espectros ajustados indicam que o pH provoca mudanças nas estruturas secundárias da proteína (Figura 23). Em pH 4,0 a proteína apresentou maior porcentagem de estruturas em α -hélice (57,6%), seguida por folhas beta (19,3%). No entanto, em pH 7,0 os valores calculados foram semelhantes tanto para α -hélices (34,4%) quanto para folhas beta (34,8%). Em pH 8,5 os valores calculados mostraram que a estrutura da proteína é predominantemente formada por folhas beta (54,2%), seguida por α -hélices (21,4%).

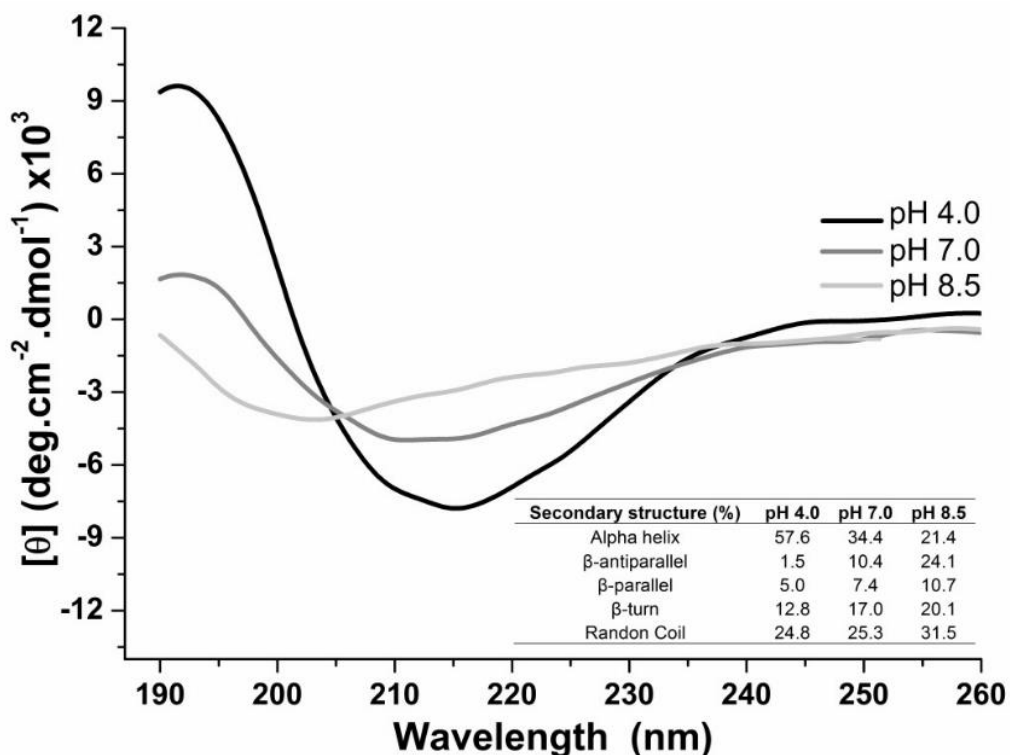


Figura 23. Espectros obtidos por dicroísmo circular para a proteína de camada S de *Haloferax volcanii* a 25 °C, em pH 4,0, 7,0 e 8,5.

Existem poucos estudos que analisam a estrutura secundária de proteínas de camada S em *Archaea*. Tendo em vista a baixa similaridade entre as sequências de aminoácidos dessas proteínas nos diferentes grupos e o pequeno número de modelos estruturais disponíveis na literatura, é difícil afirmar se há uma comparabilidade direta entre as propriedades estruturais dessas proteínas nos diferentes organismos (Rodrigues-Oliveira *et al.*, 2017). Nas archaeas metanogênicas *Methanothermus fervidus*, *M. sociabilis* e *Methanosarcina acetivorans* uma grande quantidade de folhas beta foi detectada em suas proteínas de camada S (Brockl *et al.*, 1991; Arbing *et al.*, 2012). Como tais estruturas podem interagir em níveis inter- e intramoleculares (Jaenicke, 1987), foi sugerido que as folhas-beta das proteínas de camada S desses organismos desempenham importante papel na interação entre as

unidades proteicas do arranjo cristalino (Brockl *et al.*, 1991). Tal argumento é reforçado ao se analisar a unidade morfológica do envelope celular de *Staphylothermus marinus*, o *tetrabrachion*, onde a região de interação entre as unidades proteicas também apresenta uma alta quantidade de folhas-beta (Peters *et al.*, 1995). Se a formação do arranjo cristalino da camada S de *H. volcanii* também for dependente dessas estruturas, seria plausível concluir que as folhas-beta estariam concentradas nos pontos de interação entre as unidades proteicas. Assim, como os resultados de dicroísmo circular indicaram que o pH promoveu mudanças nas estruturas secundárias dessa proteína, é possível que tal fator influencie a formação e disposição do arranjo cristalino da camada S desse organismo.

A influência do pH na estrutura terciária da proteína de camada S de *H. volcanii* foi analisada por espectroscopia de fluorescência (Figura 24). Os espectros de fluorescência em valores de pH entre 3,5 e 9,0 apresentaram um deslocamento na banda de emissão do triptofano de 325 nm para 332 nm. Esse aumento no valor do comprimento de onda ocorre quando resíduos de triptofano são expostos à água (Lakowicz, 2006). Estes resultados indicam que a proteína sofreu modificações conformacionais em função do pH, o que é característico de ionização das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos presentes em sua estrutura. Como mencionado anteriormente, a proteína de camada S de *H. volcanii* é composta em 21,5% por resíduos de aminoácidos carregados. Em pHs neutros e básicos, resíduos de aminoácidos como ácido glutâmico, ácido aspártico, arginina, lisina e histidina tendem a ionizar-se, ocasionando um rearranjo molecular nas cadeias de grupos laterais, que resultam em modificações estruturais na proteína.

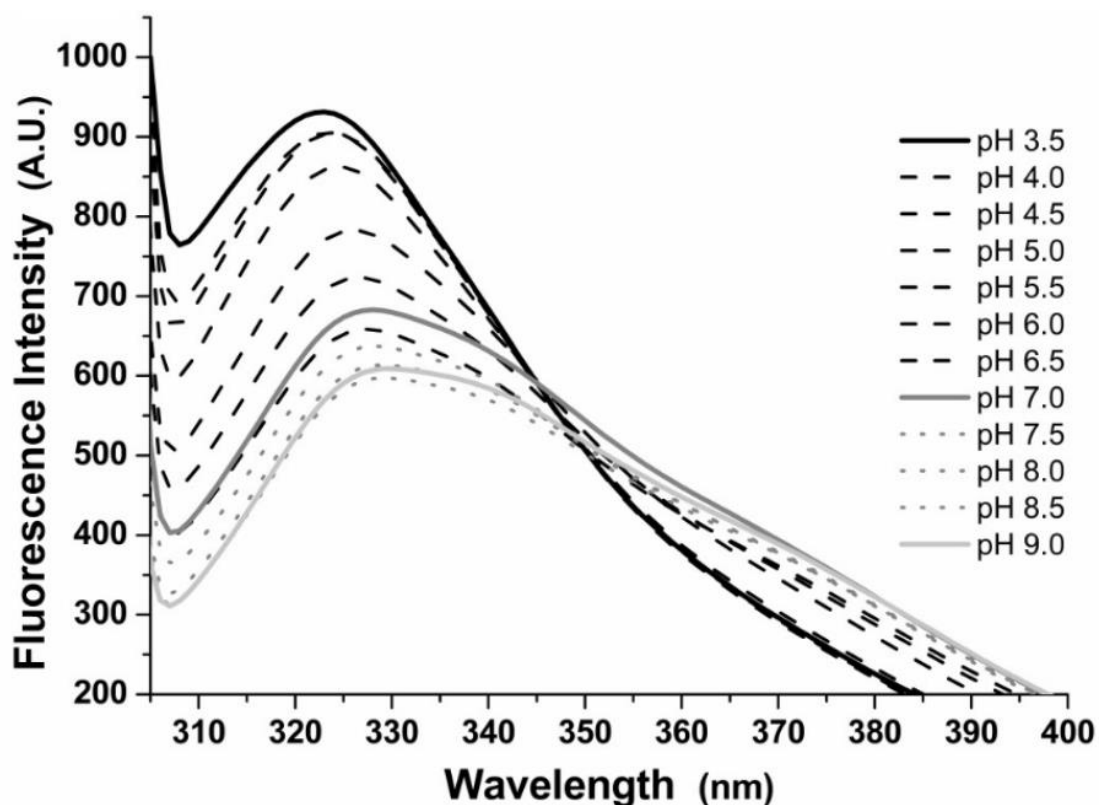


Figura 24. Emissões por espectroscopia de fluorescência da proteína de camada S de *H. volcanii* em valores de pH variando de 3,5-9,0.

Além disso, a intensidade da emissão de fluorescência dos resíduos de triptofano diminuiu com a alcalinização do meio. Diversos fatores podem influenciar a intensidade da emissão de resíduos de triptofano em espectroscopia de fluorescência. Dentre estes, podemos citar a redução da emissão por transferência de prótons de resíduos próximos carregados, redução da emissão por aceptores de elétrons como grupos carboxil protonados, transferência de elétrons causada por ligações peptídicas no cerne da proteína e transferência de energia de ressonância entre os resíduos de triptofano (Callis e Vivian, 2003; Callis e Liu, 2004; Lakowicz, 2006).

A redução da emissão pode também ocorrer por contato molecular direto entre uma molécula e o triptofano. Assim, se o resíduo de triptofano estiver enterrado na estrutura da proteína, não é esperada uma redução da emissão

por haver uma menor acessibilidade do resíduo a formas moleculares externas. Por outro lado, a redução da emissão é esperada quando o resíduo de triptofano encontra-se exposto ao meio (Lakowicz, 2006). Assim, tanto a redução da intensidade de emissão, quanto o aumento do seu comprimento de onda indicam uma maior exposição dos resíduos de triptofano à água com o aumento do valor de pH, de maneira que este fator afeta a estrutura terciária da proteína de camada S de *H. volcanii*.

Na região de comprimento de onda de 346 nm é observado um ponto isobéptico, que corresponde ao mesmo valor de emissão de fluorescência do triptofano nos diferentes pHs. Este ponto indica que diferentes conformações da proteína ocorrem em função do pH.

A proteína foi analisada quanto à tendência de formar estruturas oligoméricas por espalhamento de luz dinâmico em diferentes pHs. Os ensaios foram conduzidos em valores de pH de 5,0 a 9,0, a 25°C (Tabela 3). As populações proteicas observadas em solução foram caracterizadas como monodispersas e polidispersas com base nos valores do índice de polidispersividade e do diâmetro hidrodinâmico. Os resultados obtidos mostraram que a proteína de camada S em pH ácido é monodispersa, enquanto em pH neutro e básico, tende a formar agregados. O índice de polidispersividade calculado variou entre 10% e 40%.

Tabela 3. Análise da tendência à oligomerização por espalhamento de luz dinâmico (ELD) a 25°C, mediante variação do pH (5.0 – 9.0)

<i>pH</i>	<i>Nº de picos</i>	<i>Massa (%)</i>	<i>polidispersividade (%)</i>	<i>diâmetro hidrodinâmico (nm)</i>
5,0	2	1- 63,2 2- 36,8	1- 10,2 (M) 2- 11,4 (M)	1- 37,3 ± 3,9 2- 124,1 ± 14,0
6,0	2	1- 71,1 2- 28,9	1- 32,4 (P) 2- 27,7 (P)	1- 54,0 ± 20,3 2- 156,3 ± 47,1
7,0	2	1- 71,1 2- 28,9	1- 16,8 (M) 2- 20,8 (P)	1- 32,5 ± 5,8 2- 85,7 ± 17,3
8,0	2	1- 72,8 2- 27,2	1- 15,6 (M) 2- 40,0 (P)	1- 29,6 ± 4,6 2- 108,0 ± 40,8
9,0	2	1- 71,8 2- 28,2	1- 34,9 (P) 2- 27,7 (P)	1- 54,0 ± 22,7 2- 188,0 ± 55,0

*M: monodisperso; P: polidisperso

Os ensaios em pH 5,0 resultaram no valor de polidispersividade de 10%, com perfil monodisperso, contendo duas populações de proteínas distintas com diâmetro hidrodinâmico de 37 nm e 124 nm, respectivamente, assumindo duas conformações oligoméricas. Para valores de pH entre 6,0 e 9,0, os índices de polidispersividade variaram entre 10 e 40%, também caracterizando diferentes populações da proteína na mesma solução. Estas populações foram classificadas em monodispersas e polidispersas, cujos diâmetros hidrodinâmicos mostraram-se mais altos, variando entre 32 e 188 nm. A formação de oligômeros com maior diâmetro hidrodinâmico nesses valores de pH pode estar associada ao pI teórico da proteína, estimado em 3,44. Como a proteína apresenta 21,5% de resíduos de aminoácidos com tendência à ionização em pHs acima de 6,0 quando expostos ao solvente tal processo poderia favorecer a sua oligomerização.

4.2.5. Influencia da salinidade na estrutura da proteína de camada S

de *H. volcanii*

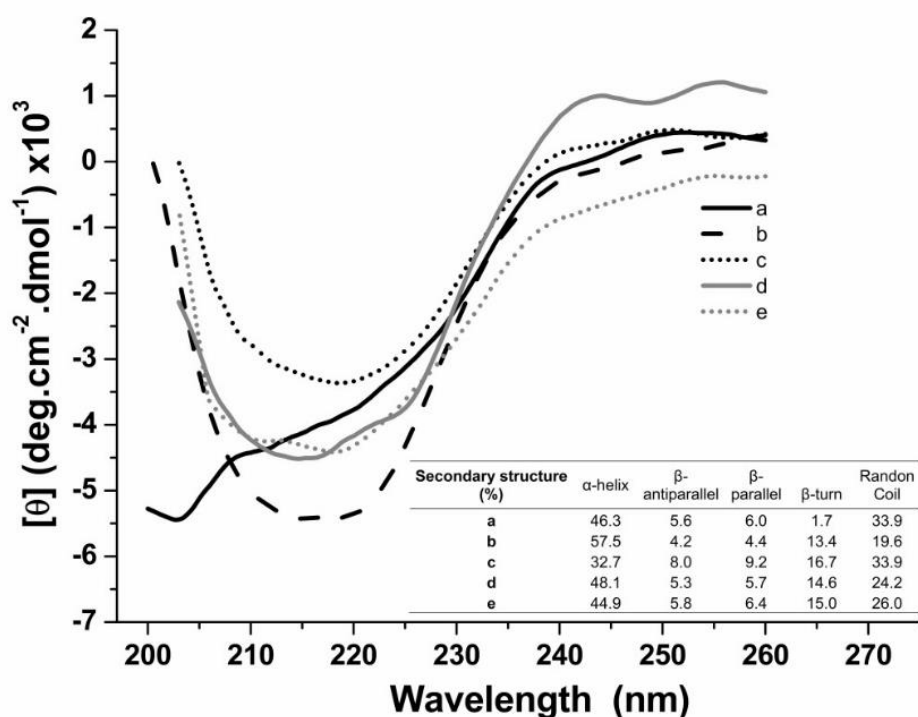


Figura 25. Espectros obtidos por dicroísmo circular para a proteína de camada S de *Haloferax volcanii* a 25 °C, pH 6,8, em: a) 1 mM CaCl₂; b) 10 mM CaCl₂; c) 2,14 M NaCl e 10 mM CaCl₂; d) 250 mM MgCl₂; e) 2,14 M NaCl e 250 mM MgCl₂.

A estrutura secundária da proteína de camada S de *H. volcanii* foi determinada por dicroísmo circular na região distante do ultravioleta (200-260nm), a partir de espectros obtidos a 25°C, nas seguintes condições de salinidade: 1 mM CaCl₂; 10 mM CaCl₂; 2,14 M NaCl e 10 mM CaCl₂; 250 mM MgCl₂; 2,14 M NaCl e 250 mM MgCl₂. Todas as soluções tiveram seu pH ajustado para 6,8. Essas concentrações de sais foram utilizadas em outros estudos descritos na literatura, onde foi avaliado o efeito da salinidade no envelope celular de *H. volcanii* (Cohen *et al.*, 1991) e foram escolhidas para o presente estudo para fins de comparabilidade de dados. Além disso, esses parâmetros estão de acordo com as concentrações de sal presentes na maioria

dos meios de cultura utilizados no cultivo desse organismo (Dyall-Smith *et al.*, 2008). Os espectros ajustados indicam que a proteína apresentou mudanças em sua estrutura secundária de acordo com a valência e concentração dos íons (Figura 25).

Na presença de CaCl_2 a 1 mM, o conteúdo de α -hélices estimado para a proteína foi de 46,3% e de 13,3% para folhas beta. No entanto, em 10 mM de CaCl_2 a proteína apresentou maior quantidade de estruturas secundárias, com aumento de α -hélices (57,5%) e folhas beta (21,6%). Quando incubada com NaCl 2,14 M e CaCl_2 10 mM, observou-se uma diminuição no conteúdo de α -hélices (32,7%) e aumento de folhas beta (33,9%). Os resultados observados com MgCl_2 250 mM foram semelhantes, tanto na ausência, como na presença de NaCl 2,14 M, sendo observado um discreto aumento na quantidade de folhas beta quando na presença de NaCl.

A influencia desses sais na estrutura terciária dessa proteína foi avaliada por espectroscopia de fluorescência, a partir de espectros obtidos a 25°C (Figura 26). Os espectros de fluorescência na presença de CaCl_2 (1 e 10 mM) apresentaram redução no comprimento de onda de emissão do triptofano, de 327 nm para 325 nm, além de redução na intensidade de emissão com o aumento da concentração desse sal. Tal resultado indica que os íons formados em meio aquoso, a partir de CaCl_2 , interagem com as cadeias laterais próximas aos resíduos de triptofano da proteína, de maneira que o aumento de sua concentração ocasiona alterações na emissão de fluorescência. Na presença de NaCl 2,14 M e CaCl_2 10 mM, houve uma redução mais evidente do comprimento de onda de emissão para 322 nm e um aumento na intensidade de emissão. É interessante apontar que na presença de NaCl 2,14 M e MgCl_2

250 mM, houve redução de emissão e um aumento no comprimento de onda, quando comparado com o resultado obtido em NaCl 2,14 M e CaCl₂ 10 mM. Assim, mantendo-se a concentração de NaCl constante, a substituição de CaCl₂ 10 mM por MgCl₂ 250 mM aparentemente promoveu uma maior exposição dos resíduos de triptofano ao meio. No entanto, os espectros obtidos com a proteína incubada com MgCl₂ 250 mM, na presença e ausência de NaCl 2,14 M, revelaram que a presença de NaCl ocasionou uma redução da intensidade e comprimento de onda da emissão de fluorescência, resultado similar àquele observado com CaCl₂ 10 mM. Este resultado indica que o ambiente próximo aos resíduos de triptofano mudou inicialmente de semi-enterrado, presente em ambiente mais hidrofílico, deslocando-se para ambiente mais hidrofóbico em função da interação com os íons liberados pelos sais em meio aquoso.

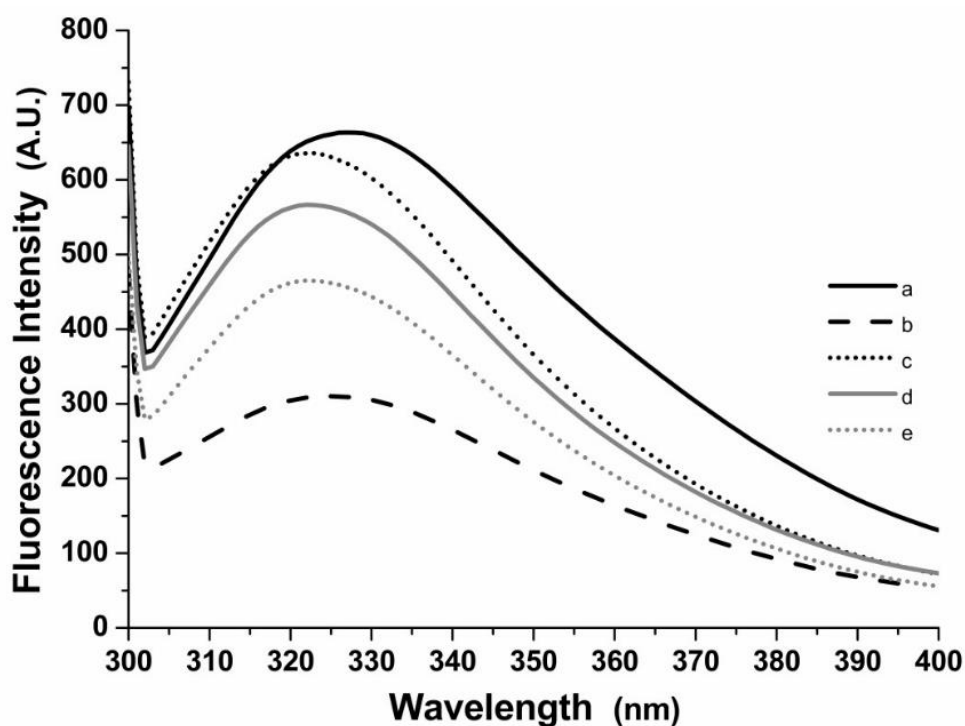


Figura 26. Emissões por espectroscopia de fluorescência da proteína de camada S de *H. volcanii* em pH 6,8, 25 °C em: a) 1 mM CaCl₂; b) 10 mM CaCl₂; c) 2,14 M NaCl e 10 mM CaCl₂; d) 250 mM MgCl₂; e) 2,14 M NaCl e 250 mM MgCl₂.

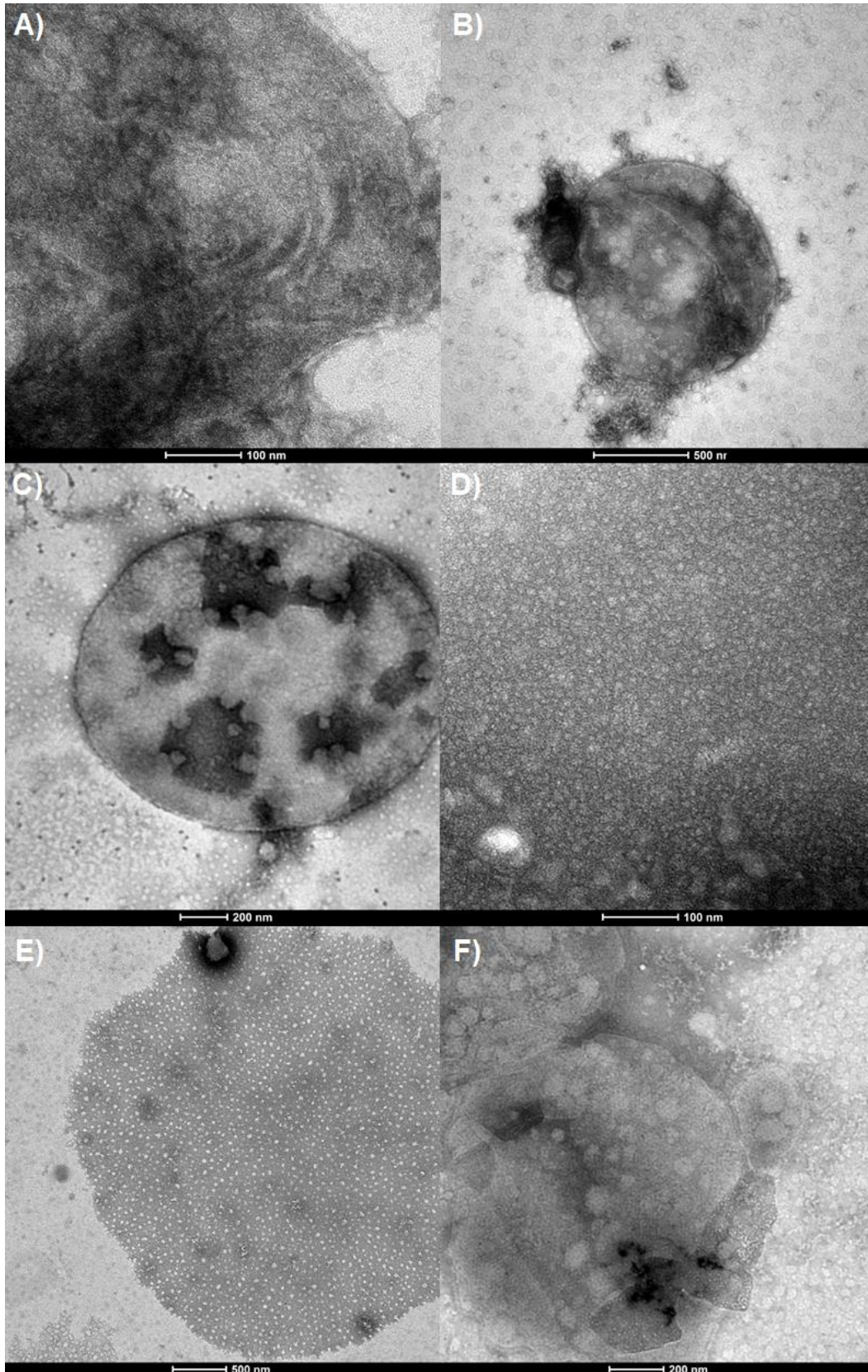


Figura 27. Envelopes celulares de *H. volcanii* observados por microscopia eletrônica de transmissão em diferentes condições de salinidade. A) 1 mM CaCl_2 ; B) 10 mM CaCl_2 ; C) 2,14 M NaCl e 10 mM CaCl_2 ; D) 2,14 M NaCl e 10 mM CaCl_2 ; E) 250 mM MgCl_2 ; F) 2,14 M NaCl e 250 mM MgCl_2 .

Para confirmar os resultados obtidos a partir dos ensaios de dicroísmo circular e espectroscopia de fluorescência, foram feitos procedimentos onde o envoltório celular de *H. volcanii* foi isolado e incubado nas mesmas condições de salinidade. Tal procedimento foi feito utilizando-se uma adaptação do protocolo de preparo de células-fantasma descrito por Kessel *et al.*, 1988, a partir do qual a disposição das proteínas de camada S permaneceu, a princípio, inalterada, similar à encontrada na superfície celular. As imagens dos envoltórios celulares de *H. volcanii* incubados em diferentes condições foram obtidas a partir de preparos por contrastação negativa para microscopia eletrônica de transmissão (Figura 27).

Essas micrografias mostram que as condições de salinidade do meio provocam alterações morfológicas na camada S deste organismo, conforme já descrito na literatura (Cohen *et al.*, 1991). Na presença de apenas cátions divalentes em baixas concentrações, a microscopia eletrônica de preparações contendo células íntegras revelam que estas sofrem lise osmótica, restando somente dejetos celulares e vesículas (Cohen *et al.*, 1991).

No entanto, nas preparações das suspensões contendo os envoltórios celulares isolados verificou-se uma melhor manutenção da morfologia original, quando comparadas às células inteiras incubadas na presença de cátions divalentes (Figura 27A, B, E) (Cohen *et al.*, 1991). Em CaCl_2 1 mM (Figura 27A), a morfologia do envelope celular apresentou aspecto menos arredondado comparado aos preparos em CaCl_2 10 mM (Figura 27B). Nesse caso, foi possível observar uma morfologia mais próxima àquela da célula íntegra. Quando incubado na presença de NaCl 2,14 M e CaCl_2 10 mM (Figura 27C e D), o envelope celular mostrou-se levemente intumescido (Figura 27C),

aspecto já descrito na literatura (Cohen *et al.*, 1991). Imagens obtidas em maior aumento (Figura 27D), revelaram a disposição da camada S de maneira semelhante à descrita para essa espécie (Kessel *et al.*, 1988; Cohen *et al.*, 1991). Na presença de $MgCl_2$ 250 mM (Figura 27E), o envoltório celular de *H. volcanii* apresentou aspecto similar a um tecido rompido. No entanto, na presença de NaCl 2,14 M e $MgCl_2$ 250 mM (Figura 27F), foi observada uma morfologia arredondada expressivamente distinta daquela observada na presença de apenas $MgCl_2$.

Em conjunto, esses resultados indicam que as condições de salinidade no ambiente influenciam diferentes aspectos da camada S de *H. volcanii*. Os resultados de dicroísmo circular e espectroscopia de fluorescência detectaram mudanças nas estruturas secundária e terciária da proteína. Além disso, ao se analisar as imagens dos envelopes celulares isolados nas mesmas condições, diferenças significativas puderam ser apontadas. Assim, é provável que tais diferenças estejam diretamente relacionadas às mudanças estruturais observadas na proteína, em função das condições de salinidade. A influência da salinidade no processo de *N*-glicosilação da proteína de camada S de *H. volcanii* foi anteriormente relatada. Neste sentido, foram já descritas alterações nos sítios de glicosilação, assim como dos carboidratos utilizados neste processo, em resposta a alterações nas condições de salinidade no meio (Abu-Qarn *et al.*, 2007; Guan *et al.*, 2012). Além disso, uma das funções da *N*-glicosilação dessa proteína está relacionada à sobrevivência celular em ambientes hipersalinos (Abu-Qarn *et al.*, 2007). Dessa maneira, é possível concluir que as concentrações de sais no ambiente afetam a proteína de camada S de *H. volcanii* tanto em relação a aspectos estruturais, como a

modificações pós-traducionais. Em termos evolutivos, talvez essa susceptibilidade à salinidade esteja relacionada ao fato desta proteína estar em constante contato com o meio e, por desempenhar papéis de proteção celular, sofra alterações visando favorecer ou garantir a sobrevivência deste organismo.

A proteína de camada S de *Halobacterium salinarum*, uma haloarchaea extrema, apresenta similaridades com a proteína de camada S de *H. volcanii* (Trachtenberg *et al.*, 2000). Para este organismo, a formação do arranjo cristalino foi observada apenas em preparos de envelopes celulares incubados em concentrações salinas semelhantes às aquelas encontradas em seu habitat (NaCl 5 M), porém não em concentrações inferiores (Brown, 1964; Stoeckenius e Rowen, 1967; Steensland e Larsen, 1969). A estabilidade estrutural da camada S de *Haloarcula japonica*, outra haloarchaea, também apresenta dependência das condições de salinidade do ambiente (Horikoshi *et al.*, 1993). Assim, o papel da salinidade na estrutura e interação entre as unidades proteicas da camada S de haloarchaeas foi verificado em vários representantes desse grupo de organismos. No entanto, ainda não existem estudos investigando as estruturas secundária e terciária das proteínas de camada S dessas haloarchaeas.

No presente estudo, soluções de proteína de camada S de *H. volcanii* mantidas em tampão fosfato-salina (pH 7,2) foram submetidas a procedimentos de Ultracentrifugação Analítica. Como mencionado anteriormente, essa metodologia registra os picos de absorvância a 280 nm ao longo de uma cubeta de quartzo, enquanto a amostra é submetida à centrifugação a 42000 rpm a 20°C. Foram realizadas 200 mensurações em intervalos de 5 minutos.

Essa metodologia pode ser utilizada para observação da presença de formas oligoméricas em uma determinada amostra. Como o ensaio foi feito utilizando-se uma solução de proteínas com baixas concentrações de sal, os resultados obtidos indicam um papel da salinidade na formação de oligômeros para essa amostra (Figura 28).

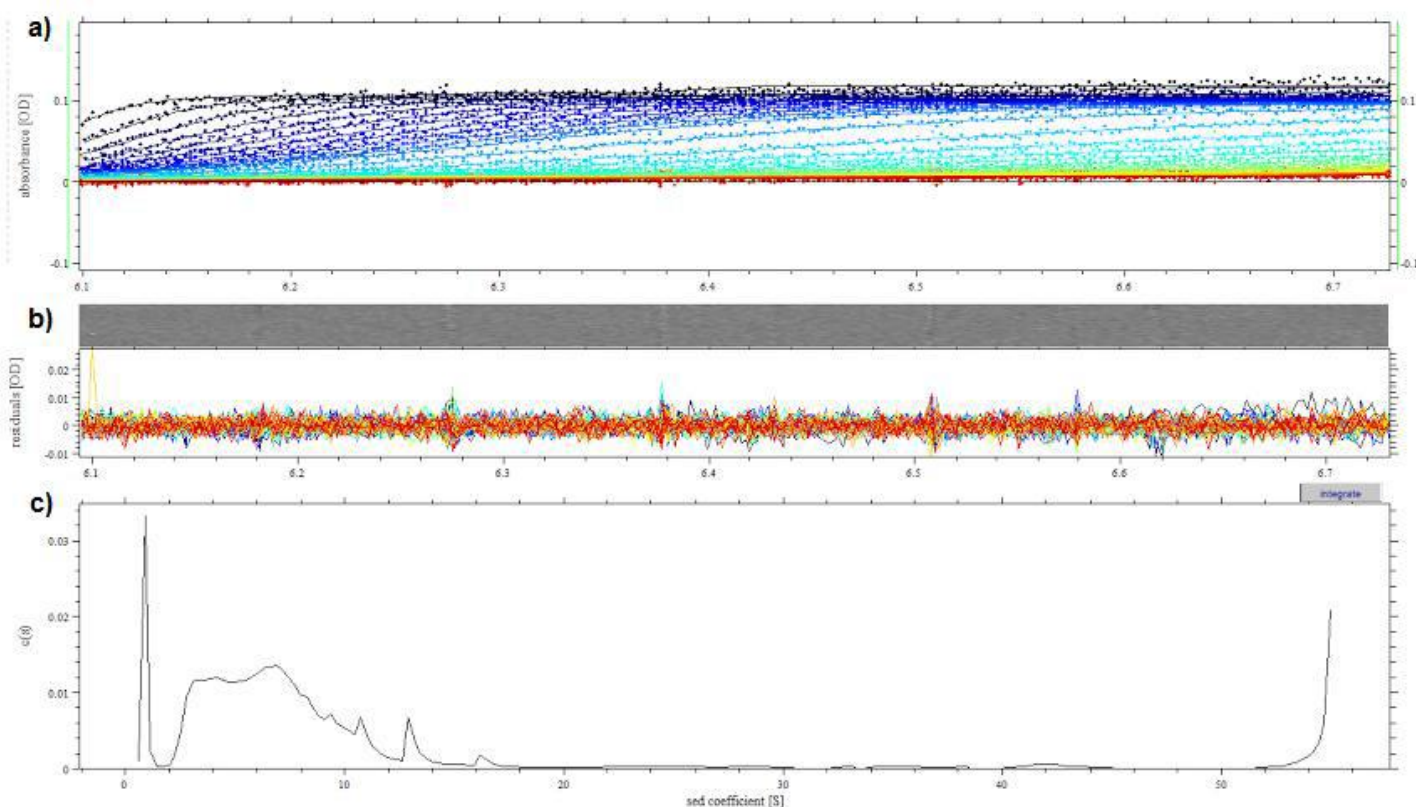


Figura 28. Experimento de Ultracentrifugação Analítica. (a) absorvância de cada uma das 200 mensurações realizadas, a 280 nm; (b) teste de confiabilidade dos resultados obtidos, onde mensurações decorrentes de resíduos devem estar entre -0,01 e 0,01; (c) padrão de migração das proteínas obtidas ao longo do processo de centrifugação.

Os dados obtidos revelaram confiabilidade estatística, pois como ilustrado na Figura 28b, as mensurações residuais permaneceram limitadas ao intervalo de -0,01 e 0,01. Foi verificada a formação de diferentes picos ao longo do processo de migração (Figura 28c), indicando a presença de diferentes

formas oligoméricas na amostra. Formas oligoméricas compostas por números de subunidades diferentes migraram ao longo da cubeta em tempos diferentes, levando à formação de mais de um pico. No entanto, os picos observados não se encontravam definidos, havendo certo grau de sobreposição entre estes, sugerindo eventos de constante associação e dissociação entre diferentes formas oligoméricas da proteína.

Cohen e colaboradores (1991) avaliaram a influência de sais e íons na estabilização do envelope celular de *H. volcanii* e verificaram que as proteínas de camada S dessa archaea são liberadas do envelope celular quando a concentração de cátions bivalentes é reduzida, na presença de NaCl (Sumper *et al.*, 1990; Cohen *et al.*, 1991). Dessa maneira, foi observado que a estabilidade do envelope celular de *H. volcanii* era dependente de cátions divalentes, na concentração mínima de 10 mM de CaCl₂ na solução (Kessel *et al.*, 1988; Cohen *et al.* 1991). Assim, possivelmente a detecção de eventos de constante associação e dissociação entre formas oligoméricas seja decorrente da concentração iônica do tampão utilizado nessas análises. O tampão salina fosfato utilizado não é composto por sais que liberam, em meio aquoso, cátions divalentes e tampouco apresenta concentrações elevadas de NaCl, de modo que a estabilidade dos oligômeros formados pode ter sido reduzida por esse motivo.

É importante ressaltar que existem poucos estudos investigando aspectos estruturais de proteínas camada S de archaeas, especialmente membros halófilos. Assim, os resultados obtidos no presente trabalho apresentam caráter inédito e pioneiro nessa área de estudo.

4.3. Construção de envelopes celulares biomiméticos utilizando a proteína de camada S de *H. volcanii*

Camadas lipídicas imobilizadas em suportes sólidos consistem em modelos promissores para o estudo de membranas biológicas (Jackman *et al.*, 2012; Schuster e Sleytr, 2014). Nesses modelos, a utilização de proteínas de camada S, inseridas entre a membrana e o suporte sólido, se mostrou uma interessante e adequada estratégia para minimizar possíveis alterações das propriedades da camada lipídica em condições artificiais (Schuster e Sleytr, 2014). Nessa abordagem, as proteínas de camada S se arranjam diretamente em contato com a superfície lipídica, resultando em uma disposição similar ao envelope celular de várias archaeas (Schuster e Sleytr, 2009; Albers e Meyer, 2011; Schuster e Sleytr, 2014; Damiati *et al.*, 2015). No entanto, todos os modelos biomiméticos de membranas celulares construídos a partir desse princípio utilizaram proteínas de camada S de isoladas de bactérias.

No presente estudo, proteínas de camada S da archaea *H. volcanii* foram utilizadas para a construção de envelopes celulares biomiméticos. Pela técnica Langmuir-Blodgett, monocamadas fosfolipídicas foram produzidas a partir de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPPE), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC) e 2,3-di-O-fetil-sn-glicero-fosfoetanolamina (DphPE). O DPPE é um lipídeo comum em membranas celulares de mamíferos (Myller *et al.*, 2010), enquanto o DPPC pode ser encontrado entre os surfactantes pulmonares, sendo bastante utilizado em estudos de membranas celulares (Albon, 1978). O DphPE é um fosfolipídeo comumente encontrado na membrana plasmática de membros do domínio *Archaea* (Nishimura *et al.*, 2006). No sistema Langmuir-Blodgett, a monocamada é formada na superfície de uma solução aquosa (TrisHCl 500 μ M pH 7,0 + CaCl₂ 10 mM). Neste caso, o tampão foi suplementado com CaCl₂ 10 mM uma vez que, de acordo com a

literatura, esse sal favorece a formação do arranjo cristalino de outras proteínas de camada S (Liu *et al.*, 2016). As proteínas de camada S solubilizadas em água Milli-Q foram adicionadas à fase aquosa do sistema (1 mL, $A_{280}=0,145$) e o aumento na pressão de superfície foi registrado por 2 horas, em intervalos de 30 minutos (Figura 29). Caso a proteína de camada S estivesse se recristalizando sobre as monocamadas fosfolipídicas produzidas, seria esperado um aumento no registro da pressão de superfície.

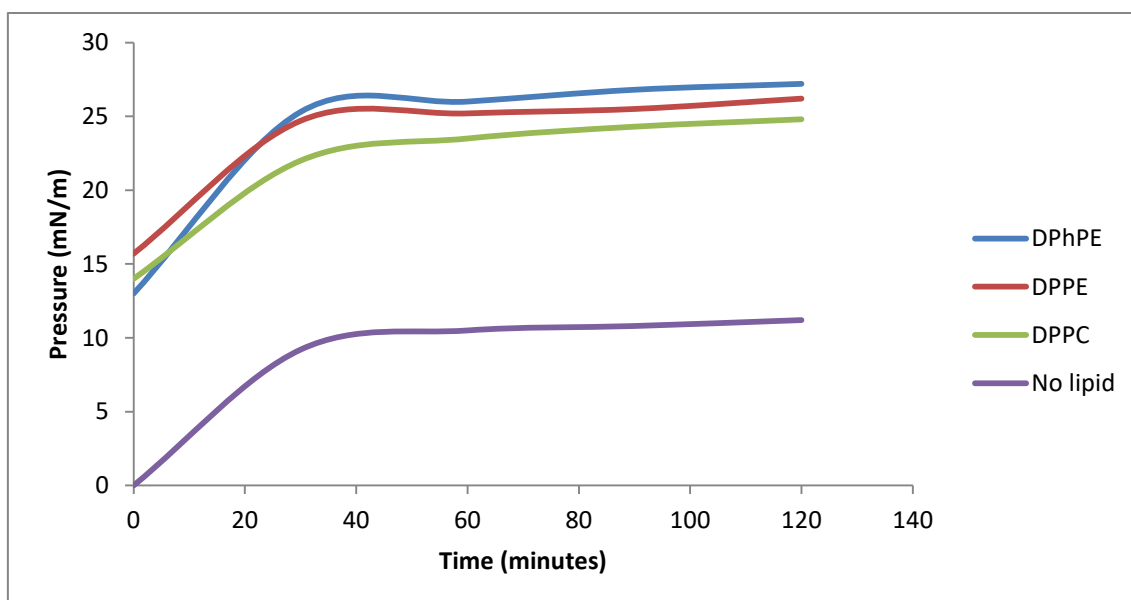


Figura 29. Mudanças na pressão de superfície em função do tempo após a adição da solução de proteínas de camada S de *H. volcanii* à fase aquosa do sistema Langmuir-Blodgett (TrisHCl 500 μ M pH 7,0 + CaCl₂ 10 mM).

Foi verificado o aumento da pressão de superfície das três monocamadas lipídicas após a adição das proteínas de camada S de *H. volcanii* ao sistema. Além disso, houve aumento também mesmo na ausência dos lipídeos, indicando que a proteína de camada S de *H. volcanii* possui afinidade por superfícies de maneira geral. Tal resultado é interessante uma vez que a proteína S, na natureza, é encontrada na superfície de células e

pode estabelecer contato com inúmeros substratos. Foi observado um aumento discretamente maior na pressão de superfície quando o lipídeo DphPE foi utilizado. Considerando-se que dentre os lipídeos testados, este apresenta maior similaridade com lipídeos normalmente encontrados na membrana plasmática de *Archaea*, é possível que haja maior afinidade entre as proteínas de camada S de *H. volcanii* e esta monocamada lipídica. Esses resultados preliminares indicam que a proteína de camada S de *H. volcanii* poderia ser uma boa candidata para a produção de envelopes celulares biomiméticos utilizando-se proteínas de camada S de *Archaea*.

Para verificar a disposição das proteínas de camada S sobre as monocamadas produzidas, foram coletadas amostras da superfície do sistema Langmuir-Blodgett para análises por microscopia eletrônica de transmissão. Essas amostras foram analisadas por contrastação negativa, de maneira que as proteínas de camada S ficaram expostas para análise (Figura 30).

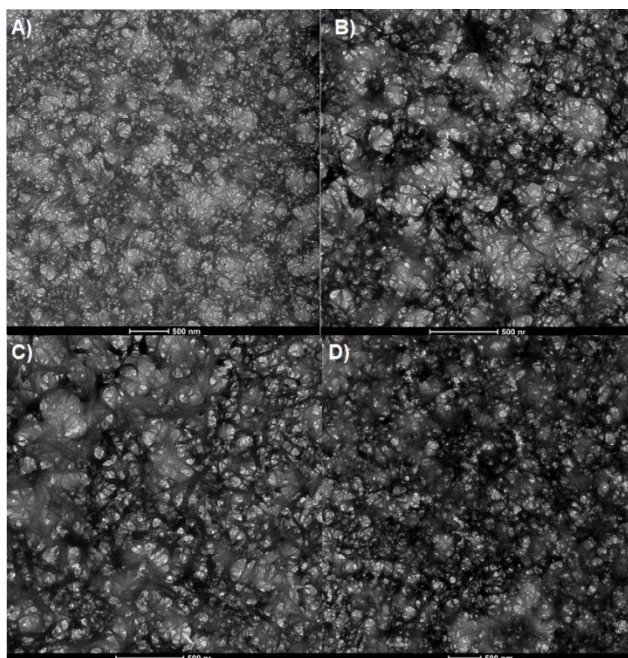


Figura 30. Recristalização da proteína de camada S de *H. volcanii* por Langmuir-Blodgett (TrisHCl 500 μ M pH 7,0 + CaCl₂ 10 mM) em diferentes superfícies: A) DPPE; B) DPPC; C) DPhPE; D) Sem lipídeo.

A Figura 30 revela que as proteínas de camada S se apresentaram em uma disposição similar nas diferentes superfícies. No entanto, essa disposição mostrou-se bastante distinta daquela esperada (Kessel *et al.*, 1988; Cohen *et al.*, 1991), uma vez que as proteínas formaram agregados tridimensionais sem um padrão de organização visível, com a presença de estruturas de aspecto tubular. No entanto, vale ressaltar que os envelopes celulares de *H. volcanii* preservaram a morfologia celular original quando as amostras foram incubadas na presença de apenas CaCl_2 10 mM (Figura 27B). É importante apontar que esta mesma concentração de sal foi adicionada ao tampão utilizado para a recristalização das proteínas de camada S de *H. volcanii* sobre as diferentes superfícies. Assim, esse resultado sugere que as condições para a manutenção da forma dos envelopes celulares isolados a partir da cultura de células são distintas daquelas indicadas para a recristalização das proteínas de camada S desse organismo.

Novos ensaios de Langmuir-Blodgett foram então realizados, com a produção de novas monocamadas lipídicas a partir do lipídeo DPhPE (Figura 31), empregando-se como solução de sais a mistura de NaCl 2,14 M + CaCl_2 10 mM, pH 6,8.

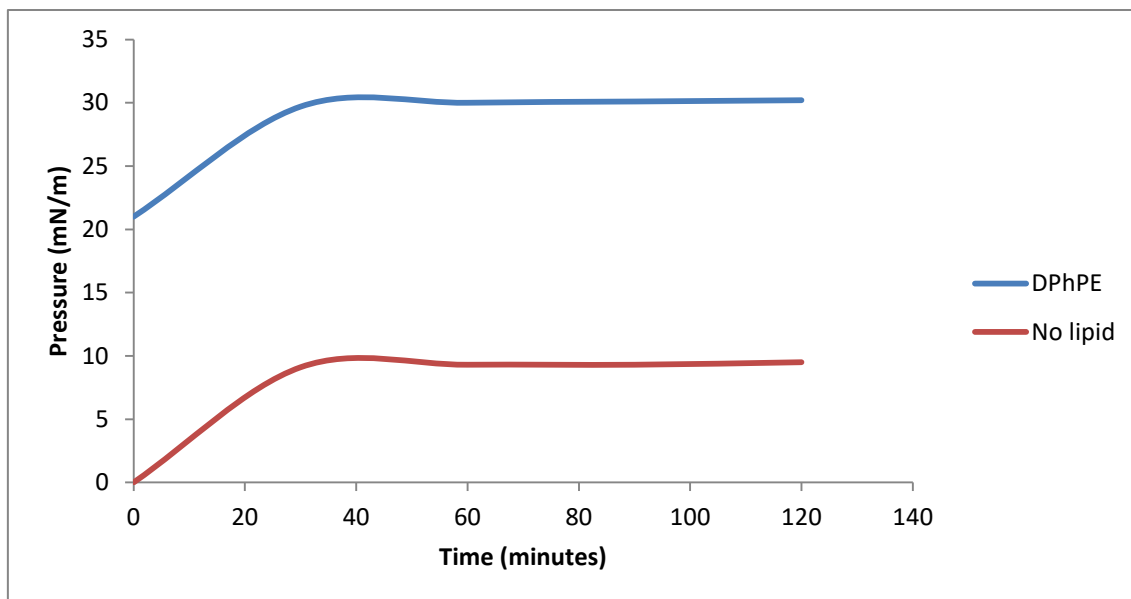


Figura 31. Mudanças na pressão de superfície em função do tempo após a adição da solução de proteínas de camada S de *H. volcanii* à fase aquosa do sistema Langmuir-Blodgett (NaCl 2,14 M + CaCl₂ 10 mM, pH 6,8).

Mesmo após a mudança da solução utilizada para estes ensaios, foi possível observar um aumento na pressão de superfície após a adição de proteínas de camada S ao sistema. Novamente, tal aumento ocorreu tanto na presença da monocamada lipídica produzida a partir de DPhPE, quanto na ausência do lipídeo. Assim, esses resultados indicam que a proteína de camada S de *H. volcanii* manteve a sua afinidade por superfícies também nessa condição de salinidade.

Como feito anteriormente no experimento de análise da organização das proteínas de camada S sobre estas superfícies, amostras da superfície do sistema foram coletadas e submetidas à microscopia eletrônica de transmissão. Novamente, a coleta foi realizada de modo a expor as proteínas de camada S (Figura 32B).

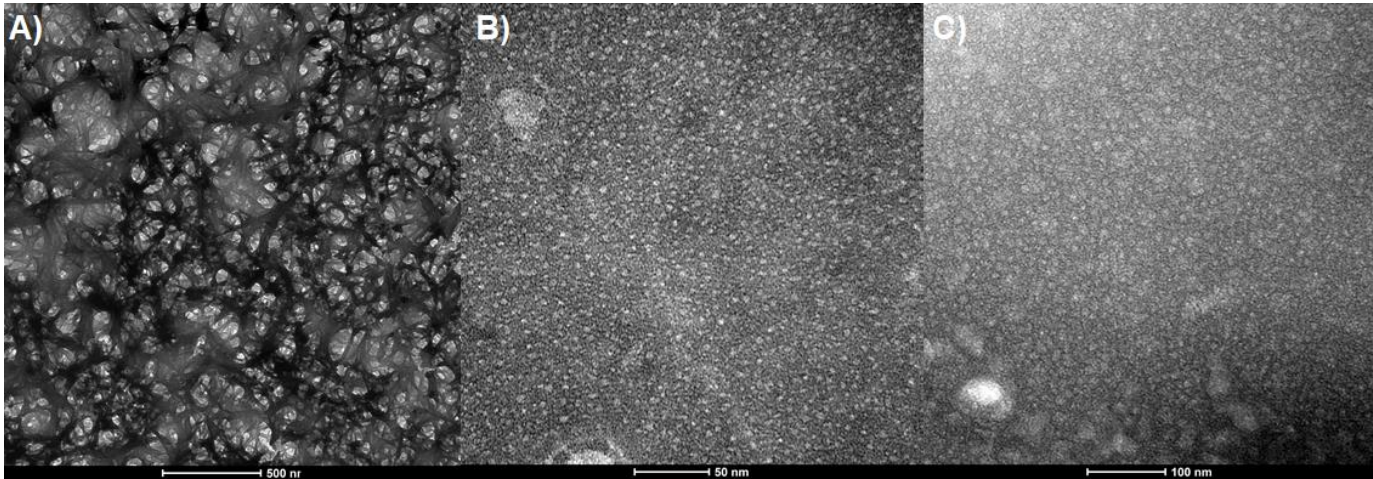


Figura 32. Recristalização da proteína de camada S de *H. volcanii* por Langmuir-Blodgett em DPhPE, utilizando diferentes soluções: A) Tris-HCl 500 μ M, pH 7,0 + CaCl_2 10 mM; B) NaCl 2,14 M + CaCl_2 10 mM, pH 6,8; C) envoltório celular isolado de *H. volcanii* em NaCl 2,14 M + CaCl_2 10 mM, pH 6,8.

Foram observadas diferenças significativas no padrão de recristalização das proteínas de camada S de *H. volcanii* quando a solução utilizada no sistema Langmuir-Blodgett foi substituída (Figura 32A e B). Na presença de NaCl 2,14 M + CaCl_2 10 mM, a disposição das proteínas se assemelhava ao esperado (Kessel *et al.*, 1988), em contraste à recristalização na presença de Tris-HCl 500 μ M, pH 7,0 + CaCl_2 10 mM. Além disso, essa disposição mostrou-se bastante similar ao observado nos envoltórios celulares de *H. volcanii* isolados a partir da cultura de células nessas mesmas condições (Figura 32C). Assim, estes resultados indicam que a salinidade afeta o processo de recristalização dessas proteínas de camada S, sendo sua montagem de maneira similar a disposição normalmente encontrada na superfície celular de *H. volcanii* dependente desse fator. Tendo em vista que foram observadas alterações nas estruturas secundária e terciária dessa proteína em função da salinidade do meio (Figuras 25 e 26), pode-se especular que tais alterações

influenciem a interação entre as unidades proteicas na formação do arranjo cristalino da camada S desse organismo.

Assim, a condição ideal para a cristalização dessas proteínas em diferentes superfícies foi aperfeiçoada. A partir desses resultados, é possível concluir que as proteínas de camada S de *H. volcanii* podem ser consideradas potenciais candidatas à produção de envelopes celulares biomiméticos em condições de altas concentrações de sais, podendo ser úteis na criação de modelos de camadas lipídicas para o estudo de membranas celulares de haloarchaeas. Mais estudos são necessários para investigar a natureza da interação entre essas proteínas e os lipídeos utilizados, bem como confirmar a sua viabilidade nesta área de pesquisa aplicada.

5. Considerações finais

Apesar dos numerosos estudos investigando modificações pós-traducionais da proteína de camada S de *H. volcanii*, existem poucos relatos caracterizando aspectos estruturais dessa proteína. Assim, esse trabalho apresenta a primeira descrição de suas estruturas secundária e terciária, além de discutir a influência da temperatura, pH e salinidade sobre a proteína. Este trabalho é também inovador por ser pioneiro na investigação de aspectos funcionais dessas proteínas, tais como as condições ideais para sua recristalização. No entanto, outras análises são necessárias para um melhor entendimento das propriedades da proteína de camada S de *H. volcanii* e o desenvolvimento de modelos estruturais certamente contribuiriam sobremaneira no esclarecimento de determinadas propriedades funcionais das proteínas de camada S.

Em relação ao potencial biotecnológico de proteínas de camada S de *Archaea*, os estudos são ainda escassos. Nesse sentido, no presente trabalho o gene codificar desta de *H. volcanii* foi isolado para eventuais construções gênicas de interesse. Os ensaios de PCR utilizando iniciadores dirigidos ao gene completo foram bem sucedidos e resultados preliminares revelaram a expressão heteróloga desse gene por células de *E. coli*. No entanto, a purificação da proteína recombinante não foi possível até o momento, provavelmente devido às características intrínsecas da mesma, conforme verificado nos estudos que avaliaram o papel da salinidade, pH e temperatura sobre a proteína de camada S purificada a partir de células de *H. volcanii*. Tal problema foi também relatado por outros autores, sendo necessárias novas abordagens tais como a realização de experimentos de recombinação gênica

empregando *H. volcanii* como célula hospedeira, a fim de se obter a expressão desse gene com finalidades biotecnológicas. Neste caso, construções contendo o gene da proteína de camada S fusionado a produtos de interesse poderão ser inseridos em células de *H. volcanii*, a fim de facilitar a obtenção das proteínas recombinantes de interesse.

Finalmente, as proteínas de camada S de *H. volcanii* foram utilizadas para a construção de plataformas lipídicas biomiméticas. Os resultados indicaram um potencial do uso dessas proteínas nessa área de pesquisa devido a sua aparente afinidade por superfícies. No entanto, para a formação correta do arranjo cristalino, são necessárias condições específicas de salinidade. Assim, para confirmar a viabilidade do uso dessas proteínas para esse fim, são necessárias novas caracterizações dos sistemas utilizados. É importante ressaltar que essa foi a primeira tentativa do uso de proteínas de camada S de *H. volcanii* para finalidades aplicadas. Nesse sentido, tendo em vista o amplo espectro de aplicações biotecnológicas possíveis para proteínas de camada S, seria interessante a avaliação de sua viabilidade em diferentes campos de pesquisa, como produção de nanopartículas metálicas, *kits* de diagnóstico, membranas de ultrafiltração, vacinas conjugadas, entre outros.

6. Conclusões

- Foi possível isolar o gene codificador da proteína de camada S de *H. volcanii* por ensaios de PCR.
- A expressão da proteína de camada S de *H. volcanii* em *E. coli* foi bem sucedida. No entanto, sua purificação não foi possível, provavelmente devido à toxicidade da proteína à célula bacteriana hospedeira.
- A proteína foi purificada com sucesso a partir da cultura de células de *H. volcanii*.
- Em pH 4.0, a proteína se apresentou estruturalmente estável com a variação da temperatura. No entanto, em pH 7.0 o perfil dicróico permaneceu constante até 40°C, de maneira que acima dessa temperatura houve processo de agregação proteica. É possível que tal processo esteja relacionado à presença de resíduos de aminoácidos carregados nesta faixa de pH.
- O pH influencia a estrutura secundária da proteína, de maneira que em valores de pH mais altos houve um aumento na quantidade de folhas-beta. Esse mesmo fator causa alterações na estrutura terciária da proteína, onde o aumento do valor de pH provoca uma maior exposição dos resíduos de triptofano ao meio.
- As condições de salinidade afetam as estruturas secundária e terciária da proteína e, nessas mesmas condições, diferenças significativas podem ser observadas no envoltório celular de *H. volcanii*. Além disso, a concentração de sais no meio afeta o processo de recristalização das unidades proteicas da camada S desse organismo.

- Resultados preliminares indicam que a proteína de camada S de *H. volcanii* é, possivelmente, uma boa candidata para a construção de plataformas lipídicas biomiméticas. No entanto, condições específicas para sua cristalização nessas superfícies são necessárias.

7. Perspectivas futuras

- Realização de ensaios de PCR com iniciadores que amplifiquem o gene da proteína de camada S sem as porções hidrofóbicas, de maneira a facilitar a sua purificação a partir de clones recombinantes de *E. coli*.
- Caracterização da proteína produzida por expressão heteróloga a partir de versões editadas do gene que a codifica.
- Uso de células de *H. volcanii* como hospedeiras para expressão heteróloga de proteínas de camada S fusionadas com fragmentos de interesse.
- Outras metodologias poderiam elucidar aspectos estruturais dessa proteína como, por exemplo, difração de raios-X. Além disso, o desenvolvimento de modelos estruturais por bioinformática levaria a uma compreensão mais completa desses aspectos.
- A caracterização das plataformas lipídicas biomiméticas geradas utilizando-se a proteína de camada S de *H. volcanii* poderia confirmar a sua viabilidade nessa área de pesquisa. Análise desses sistemas por equipamentos como microbalança de cristal quartzo com monitoração de dissipação forneceriam informações essenciais sobre a natureza da interação entre as proteínas de camada S e as camadas lipídicas produzidas.
- Avaliação da aplicabilidade de proteínas de camada S de *H. volcanii* em outros campos de pesquisa aplicada.

8. Referências Bibliográficas

- Abdul Halim, M. F., Karch, K. R., Zhou, Y., Haft, D. H., Garcia, B. A., and Pohlschroder, M. (2015). Permuting the PGF signature motif blocks both archaeosortase-dependent C-terminal cleavage and prenyl lipid attachment for the *Haloferax volcanii* S-layer glycoprotein. *J. Bacteriol.* 198, 808–815.
- Abu-Qarn, M., Giordano, A., Battaglia, F., Trauner, A., Hitchen, P., Morris, H. R., et al. (2008). Identification of AglE, a second glycosyltransferase involved in N glycosylation of the *Haloferax volcanii* S-layer glycoprotein. *J. Bacteriol.* 190, 3140–3146
- Abu-Qarn, M., Yurist-Doutsch, S., Giordano, A., Trauner, A., Morris, H. R., Hitchen, P., et al. (2007). *Haloferax volcanii* AglB and AglD are involved in N-glycosylation of the S-layer glycoprotein and proper assembly of the surface layer. *J. Mol. Biol.* 14, 1224–1236.
- Adam, P. S., Borrel, G., Brochier-Armanet, C., Gribaldo, S. (2017) The growing tree of Archaea: new perspectives on their diversity, evolution and ecology. *ISME J.*, 1-19.
- Ahn, J.S., Chandramohan, L., Liou, L.E., Bayles, K.W., (2006). Characterization of CidR-mediated regulation in *Bacillus anthracis* reveals a previously undetected role of S-layer proteins as murein hydrolases. *Mol. Microbiol.* 62, 1158-1169.
- Akca, E., Claus, H., Schultz, N., Karbach, G., Schlott, B., and Debaerdemaeker, T. (2002). Genes and derived amino acid sequences of S-layer proteins from mesophilic, thermophilic, and extremely thermophilic methanococci. *Extremophiles* 6, 351–358
- Albers, S.V.; Meyer, B.H. (2011). The archaeal cell envelope. *Nature Rev. Microbiol.*, 650 9, 414-426.
- Albon, Norman (1978). "Nature of the gel to liquid crystal transition of synthetic phosphatidylcholines". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 75 (5): 2258–2260

- Allers, T. and Ngo, H. P. (2003). Genetic analysis of homologous recombination in Archaea: *Haloferax volcanii* as a model organism. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 706- 710.
- Altschul SF, Gish W, Miller, W, Myers EW. Lipman DJ (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215(3):403-410
- Andresen TL, Jensen SS, Jorgensen K. (2005) Advanced strategies in liposomal cancer therapy: problems and prospects of active and tumor specific drug release. *Progr. Lipid Res.* 44, 68–97
- Arbing, M. A., Chan, S., Shin, A., Phan, T., Ahn, C. J., Rohlin, L., et al. (2012). Structure of the surface layer of the methanogenic archaean *Methanosarcina acetivorans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 11812–11817.
- Baliga, N. S. et al. (2004) Genome sequence of *Haloarcula marismortui*: a halophilic archaeon from the Dead sea. *Genome Res.* 14, 2221–2234
- Banerjee, A., Tsai, C.-L., Chaudhury, P., Tripp, P., Arvai, A. S., Ishida, J. P., et al. (2015). FlaF is a b-sandwich protein that anchors the archaeellum in the archaeal cell envelope by binding the S-layer protein. *Structure* 23, 863–872.
- Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. (1965) Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* 13, 238–252
- Barns, S. M., Delwiche, C. F., Palmer, J. D., and Pace, N. R. (1996). Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 9188–9193.
- Baumeister, W., and Lembecke, G. (1992). Structural features of archaebacterial cell envelopes. *J. Bioenerg. Biomembr.* 24, 567–575.
- Baumeister, W., Karrenberg, F., Rachel, R., Engel, A., Ten Heggeler, B., and Saxton, W. (1982). The major cell envelope protein of *Micrococcus*

- radiodurans (RI) structural and chemical characterization. *Eur. J. Biochem.* 125, 535–544.
- Beveridge T.J.; Graham L. (1991). Surface layers of bacteria. *Microbiol. Rev.*, 55:684–705.
- Beveridge, T. J. (1994). Bacterial S-layers. *Curr. Op. Struct. Biol.*, 4:204–212.
- Bingle, W. H., Doran, J. L., and Page, W. J. (1985). Characterization of the surface layer protein from *Azotobacter vinelandii*. *Can. J. Microbiol.* 32, 112–120.
- Bleicher KH, Böhm HJ, Müller K, Alanine AI. (2003) Hit and lead generation: beyond high-throughput screening. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 369–378
- Bohle B, Breitwieser A, Zwölfer B, Jahn-Schmid B, Sara M, Sleytr UB, Ebner C (2001). A novel approach to specific allergy treatment: the recombinant fusion protein of a bacterial cell surface (S-layer) protein and the major birch pollen allergen Bet v1 (rSbsC-Bet v 1) combines reduced allergenicity with immunomodulating capacity. *J Immunol*, 172:6642-6648.
- Bradford, M.M. (1976), "Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.* 72: 248–254
- Brochier-Armanet, C., Boussau, B., Gribaldo, S., and Forterre, P. (2008). Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 245–252
- Brockl, G., Behr, M., Fabry, S., Hensel, R., Kaudewitz, H., and Biendl, E. (1991). Analysis and nucleotide sequence of the genes encoding the surface-layer glycoproteins of the hyperthermophilic methanogens. *Eur. J. Biochem.* 199, 147–152.
- Brown, A. D. (1964). Aspects of bacterial response to the ionic environment. *Bacteriol. Rev.* 28, 296–329
- Calabi, E., Ward, S., Wren, B., Paxton, T., Panico, M., Morris, H., Dell, A., Dougan, G., Fairweather, N., (2001). Molecular characterization of the

- surface layer proteins from *Clostridium difficile*. *Mol. Microbiol.* 40, 1187-1199
- Callis, FR; Liu, T (2004). Quantitative prediction of fluorescence quantum yields for tryptophan in proteins. *J phys Chem B* 108:4248-4259
- Callis, PR; Vivian JT (2003). Understanding the variable fluorescence quantum yield of tryptophan in proteins using Q-MM simulations: quenching by charge transfer to the peptide backbone. *Chem Phys Lett* 369:409-414
- Calo, D., Guan, Z., Naparstek, S., and Eichler, J. (2011). Different routes to the same ending: comparing the N-glycosylation processes of *Haloferax volcanii* and *Haloarcula marismortui*, two halophilic archaea from the Dead Sea. *Mol. Microbiol.* 81, 1166–1177.
- Castelle, C. J., Wrighton, K. C., Thomas, B. C., Hug, L. A., Brown, C. T., Wilkins, M. J., et al. (2015). Genomic expansion of domain archaea highlights roles for organisms from new phyla in anaerobic carbon cycling. *Curr. Biol.* 25, 690–701.
- Claus, H., Koenig, H. (2010) In: *Cell Envelopes of Methanogens*. Springer, Berlin. 231–251
- Cohen, S., Shilo, M., and Kessel, M. (1991). Nature of the salt dependence of the envelope of a Dead Sea archaeobacterium, *Haloferax volcanii*. *Arch. Microbiol.* 156, 198–203
- Cohen-Rosenzweig, C., Yurist-Doutsch, S., and Eichler, J. (2012). AglS, a novel component of the *Haloferax volcanii* N-glycosylation pathway, is a dolichol phosphate-mannose mannosyltransferase. *J. Bacteriol.* 194, 6909–6916.
- Damiati, S; Schrems, A; Sinner, EK; Sleytr, UB; Schuster, B. (2015): Probing peptide and protein insertion in a biomimetic S-layer supported lipid membrane platform. *Int. J. Mol. Sci.*, 16(2):2824-2838
- DasSarma S, DasSarma P (2012) Halophiles. In: *Encycl Life Sci*. doi:10.1002/9780470015902.a0000394.pu

- De Rosa M. (1996) Archaeal lipids: structural features and supramolecular organization. *Thin Solid Films* 284–285, 13–17.
- Debabov, V.G. (2004). Bacterial and Archaeal S-Layers as a Subject of Nanobiotechnology. *Mol. Biol.*, 38(4):482–493.
- Dell, A., et al. (2008). AgIF, agIG and agII, novel members of a gene island involved in the N-glycosylation of the *Haloferax volcanii* S-layer glycoprotein. *Mol. Microbiol.* 69, 1234–1245.
- Demarche S, Sugihara K, Zambelli T, Tiefenauer L, Vörös J. (2011) Techniques for recording reconstituted ion channels. *Analyst* 136, 1077–1089
- DeRosa, M.; Trincone, A.; Nicolaus, B.; Gambacorta, A. (1991) In: *Life Under Extreme Conditions*. Springer, Berlin Heidelberg p. 61-87.
- Dyall-Smith, M (2008) *The Halohandbook: Protocols for haloarchaeal genetics*, Ver 7.2.
- Egelseer EM, Ilk N, Pum D, Messner P, Schaeffer C, Schuster B, Sleytr UB (2010). S-layers, microbial, biotechnological applications. *The Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*, 7:4424-4448
- Eichler, J. (2001). Post-translational modification of the S-layer glycoprotein occurs following translocation across the plasma membrane of the haloarchaeon *Haloferax volcanii*. *Eur. J. Biochem.* 268, 4366–4373
- Ellis C, Smith A. (2004) Highlighting the pitfalls and possibilities of drug research. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 238–278
- Engelhardt, H., Saxton, W. O., and Baumeister, W. (1986). Three-dimensional structure of the tetragonal surface layer of *Sporosarcina ureae*. *J. Bacteriol.* 168, 309–317
- Euzéby, J.P. (1997). List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a Folder Available on the Internet. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47, 590-592

- Ewing, B.; Green, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research*, 8:186-194
- Fiala, G., Stetter, K., Jannascht, H. W., Langworthy, T. A., and Madon, J. (1986). *Staphylothermus marinus* sp. nov. represents a novel genus of extremely thermophilic submarine heterotrophic archaeobacteria growing up to 98C. *Syst. Appl. Microbiol.* 8, 106–113.
- Fox, G.E.; Pechman, K.R.; Woese, C.R. (1977) Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid: molecular approach to prokaryotic systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 27(1): 44-57
- Francoleon, D. R., Boontheung, P., Yang, Y., Kin, U., Ytterberg, A. J., Denny, P. A., et al. (2009). S-layer, surface-accessible, and concanavalin A binding proteins of *Methanosarcina Acetivorans* and *Methanosarcina mazei*. *J. Proteome Res.* 8, 1972–1982.
- Garrity, G.M., Castenholz, R.W., and Boone, D.R. (Eds.) (2001) Volume One: The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria. *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*, 2nd ed. New York: Springer. p. 316.
- Ginzburg, M., Sachs, L., Ginzburg, B. Z. (1970) Ion metabolism in a Halobacterium. I. Influence of age of culture on intracellular concentrations. *J. Gen. Physiol* 55, 187–207
- Giozzi A, Relini A, Chong PLG. (2002) Structure and permeability properties of biomimetic membranes of bolaform archaeal tetraether lipids. *J. Membr. Sci.* 206, 131–147.
- Grogan, D. (1989). Phenotypic characterization of the archaeobacterial genus *Sulfolobus*: comparison of five wild-type strains. *J. Bacteriol.* 171, 6710–6719.
- Grogan, D. (1996). Organization and interactions of cell envelope proteins of the extreme thermoacidophile *Sulfolobus acidocaldarius*. *Can. J. Microbiol.* 42, 1163–1171.

- Guan, Z., Naparstek, S., Calo, D., and Eichler, J. (2012). Protein glycosylation as an adaptive response in Archaea: growth at different salt concentrations leads to alterations in *Haloferax volcanii* S-layer glycoprotein N-glycosylation. *Environ. Microbiol.* 14, 743–753.
- Guan, Z., Naparstek, S., Kaminski, L., Konrad, Z., and Eichler, J. (2010). Distinct glycan-charged phosphodolichol carriers are required for the assembly of the pentasaccharide N-linked to the *Haloferax volcanii* S-layer glycoprotein. *Mol. Microbiol.* 78, 1294–1303.
- Hartman, A. L., Norais, C., Badger, J. H., Delmas, S., Haldenby, S., Madupu, R., Robinson, J., Khouri, H., Ren, Q., Lowe, T.M., Maupin-Furlow, J., Pohlschroder, M., Daniels, C., Pfeiffer, F., Allers, T., Eisen, J. A. (2010). The complete genome sequence of *Haloferax volcanii* DS2, a model archaeon. *PLoS one.* 5, e9605.
- Horikoshi, K., Aono, R., and Nakamura, S. (1993). The triangular halophilic archaeobacterium *Haloarcula japonica* strain TR-1. *Experientia* 49, 497–502.
- Huber, H., Hohn, M. J., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V. C., and Stetter, K. O. (2002). A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* 417, 63–67
- Ilk, N.; Egelseer, E.M.; Sleytr, U.B. (2011). S-layer fusion proteins - construction principles and applications. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 22:824-31
- Ito, A.; Shinkai, M.; Honda, H.; Kobayashi, T. (2005). Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *J. Biosci. Bioeng.*, 100(1):1–11.
- Jackman JA, Knoll W, Cho NJ. (2012) Biotechnology applications of tethered lipid bilayer membranes. *Materials*, 2637–2657.
- Jaenicke, R. (1987). Folding and association of proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 49, 117–237
- Jaenicke, R., Welsch, R., Sara, M., and Sleytr, U. B. (1985). Stability and self-assembly of the S-layer protein of the cell wall of *Bacillus stearothermophilus*. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 366, 663–670.

- Jarrell, K. F., Ding, Y., Meyer, B. H., Albers, S.-V., Kaminski, L., and Eichler, J. (2014). N-linked glycosylation in Archaea: a structural, functional, and genetic analysis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78, 304–341.
- Kainz B, Steiner K, Moller M, Pum D, Schäffer C, Sleytr UB, Toca- Herrera JL (2010). Absorption, steady-state fluorescence, fluorescence lifetime, and 2D self-assembly properties of engineered fluorescent S-layer fusion proteins of *Geobacillus stearothermophilus* NRS 2004/3a. *Biomacromolecules*, 11:207-214.
- Kaminski, L., Abu-Qarn, M., Guan, Z., Naparstek, S., Ventura, V. V., Raetz, C. R. H., et al. (2010). AglJ adds the first sugar of the N-linked pentasaccharide decorating the *Haloferax volcanii* S-layer glycoprotein. *J. Bacteriol.* 192, 5572–5579.
- Kaminski, L., Guan, Z., Abu-Qarn, M., Konrad, Z., and Eichler, J. (2012). AglR is required for addition of the final mannose residue of the N-linked glycan decorating the *Haloferax volcanii* S-layer glycoprotein. *Biochim. Biophys. Acta* 1820, 1664–1670.
- Kaminski, L., Guan, Z., Yurist-Doutsch, S., and Eichler, J. (2013). Two distinct N-glycosylation pathways process the *Haloferax volcanii* S-layer glycoprotein upon changes in environmental salinity. *mBio* 4:e00716-13.
- Kandiba, L., Guan, Z., and Eichler, J. (2013). Lipid modification gives rise to two distinct *Haloferax volcanii* S-layer glycoprotein populations. *Biochim. Biophys. Acta* 1828, 938–943
- Kandler, O., Koenig, H. (1993) In: *The Biochemistry of Archaea (Archaeobacteria)*. Elsevier, the Netherlands 223–333
- Kates, M. (1993) Membrane lipids of archaea. In: *The Biochemistry of Archaea (Archaeobacteria)*. (Kates, M.; Kushner, D.J.; Matheson, A.T.; eds). Amsterdam: Elsevier. Capítulo 9, p. 261-295.
- Kennedy, S. P., Ng, W. V., Salzberg, S. L., Hood, L. DasSarma, S. (2001) Understanding the adaptation of *Halobacterium* species NRC-1 to its

extreme environment through computational analysis of its genome sequence. *Genome Res.* 11, 1641–1650

Kessel, M., Wildhaber, I., Cohen, S., and Baumeister, W. (1988). Three-dimensional structure of the regular surface glycoprotein layer of *Halobacterium volcanii* from the Dead Sea. *EMBO J.* 7, 1549–1554

Kjellen, L., Lindahl, U. (1991) Proteoglycans: structures and interactions. *Annu. Rev. Biochem.* 60, 443–475.

König, H., Hartmann, E., Karcher, U. (1994) Pathways and principles of the biosynthesis of methanobacterial cell wall polymers. *Syst. Appl. Microbiol.* 16, 510–517

Konrad, Z., and Eichler, J. (2002). Lipid modification of proteins in Archaea: attachment of a mevalonic acid-based lipid moiety to the surface-layer glycoprotein of *Haloferax volcanii* follows protein translocation. *Biochem. J.* 366, 959–964

Kozubal, M. A., Romine, M., Jennings, R. D., Jay, Z. J., Tringe, S. G., Rusch, D. B., et al. (2013). Geoarchaeota: a new candidate phylum in the Archaea from high-temperature acidic iron mats in Yellowstone National Park. *ISME J.* 7, 622–634.

Kreisl, P., and Kandler, O. (1986). Chemical structure of the cell wall polymer of *Methanosarcina*. *Syst. Appl. Microbiol.* 7, 293–299. doi: 10.1016/S0723-2020(86) 80022-4

Kreisl, P., Kandler, O. (1986) Chemical structure of the cell wall polymer of *Methanosarcina*. *Syst. Appl. Microbiol.* 7, 293–299

Kupcu, S., Sara, M., Sleytr, U.B. (1995). Liposomes coated with crystalline bacterial cell surface protein (Slayer) as immobilization structures for macromolecules. *Biochim. Biophys. Acta*, 1235:263–269

Kyte, J; Doolittle, R. F. (1982). "A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein". *Journal of Molecular Biology.* 157 (1): 105–32.

- Lakowicz, JR (2006). Protein Fluorescence, In *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, pp 530-577, Springer, 3rd Edition.
- Lechner, J., and M. Sumper. (1987). The primary structure of a procaryotic glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 262:9724-9729
- Litchfield, C.D. (2011) Potential for industrial products from the halophilic Archaea. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 38:1635–1647.
- Liu, J., Falke, S., Drobot, B., Oberthuer, D., Kikhney, A., Guenther, T. et al., (2016). Analysis of self-assembly of S-layer protein slp-B53 from *Lysinibacillus sphaericus*. *European Biophysics Journal*. <https://doi.org/10.1007/s00249-016-1139-9>
- Lorber, B., Fischer, F., Bailly, M., Roy, H. and Kern, D. (2012), Protein analysis by dynamic light scattering: Methods and techniques for students. *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, 40: 372–382.
- Mader, C.; Kupcu, S.; Sara, M.; Sleytr, U.B. (1999). Stabilizing effect of an S-layer on liposomes towards thermal or mechanical stress. *Biochim. Biophys. Acta*, 1418:106–116.
- Magidovich, H., Yurist-Doutsch, S., Konrad, Z., Ventura, V. V., Dell, A., Hitchen, P. G., et al. (2010). AgIP is a S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase that participates in the N-glycosylation pathway of *Haloferax volcanii*. *Mol. Microbiol.* 76, 190–199.
- Malcolm A.J., Best M.W., Szarka R.J., et al. (1993). Surface layers from *Bacillus alvei* as a carrier for a *Streptococcus pneumoniae* conjugate vaccine. In: *Advances in Paracrystalline Bacterial Surface Layers*. Eds. Breveridge T.J., Roval S.F. N.Y.: Plenum Press, 219–233.
- Mayr, J., Lupas, A., Kellermann, J., Eckerskorn, C., Baumeister, W., and Peters, J. (1996). A hyperthermostable protease of the subtilisin family bound to the surface layer of the Archaeon *Staphylothermus marinus*. *Curr. Biol.* 6, 739–749.

- Meng, J., Xu, J., Qin, D., He, Y., Xiao, X., and Wang, F. (2014). Genetic and functional properties of uncultivated MCG archaea assessed by metagenome and gene expression analyses. *ISME J.* 8, 650–659.
- Messner, P., and Sleytr, U. B. (1992). Crystalline bacterial cell surface layers. *Adv. Microb. Physiol.* 33, 213–275.
- Mevarech, M., Frolow, F., Gloss, L. M. (2000) Halophilic enzymes: proteins with a grain of salt. *Biophys. Chem.* 86, 155–164
- Meyer, B. H., and Albers, S. V. (2013). Hot and sweet: protein glycosylation in Crenarchaeota. *Biochem. Soc. Trans.* 41, 384–392.
- Mullakhanbhai MF, Larsen H (1975) Halobacterium volcanii spec. nov., a Dead Sea Halobacterium with a moderate salt requirement. *Arch Microbiol* 104: 207–214
- Myller, AT; et al. (2010). "Preparation of aminofunctionalized TiO₂ surfaces by binding of organophosphates". *Applied Surface Science.* 257 (5): 1616.
- Ng, W. V. et al. (2000) Genome sequence of Halobacterium species NRC-1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97, 12176–12181
- Nicolini C. (1996) Supramolecular architecture and molecular bioelectronics. *Thin Solid Films* 284–285, 1–5.
- Nunoura, T., Takaki, Y., Kakuta, J., Nishi, S., Sugahara, J., Kazama, H., et al. (2011). Insights into the evolution of Archaea and eukaryotic protein modifier systems revealed by the genome of a novel archaeal group. *Nucleic Acids Res.* 39, 3204–3223.
- Nußler, E., König, H. (1987). S layer studies on three species of Methanococcus living at different temperatures. *Can. J. Microbiol.* 33, 256–261
- Olsen, J.G.; Lane, D.J.; Giovannoni, S.J.; Pace, N.R.; Stahl, D.A. (1986) Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annual Review of Microbiology*, 40: 337-365.

- Oren, A. (1999) Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 334–348
- Pace CN, Shirley BA, Thomson JA (1989). Measuring the conformational stability of a protein. In: Creighton TE, editor. *Protein structure*. chap 13. IRL Press; New York. pp. 311–330
- Pankhurst, Q.A.; Connolly, J.; Jones, S.K.; Dobson, J. (2003). Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J. Physics D: Appl. Physics*, 36:R167-R181
- Parte, A.C. (2013). LPSN — list of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic Acids Research*, 42, Issue D1, D613–D616
- Peters, J., Baumeister, W., and Lupas, A. (1996). Hyperthermostable surface layer protein tetrabrachion from the archaeobacterium *Staphylothermus marinus*: evidence for the presence of a right-handed coiled coil derived from the primary structure. *J. Mol. Biol.* 257, 1031–1041.
- Peters, J., Nitsch, M., Kühlmorgen, B., Golbik, R., Lupas, A., Kellermann, J., et al. (1995). Tetrabrachion: a filamentous archaeobacterial surface protein assembly of unusual structure and extreme stability. *J. Mol. Biol.* 245, 385–401.
- Peyfoon, E., Meyer, B., Hitchen, P. G., Panico, M., Morris, H. R., Haslam, S. M., et al. (2010). The S-layer glycoprotein of the crenarchaeote *Sulfolobus acidocaldarius* is glycosylated at multiple sites with chitobiose-linked N-Glycans. *Archaea* 2010:754101
- Prado-Acosta, M., Palomino, M.M., Allievi, M.C., Rivas, C.S., Ruzal, S.M., (2008). Murein hydrolase activity in the surface layer of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(24), 7824-7827.
- Pum, D., Toca-Herrera, J. L., Sleytr, U. B. (2013). S-layer protein self-assembly. *International journal of molecular sciences*, 14(2), 2484–501

- Pum, D.; Weinhand, M.; Hodl, C.; Sleytr, U.B. (1993). Large-scale recrystallization of the S-layer of *Bacillus coagulans* E-3866 at the air-water interface and on lipid films. *J. Bacteriol.*, 175:2762–2766
- Rinke, C., Schwientek, P., Sczyrba, A., Ivanova, N. N., Anderson, I. J., Cheng, J. F., et al. (2013). Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature* 499, 431–437.
- Rivera, M. C., Jain, R., Moore, J. E., and Lake, J. A. (1998). Genomic evidence for two functionally distinct gene classes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 6239–6244.
- Rodrigues-Oliveira T, Belmok A, Vasconcellos D, Schuster B, Kyaw CM (2017) Archaeal S-Layers: Overview and Current State of the Art. *Front. Microbiol.* 8:2597.
- Sackmann, E. (1996). Supported membranes: Scientific and practical application. *Science*, 271:43–48
- Sambrook, L.; Russell (2006). SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. *CSH Protocols*.
- Sara M., Sleytr U.B. (1987). Molecular sieving through S-layers of *Bacillus stearothermophilus* strain. *Journal Bacteriology*. 169, 4092–4098.
- Sara, M.; Sleytr, U. B. (1996). Crystalline bacterial cell surface layers (S-layers): from cell structure to biomimetics. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 65: 83–111
- Sára, M; Sleytr, U.B. 2000. S-Layer Proteins. *Journal Bacteriology* 182(4): 859-868.
- Scheffers, D. J., Pinho, M. G. (2005) Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69, 585–607
- Schindler, H. (1989). Planar lipid-protein membranes: Strategies of formation and detecting dependencies of ion transport functions on membrane conditions. *Methods Enzymol.*, 171:225–253.

- Schleifer, K.H. (2009). "Classification of Bacteria and Archaea: past, present and future." *Systematic and Applied Microbiology* 32(8): 533-542
- Schuster B, Sleytr UB. (2014) Biomimetic interfaces based on S-layer proteins, lipid membranes and functional biomolecules. *J. R. Soc. Interface* 11: 20140232
- Schuster, B.; Pum, D.; Braha, O.; et al. (1998). Self assembled α -hemolysin pores in an S-layer-supported lipid bilayer. *Biochim. Biophys. Acta - Biomemb.*, 1370:280–288.
- Schuster, B; Sleytr, UB (2009) Composite S-layer lipid structures. *J Struct Biol.* 168(1): 207–216
- Seitz, K. W., Lazar, C. S., Hinrichs, K. U., Teske, A. P., and Baker, B. J. (2016). Genomic reconstruction of a novel, deeply branched sediment archaeal phylum with pathways for acetogenesis and sulfur reduction. *ISME J.* 10, 1696–1705.
- Selenska-Pobell, S.; Reitz, T.; Schönemann, R.; Herrmansdörfer, T.; Merroun, M.; Geißler, A.; Bartolomé, J.; Bartolomé, F.; García, L.M.; Wilhelm, F.; Rogalev, A. (2011). Magnetic Au Nanoparticles on Archaeal S-Layer Ghosts as Templates. *Nanomat. Nanotechnol.*, 1(2):8–16.
- Shen HH, Lithgow T, Martin LL. (2013) Reconstitution of membrane proteins into model membranes: seeking better ways to retain protein activities. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 1589–1607
- Sleytr U.B., Mundt W., Messner P., Smith R.H., Unger F.M. (1991). Immunogenic composition containing ordered carriers. US Patent 5.043.158
- Sleytr U.B., Sara M. (1987). Ultrafiltration membranes with uniform pores from crystalline bacterial cell envelope layers. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 25, 83–90.
- Sleytr, U. B., Huber, C., Ilk, N., Pum, D., Schuster, B., Egelseer, E. M. (2007). S-layers as a tool kit for nanobiotechnological applications. *FEMS Microbiology Letters*, 267(2), 131–144.

- Sleytr, U. B., Schuster, B., Egelseer, E.M., and Pum, D. (2014). S-layers: principles and application. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 823–864
- Sleytr, U.B.; Messner, P.; Pum, D.; Sara, M. (1996). Crystalline bacterial cell surface proteins. Austin, TX: Academic Press.
- Sowers, K. R., Baron, S. F., and Ferry, J. G. (1984). Methanosarcina acetivorans sp. nov., an acetotrophic methane-producing bacterium isolated from marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 971–978.
- Sowers, K. R., Boone, J. E., and Gunsalus, R. P. (1993). Disaggregation of Methanosarcina spp. and growth as single cells at elevated osmolarity. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3832–3839.
- Spang, A., Saw, J. H., Jørgensen, S. L., Zaremba-Niedzwiedzka, K., Martijn, J., Lind, A. E., et al. (2015). Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Nature* 521, 173–179.
- Stan-Lotter, H., & Fendrihan, S. (2015). Halophilic Archaea: Life with Desiccation, Radiation and Oligotrophy over Geological Times. *Life*, 5(3), 1487–1496.
- Steensland, H., and Larsen, H. (1969). A study of the cell envelope of the halobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 55, 325–336
- Stetefeld, J., Jenny, M., Schulthess, T., Landwehr, R., Engel, J., and Kammerer, R. A. (2000). Crystal structure of a naturally occurring parallel right-handed coiled coil tetramer. *Nat. Struct. Biol.* 7, 772–776.
- Stoeckenius, W., and Rowen, R. (1967). A morphological study of Halobacterium halobium and its lysis in media of low salt concentration. *J. Cell Biol.* 34, 365–393.
- Sumper, M., Berg, E., Mengele, R., Strobel, I. (1990). Primary Structure and Glycosylation of the S-layer Protein of Haloferax volcanii. *Journal of Bacteriology*, 172(12):7111-7118
- Thauer, R.K. (1998). Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. *Microbiology* 144: 2377-2406.

- Tiefenauer L, Demarche S. (2012) Challenges in the development of functional assays of membrane proteins. *Materials* 5, 2205–2242
- Trachtenberg, S., Pinnick, B., and Kessel, M. (2000). The cell surface glycoprotein layer of the extreme halophile *Halobacterium salinarum* and its relation to *Haloferax volcanii*: cryo-electron tomography of freeze-substituted cells and projection studies of negatively stained envelopes. *J. Struct. Biol.* 130, 10–26.
- Vanwonterghem, I., Evans, P. N., Parks, D. H., Jensen, P. D., Woodcroft, B. J., Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2016). Methylo-trophic methanogenesis discovered in the archaeal phylum Verstraetearchaeota. *Nature Microbiology*, 1(12), 1–9.
- Veith, A., Klingl, A., Zolghadr, B., Lauber, K., Mentele, R., Lottspeich, F., et al. (2009). Acidianus, Sulfolobus and Metallosphaera surface layers: structure, composition and gene expression. *Mol. Microbiol.* 73, 58–72.
- Vyas SP, Subhedar R, Jain S. (2006) Development and characterization of emulsomes for sustained and targeted delivery of an antiviral agent to liver. *J. Pharm. Pharmacol.* 58, 321–326
- Wetzer, B.; Pfandler, A.; Gyozyvary, E.; et al. (1998). S-layer reconstitution at phospholipid monolayers. *Langmuir*, 14:6899–6906
- Whittaker, R.H. (1969) New concepts of kingdoms of organisms. *Science*, 163:150-160.
- Wildgruber, G., Thomm, M., König, H., Ober, K., Richiuto, T., and Stetter, K. O. (1982). *Methanoplanus limicola*, a plate-shaped methanogen representing a novel family, the methanoplanaceae. *Arch. Microbiol.* 132, 31–36
- Woese, C. R.; Fox, G.E. (1977). "Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74(11): 5088-5090.

- Woese, C.R.; Kandler, O.; Wheelis, M.L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87:4576-4579.
- Yuji Nishimura, Tadashi Eguchi (2006). Biosynthesis of Archaeal Membrane Lipids: Digeranylgeranyl glycerophospholipid Reductase of the Thermoacidophilic Archaeon *Thermoplasma acidophilum*, *The Journal of Biochemistry*, Volume 139, Issue 6, 1, Pages 1073–1081
- Yurist-Doutsch, S., Abu-Qarn, M., Battaglia, F., Morris, H. R., Hitchen, P. G., Dell, A., et al. (2008). AgIF, agIG and agII, novel members of a gene island involved in the N-glycosylation of the *Haloferax volcanii* S-layer glycoprotein. *Mol. Microbiol.* 69, 1234–1245.
- Zabel, H. P., König, H., and Winter, J. (1984). Isolation and characterization of a new coccoid methanogen, *Methanogenium tatii* spec. nov. from a solfataric field on Mount Tatio. *Arch. Microbiol.* 137, 308–315.
- Zuckermandl, E.; Pauling, L. (1965) Molecules as documents of evolutionary history. *Journal of Theoretical Biology*, 8(2): 357-366.

Anexo I. Publicações realizadas durante o período de doutorado

Artigos completos publicados em periódicos

- **Rodrigues-Oliveira, T.;** Belmok, A.; Vasconcellos, D.; Schuster, B.; Kyaw, C.M. (2017) . Archaeal S-Layers: Overview and Current State of the Art. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p. 1-17.
- **Rodrigues, T.;** Belmok, A.; Catão, E.; Kyaw, C. M. (2016). Archaea in Natural and Impacted Brazilian Environments. *ARCHAEA*, v. 2016, p. 1-14.
- **Rodrigues, T.;** Catão, E.; Bustamante, M. M. C.; Quirino, B. F.; Kruger, R. H.; Kyaw, C. M. (2014) Seasonal Effects in a Lake Sediment Archaeal Community of the Brazilian Savanna. *ARCHAEA*, v. 2014, p. 1-9.

Capítulos de livros publicados

- **Rodrigues-Oliveira, T.;** Belmok, A. ; Kyaw, C.M. (2016). Northern blot: detecção de RNA por hibridização em membranas. In: Marlene Teixeira De-Souza; Marcelo Macêdo Brígido; Andréa Queiroz Maranhão. (Org.). *Técnicas Básicas em Biologia Molecular*. 2ed.Brasília: Editora UnB, v. 2, p. 265-272.
- Belmok, A. ; **Rodrigues-Oliveira, T. ;** Kyaw, C.M. (2016). Southern Blot: detecção de fragmentos de DNA imobilizados em membranas. In: Marlene Teixeira De-Souza; Marcelo de Macêdo Brígido; Andréa Queiroz Maranhão. (Org.). *Técnicas Básicas em Biologia Molecular*. 2ed.Brasília: Editora UnB, v. 2, p. 231-250.

Manuscritos em preparação

- **Rodrigues-Oliveira, T.;** Souza, A.; Kruger, R.; Schuster, B.; Freitas, S.M.; Kyaw, C.M. (in preparation). Effects of pH, temperature and salinity on the *Haloferax volcanii* S-layer protein structure.