

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Proteínas *moonlighting* e sua relação com a patogenicidade da bactéria
Xanthomonas citri subsp. *citri*, causadora do cancro cítrico

Jéssica Camila Ferreira

São Carlos

Abril 2022

Proteínas *moonlighting* e sua relação com a patogenicidade da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, causadora do cancro cítrico

Jéssica Camila Ferreira

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos como requisito para obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientadora: Prof. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza

São Carlos

Abril 2022



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - DQ/CCET

Rod. Washington Luís km 235 - SP-310, s/n - Bairro Monjolinho, São Carlos/SP, CEP 13565-905

Telefone: (16) 335 18206 - <http://www.ufscar.br>

DP-TCC-FA nº 1/2022/DQ/CCET

Graduação: Defesa Pública de Trabalho de Conclusão de Curso

Folha Aprovação (GDP-TCC-FA)

FOLHA DE APROVAÇÃO

JÉSSICA CAMILA FERREIRA

PROTEÍNAS MOONLIGHTING E SUA RELAÇÃO COM A BACTÉRIA XANTHOMONAS CITRI SUBSP. CITRI, CAUSADORA DO CANCRO CÍTRICO

Trabalho de Conclusão de Curso

Universidade Federal de São Carlos - Campus São Carlos

São Carlos, 11 de abril de 2022

ASSINATURAS E CIÊNCIAS

Cargo/Função	Nome Completo
Orientadora	Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza
Membro da Banca 1	Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur
Membro da Banca 2	Dra. Kelli Micocci



Documento assinado eletronicamente por **Caio Marcio Paranhos da Silva, Professor(a)**, em 11/04/2022, às 16:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.ufscar.br/autenticacao>, informando o código verificador **0651132** e o código CRC **BED6C2EC**.

Referência: Caso responda a este documento, indicar expressamente o Processo nº 23.112.009979/2022-33

SEI nº 0651132

Modelo de Documento: Grad-Defesa TCC-Folha Aprovação, versão de 02/Agosto/2019

Cmid: Defesa TCC-Folha Aprovação 1 (0651132)

SEI 23112.009979/2022-33 / pg. 5

Agradecimentos

Agradeço a meu pai por acreditar em mim e ser meu maior apoiador e amigo durante toda a graduação. Minha mãe por estar ao meu lado sempre que precisei. Meus irmãos que me despertam a vontade de ser sempre melhor. Minha tia Márcia, minha madrinha Maria Luiza e minha avó, Maria da Glória, que não estão mais entre nós mas que foram essenciais para minha formação. Meus amigos de vida, Nathalia, Lidiane, Guilherme, Silvia, que me apoiaram sempre e estão juntos na minha trajetória desde muito cedo. Meus amigos da república, banho de lua, que foram indo e vindo ao longo dos anos, Eduardo, Paula, Carlos, Guilherme, Christian, Alexandre, Bruno, Juliana, Mislá, que me fizeram crescer como pessoa, me acolheram e me ensinaram viver como uma grande família fora de casa. Aos amigos que fiz durante toda a graduação Fábio, Andrés, Emmanuel, Lucas, Vinícius e Gustavo. Meus gatos Príncipe, Haru e Ritinha, que me fizeram companhia nos momentos mais difíceis que já passei. Ao meu companheiro Eduardo, que esteve comigo durante toda a pandemia.

À prof. Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur que me deu a oportunidade de ser cientista, me orientou durante muitos anos no laboratório, no estágio, me acompanhou em experimentos e confiou no meu potencial.

Ao pessoal do LBBMA, Evandro, Solange, Vinícius, Carol, Yuri, André, Mariana e Beatriz, com quem aprendi muito. À Regina, que me apoiou, ajudou sempre com os experimentos, me deu muitos conselhos e se tornou uma grande amiga.

À prof. Dra. Dulce Helena Ferreira pela parceria, que não só me orientou neste trabalho mas também sempre disponibilizou seu laboratório para podermos realizar experimentos.

Aos professores, Dra. Fernanda de Freitas Anibal do DMP — UFSCar, Dr. Francisco Eduardo Gontijo Guimarães do IFSC — USP e Dr. Hugo Miguel Preto de Moraes Sarmiento do Dhb — UFSCar, por disponibilizarem seu tempo e laboratório para me ajudar com experimentos.

Ao prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza do DMP — UFSCar, que ministrou a disciplina de microbiologia e me inspirou como profissional e cientista.

Resumo

A citricultura está presente no Brasil desde sua colonização, quando mudas de laranja foram trazidas e comercializadas. Devido ao solo fértil e clima favorável, ao longo das décadas, o Brasil se tornou o maior produtor de laranjas e exportador de suco de laranja do mundo, gerando muito lucro para o país. Porém, com o passar do tempo também se desenvolveu diversas doenças que trazem grandes prejuízos para a citricultura e muitas delas ainda não têm cura. O cancro cítrico é uma delas e é causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac). Muitas pesquisas têm sido realizadas a fim de elucidar o mecanismo de infecção da bactéria no hospedeiro, como elas fazem para se defender e porque são tão virulentas. Após uma análise proteômica da superfície celular realizada em Xac em duas condições diferentes, de infecção no hospedeiro e não infecção, foram constatadas diferentes quantidades de algumas proteínas na superfície, onde muitas delas já haviam sido relatadas e relacionadas com a virulência em outras bactérias e foram classificadas como proteínas *moonlighting*, que são proteínas que possuem uma função bem definida, geralmente no citosol, mas que também foram encontradas desempenhando funções completamente diferentes em outras regiões celulares, na maioria das vezes na superfície. Tais proteínas podem estar relacionadas com a produção de biofilme, resposta de defesa contra o hospedeiro, adesão das bactérias nas superfícies e diversas outras funções. Estudos realizados nos últimos anos tentaram desvendar seus possíveis mecanismos de reconhecimento dentro da célula e como são secretadas para fora, além de tentar entender quais funções elas possuem quando estão na superfície. Neste trabalho, os tópicos citados acima foram abordados de forma detalhada e discutiu-se a possível relação das proteínas *moonlighting* encontradas superficialmente com a virulência da bactéria causadora do cancro cítrico.

Abstract

Citriculture has been present in Brazil since its colonization when orange seedlings were imported and commercialized. Due to the fertile soil and favorable climate, over the decades, Brazil has become the largest producer of oranges and exporter of orange juice worldwide, generating a lot of profit for the country. Nevertheless, over time, several diseases that bring significant losses to the citrus industry have also developed, and many of them still have no cure. Citrus canker is one of them and is caused by the bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac). Many investigations have been carried out to elucidate the infection mechanism of the bacteria in the host, how they defend themselves and why they are so virulent. After a proteomic analysis of the cell surface performed on Xac under two different conditions, host infection and non-infection, different amounts of some proteins on the surface were found, being many of them already reported and related to virulence in other bacteria and classified as moonlighting proteins, which are proteins that have a well-defined function usually in the cytosol, but were also found performing completely different functions in other cellular regions, mostly on the surface. Such proteins may be related to biofilm production, defense response against the host, adhesion of bacteria to surfaces, and various other functions. Studies in recent years have tried to unravel their possible recognition mechanisms inside the cell and how they are secreted out, as well as trying to understand what functions they have when they are on the surface. In this work, the topics mentioned above were addressed in detail and the possible relationship of surface moonlighting proteins with the virulence of the citrus canker-causing bacteria was discussed.

Lista de ilustrações

- Figura 1. Bactérias *Xanthomonas citri* subsp. *citri* vistas através de microscopia confocal, com proteínas Dnak superficiais marcadas com FITC.....11
- Figura 2. Sintomas de cancro cítrico nas folhas, galhos e frutos de laranjas.....12
- Figura 3. Mapa do cinturão citrícola com as respectivas percentagens de árvores contaminadas em cada região.....13
- Figura 4. Gráfico do percentual de crescimento de árvores sintomáticas no período de 2017 a 2020.....13
- Figura 5. A) Exemplo de quebra-vento em plantações. B) Estrago causado pelo inseto conhecido como minador de citrus.....15
- Figura 6. Figura ilustrativa dos possíveis mecanismos de secreção de proteínas *Moonlighting*.....20
- Figura 7. Biofilme produzido por Xac marcados com GFP.....22
- Figura 8. Desenvolvimento do cancro em folhas de limão.....22
- Figura 9. Proteínas de superfície de XAC encontradas diferencialmente entre as condições infecciosa e não infecciosa.....24

Sumário

Introdução.....	10
1. Citricultura no Brasil.....	11
2. O cancro cítrico.....	11
3. O Cinturão Citrícola.....	12
4. Proteínas <i>Moonlighting</i>	15
4.1. Secreção de proteínas <i>moonlighting</i>	17
4.2. Reconhecimento das proteínas <i>moonlighting</i>	18
4.3. Hipóteses de secreção	19
4.4. A relação de proteínas <i>moonlighting</i> com a produção de biofilme.....	20
4.5. Relação das proteínas <i>moonlighting</i> com a bactéria <i>Xanthomonas citri</i> <i>subsp. Citri</i>	23
Considerações Finais.....	26
Referências bibliográficas	2

Introdução

1. Citricultura no Brasil

No início da colonização do Brasil mudas de laranja foram trazidas da Europa para serem cultivadas e, devido às condições climáticas e solo fértil, seu cultivo expandiu-se por todo o território nacional. A partir da década de 1920 foi criado o primeiro núcleo citrícola nacional nos arredores de Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, o qual era responsável pelo abastecimento das cidades do Rio de Janeiro e São Paulo e logo depois iniciou a exportação da fruta para a Argentina, Inglaterra e outros países europeus (NEVES et al. 2010). Na década de 1940 a produção de café sofreu uma grande crise e as plantações de laranja foram se expandindo para o interior paulista. Com o avanço da tecnologia o Brasil se tornou o maior produtor de laranjas e exportador de suco de laranja do mundo, exportando 98% da sua produção (NEVES et al. 2010). As estimativas realizadas pelo FUNDECITRUS para as safras de 2021/2022 são de 294,7 milhões de caixas de laranja de 40,8 kg cada e que apesar de serem maiores do que da safra de 2020/2021 ainda estão 10,53% abaixo da média das últimas dez safras devido ao atraso das chuvas e das altas temperaturas que levaram ao abortamento dos frutos sem levar em conta os problemas relacionados às pragas e doenças.

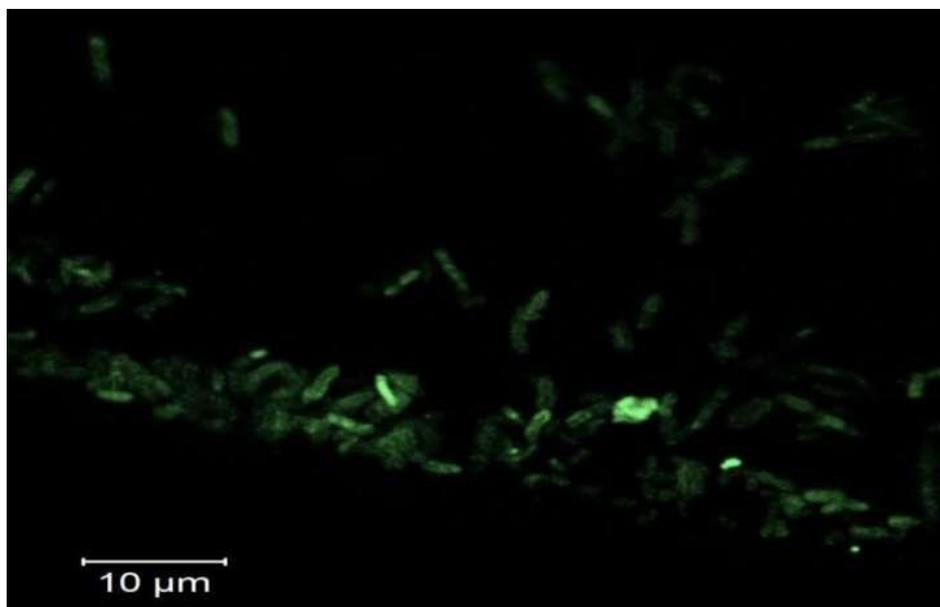
Há diversas doenças que afetam a citricultura a nível mundial, ocasionando grande perda da produção e prejuízo aos citricultores. Segundo o Guia de Controle de Pragas e Doenças de 2022 do FUNDECITRUS a maioria delas não possuem cura, apenas medidas de controle que não são tão eficazes. São elas: o greening, doença que afeta todos os citros, considerada a pior dentre todas e é causada pela bactéria *Candidatus liberibacter asiaticus* que se espalha pelas raízes, caule, galhos, folhas e frutos através do floema, levando a planta à morte. A pinta preta é causada pelo fungo *Phyllosticta citricarpa* (*Guignardia citricarpa*) e leva à queda prematura dos frutos, gerando prejuízos de até 85% na produção. Já a podridão floral, provocada por alguns fungos dos complexos *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides*, leva a contaminação das flores que causa a queda prematura dos frutos ainda verdes e bem pequenos. A leprose, causada pelo vírus *Citrus leprosis virus* além de causar a queda prematura dos frutos também

reduz a vida útil da árvore. A clorose variegada dos citros, também conhecida como CVC, é causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* que se desenvolve no xilema e atrapalha a distribuição de água e nutrientes das raízes para a copa, levando ao amadurecimento precoce e endurecimento do fruto provocando sua queda. O cancro cítrico também é uma das principais doenças que afetam a citricultura brasileira e será melhor detalhado a seguir.

2. O cancro cítrico

O cancro cítrico originou-se na Ásia e foi observado pela primeira vez no Brasil em 1957, nos estados de São Paulo e Paraná (NEVES et al. 2010). Esta doença afeta a maioria dos citros de grande importância comercial e é causada pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, uma bactéria Gram-negativa, em forma de bacilos (Fig. 1).

FIGURA 1: Bactérias *Xanthomonas citri* subsp. *citri* vistas através de microscopia confocal, com proteínas Dnak superficiais marcadas com FITC.



Existem três tipos de cancores mais frequentes que são do tipo A, B e C. A cancorese do tipo A é causada pela *Xanthomonas citri* subsp. *citri* tipo A (Xac) e é a

mais agressiva dentre as três (GOTO 2016), seguida pela cancrose do tipo B, causada pela *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo B (Xau-B) e a cancrose C causada pela *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C (Xau-C), sendo esta, de origem brasileira e que têm como único hospedeiro, o limão galego (SCHAAD et al. 2016). Sua infecção acontece através dos estômatos ou lesões nas folhas e galhos acarretando na queda prematura dos frutos, desfolha dos galhos, desvalorização dos frutos devido à presença de lesões (Fig. 2) e consequentemente também gera restrição na comercialização para áreas livres da doença.

FIGURA 2: Sintomas de cancro cítrico nas folhas, galhos e frutos de laranjas. Fonte: <https://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro>.



3. O Cinturão Citrícola

Cinturão citrícola é o nome dado à região de onde saem mais de 80% das laranjas produzidas no Brasil e se estende do sul do estado de São Paulo até a região do triângulo mineiro. Este território é comumente dividido em cinco setores: Noroeste, Norte, Centro, Sul e Sudoeste. No levantamento anual de 2020 feito pelo FUNDECITRUS, estima-se que o cancro cítrico está presente em todas as regiões e cerca de 24,59% dos talhões estão contaminados, mostrando um aumento de 9% se comparado com o levantamento do ano anterior e 17,26% das árvores também possuem a doença que é equivalente a 34 milhões de árvores (Fig. 3 e 4). Dentre todas as regiões, a Noroeste é a mais afetada, com 73,16% de talhões e 57,57% das árvores contaminadas e a região Sul a menos afetada, com 3,24% de talhões e 2,08% de árvores doentes. Como o aumento da doença nas plantas provoca a queda prematura dos frutos, na safra 2019/2020 houve um aumento de 0,08% ponto percentual em relação à safra anterior, totalizando

0,38% de perda dos frutos antes da colheita. As maiores taxas de queda pelo cancro cítrico ocorreram nas regiões de São José do Rio Preto, com 1,26%, e Votuporanga, com 1,12%.

FIGURA 3: Mapa do cinturão citrícola com as respectivas porcentagens de árvores contaminadas em cada região. Fonte: Levantamento anual

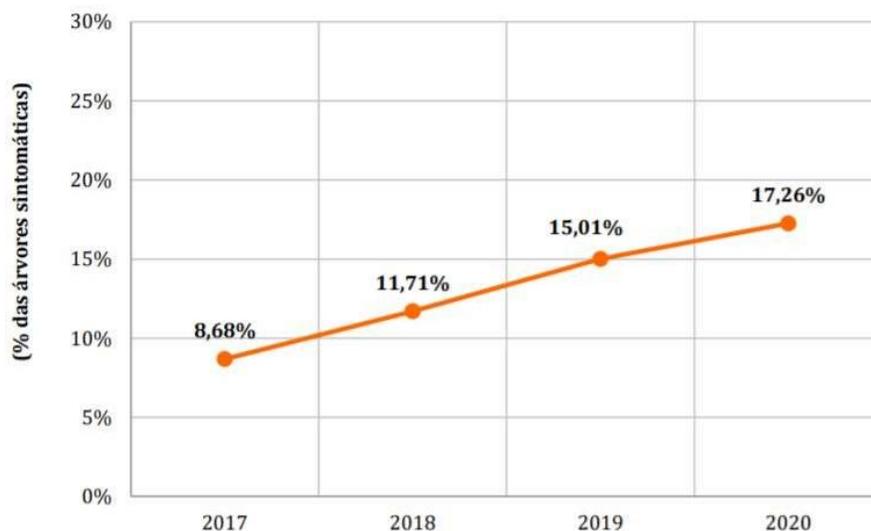
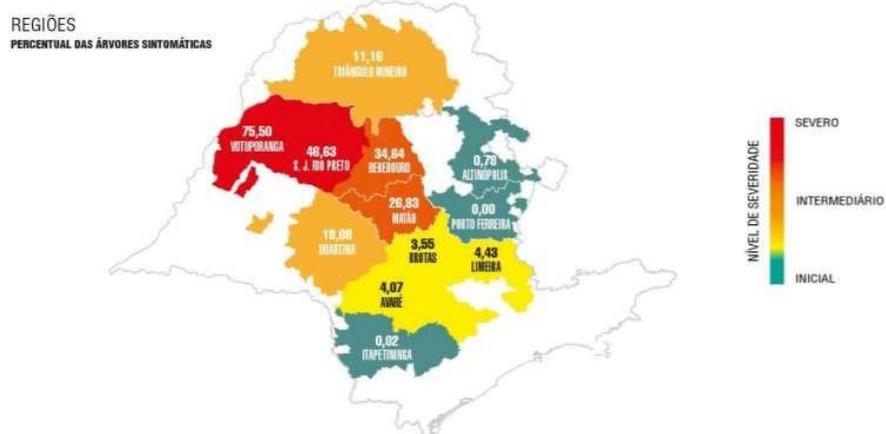


FIGURA 4: Gráfico do percentual de crescimento de árvores sintomáticas no período de 2017 a 2020. Fonte: Levantamento anual do FUNDECITRUS 2020.

CINTURÃO CITRÍCOLA = 17,26% DAS ÁRVORES SINTOMÁTICAS

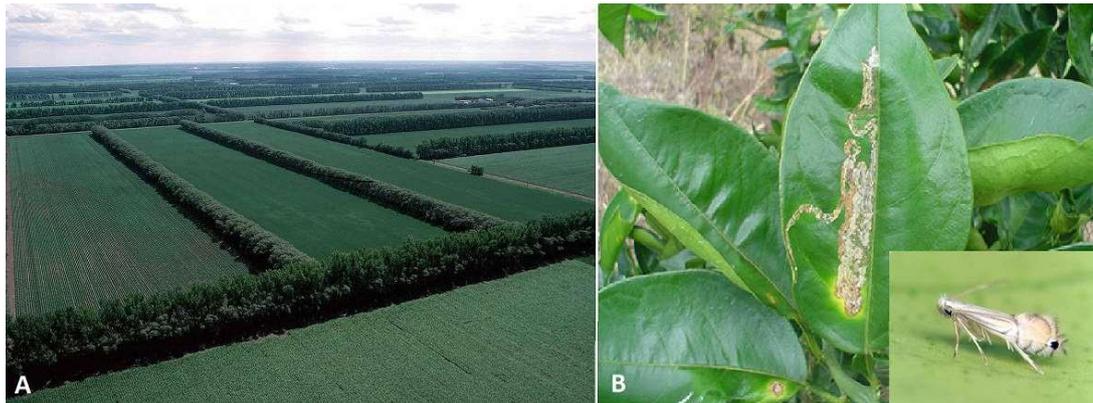


Como o cancro cítrico não possui cura, a forma de contê-lo é apenas com medidas de controle, antes não tão eficazes. Até o ano 2018, quando houve mudanças na legislação, essas medidas eram muitas vezes negligenciadas pelos agricultores e ao identificar a contaminação em seus pomares eles a mantinham em segredo, pois a medida a ser tomada nestes casos eram a queima de boa parte das árvores e uma área à sua volta acarretando em grandes prejuízos. Isto fez com que a doença se alastrasse cada vez mais pelo país (FUNDECITRUS 2020). Desde 2010 pesquisas sobre o manejo da doença foram intensificadas e otimizadas levando a uma modernização do manejo do cancro cítrico, deixando-o mais eficiente, sustentável e menos custoso ao produtor.

- As medidas de controle aplicadas atualmente segundo o FUNDECITRUS são:
 - I) Quebra-vento: são plantadas árvores nos limites das propriedades, e entre os talhões, com espaçamento de 100 a 400 metros e perpendiculares à direção do vento. Esta barreira atua como um obstáculo de disseminação da bactéria pelos ventos além de impedir que a planta sofra lesões facilitando a entrada da bactéria (Fig. 5a).
 - II) Utilização de mudas sadias e resistentes: a compra de mudas sadias, com certificação da Coordenadoria de defesa Agropecuária (CDA) ou o uso de plantas resistentes ou menos suscetíveis à contaminação (não significa que são imunes), pode reduzir as medidas de controle utilizadas e também os custos.
 - III) Cobre: apesar do uso de cobre não impedir a entrada da bactéria no pomar, ele atua principalmente na redução da quantidade de sintomas da planta e na prevenção da queda dos frutos. Pesquisas recentes identificaram que há um estágio em que os frutos são mais suscetíveis à infecção o que levou a uma otimização do uso do cobre nessa época. Os bactericidas de cobre formam uma camada protetora nas folhas e frutos, impedindo a evolução da contaminação, deixando-as menos predispostas, o que não significa a imunização total já que existe uma quantidade máxima de cobre permitida e também não há como garantir que ele será aplicado de forma homogênea em todo o pomar.

IV) Controle do minador dos citros: este inseto (*Phyllocnistis citrella*), conhecido popularmente como o minador dos citros, provoca lesões na planta, principalmente nos brotos, facilitando a entrada da bactéria causadora da doença (Fig. 5b).

FIGURA 5: A) Exemplo de quebra-vento em plantações. Fonte: <https://stringfixer.com/pt/Shelterbelt> B) Estrago causado pelo inseto conhecido como minador de citrus. Fonte: <https://www.fundecitrus.com.br/pragas/minador>.



4. Proteínas *Moonlighting*

Proteínas do tipo *moonlighting* foram relatadas pela primeira vez em 1982, quando Thomas Ingolia e Elizabeth Craig, da Universidade de Wisconsin-Madison, estudavam quatro proteínas de choque térmico de *Drosophila*, hsp22, 23, 26 e 27 (HSP, do inglês *heat shock protein*) e após sequenciar e compararem com outras proteínas conhecidas ficaram surpresos ao descobrir a semelhança com a α -cristalina de mamíferos, proteína que constitui 35% dos olhos dos vertebrados (INGOLIA 1982). Desta relação foram levantadas diversas hipóteses e ao longo de mais estudos foram observados que a α -cristalina também era expressa em outros tecidos e quando isolada diretamente dos olhos dos mamíferos ela apresentava atividade de chaperona, *in vitro*, sugerindo que havia realizado essa atividade em outro tecido. A conclusão deste estudo foi que a mesma proteína, expressa a partir do mesmo gene, pode realizar duas ou mais funções não relacionadas em uma célula dependendo de onde, quando e quanto dela foi expressa. Em 1988, Joram Piatigorsky e colaboradores (HENDERSON 2016), deram o nome de compartilhamento de genes para este fenômeno e em 1999, Constance Jeffery utilizou o termo ``moonlighting`` para descrevê-lo (JEFFERY et al.1999).

Atualmente foram identificadas aproximadamente 700 proteínas *moonlighting* e um quarto delas estão relacionadas à virulência de patógenos bacterianos e fúngicos. Isso acontece porque suas funções primárias estão em vias metabólicas centrais, na maioria das vezes na função de chaperona e uma vez infectado, o hospedeiro terá dificuldade em reconhecer esse fator de virulência como não próprio reduzindo sua chance de produzir anticorpos (SINGH, N.; BHALLA, N. 2020). Em bactérias é geralmente observado proteínas *moonlighting* com funções intracelular/superficial onde podem intermediar a sinalização, adesão celular, participar na produção de biofilme ou até atuarem como toxinas (JEFFERY et al. 2017). Foi observado que muitas ligam-se a proteínas superficiais das células hospedeiras permitindo uma conexão direta com o host, como por exemplo, *Listeria* que utiliza a proteína de adesão álcool acetaldeído desidrogenase para se ligar às células epiteliais intestinais (KIM et al. 2006). Em *Streptococcus* (FULDE et al. 2014), *Mycoplasma* (BAO et al. 2013) e *Plasmodium falciparum* (READ et al. 1994), a enolase da glicólise foi encontrada desempenhando papel na ligação de plasminogênio, fibronectina e outras proteínas importantes na infecção de hospedeiros humanos, caninos e aviários. Porém, algumas vezes essas interações não são sinais de infecções como no caso da bactéria *Lactobacillus acidophilus* que utiliza GAPDH em sua superfície para ligar-se à mucina do intestino e ajudar na sua colonização (PATEL et al. 2016).

Alguns membros das famílias de proteínas HSP60/HSP10, HSP70, HSP90, HSP100 e HSP110 que são chaperonas responsáveis pelo enovelamento correto de complexos protéicos intracelulares, encontradas em diversos organismos, desde bactérias a seres humanos foram encontrados fora da célula com funções adicionais. A Dnak, uma HSP70, foi relacionada com a patogenicidade em *Staphylococcus aureus* (SINGH et al. 2012), *Bifidobacterium* (CANDELA et al. 2007), *Neisseria meningitidis* (KNAUST et al. 2007) e *Mycobacterium tuberculosis* (XOLAPA et al. 2007) e em estudos recentes, foi apontado que ela é secretada por uma via não convencional (KANG, Q; ZHANG, D. 2019), levantando a hipótese de que ela pode participar de algum mecanismo de defesa em algumas bactérias em situação de estresse produzida por sais biliares e falta de oxigênio (CANDELA et al. 2010).

A grande questão a respeito das proteínas *moonlighting* era: como elas podem exercer duas funções completamente diferentes na célula uma vez que é sua estrutura quem define sua função? Seria então necessária uma alteração na sua estrutura que resultaria na perda de sua função principal. Foi notado que elas passam por mudanças conformacionais, algumas radicais, onde ficam completamente distintas, com mudanças em seus sítios ativos, outras nem tanto, e que na maioria dos casos a função extracelular envolve a ligação a outra proteína (JEFFERY et al. 2017), isso porque ao longo de milhões de anos de evolução parte da superfície de uma enzima ou chaperona (que é grande e fica exposta ao solvente) pôde ganhar padrões de aminoácidos capazes de interagir com outras moléculas, como um receptor de superfície celular ou proteína, sem afetar seu sítio ativo (JEFFERY et al. 2000).

4.1 Secreção de proteínas *moonlighting*

Para algumas proteínas *moonlighting* sabe-se que há sinais enviados para que elas troquem de função, porém sabe-se muito pouco como elas são sinalizadas e secretadas para fora das células, já que elas não possuem uma sequência de sinal N-terminal, C-terminal, nem marcações utilizadas por outros sistemas de excreções conhecidos. Estudos recentes (KANG; ZHANG 2019) levantaram hipóteses sobre uma via de secreção não clássica. Inicialmente se imaginava que havia algum tipo de lise celular, pois as proteínas que estavam sendo encontradas na superfície eram proteínas abundantes no citosol e também na maioria das vezes eram encontradas durante a fase estacionária do crescimento celular (ANTELMANN et al. 2005). A Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) de *Streptococcus pneumoniae*, por exemplo, foi a primeira proteína excretada pelo método não clássico estudada e os resultados corroboram com a teoria de lise celular, pois era conhecida como uma proteína “pegajosa” e que se ligava a superfície de muitas

bactérias após excretadas (OLIVEIRA et al. 2012) mas com o passar do tempo foi descoberto que na verdade desempenha um papel importante na colonização do hospedeiro quando presente na superfície. Com o passar dos anos e o aperfeiçoamento das técnicas de proteômica e caracterização molecular, novos estudos mostraram que a lise celular não seria a responsável pela secreção dessas proteínas e sim algum tipo de via não clássica (YANG et al. 2011). Em um experimento, foram utilizados marcadores citoplasmáticos específicos para avaliar a integridade das células e quase nenhum marcador foi encontrado fora das células enquanto proteínas não secretadas classicamente estavam presentes em abundância (BECK et al. 2009; DREISBACH et al. 2010; KATAKURA et al. 2010). Há também o caso da Dnak, citada anteriormente, que é secretada em condições específicas de estimulação externa. Alguns estudos mostraram também que a estrutura terciária da proteína deve estar intacta para que ocorra a secreção não clássica, pois foram feitos mutantes com modificações em partes dessas estruturas e eles não foram secretados, mas encontrados no citosol (ZHAO et al. 2017). A via de secreção ainda não foi sistematicamente descoberta, mas foram propostos alguns possíveis mecanismos de acordo com o que se tem estudado até então. Nesta discussão há dois pontos a serem levantados que são essenciais, o primeiro é que para que a secreção ocorra, é necessário que a célula diferencie as proteínas *moonlighting* das proteínas que não deverão ser secretadas e o outro é a secreção em si, ou seja, todo o processo da passagem dessas proteínas pela membrana e parede celular.

4.2 Reconhecimento das proteínas *moonlighting*

Para serem secretadas, as proteínas comuns são sinalizadas por peptídeos sinais, localizados nos terminais –N ou –C dependendo da via Sec ou Tat, que são reconhecidos por elementos secretores que as guiam para o meio extracelular. Uma hipótese é que da mesma forma pode haver sequências peptídicas das proteínas não secretadas classicamente que atuam como sinal, mas que não são clivadas após serem transportadas (YANG et al. 2014). Experimentos realizados mostraram que a sequência terminal polar de algumas

proteínas é necessária para seu processo de secreção e inclusive essas sequências podem direcionar a secreção de proteínas citoplasmáticas que agem como um sinal guia na expressão proteica (PAN et al. 2016; ZHAO et al. 2017). Outra característica importante de proteínas *moonlighting* é que elas tendem a apresentar estruturas multiméricas (ZHAO et al. 2017) e levando isso em consideração levantou-se a hipótese de que essa estrutura é necessária para ser reconhecida e transportada e que se for alterada a região hidrofóbica dessas estruturas, elas também não são transportadas (WANG et al. 2018; ZHAO et al. 2017).

4.3 Hipóteses de secreção

As hipóteses levantadas de secreção de proteínas moonlighting são:

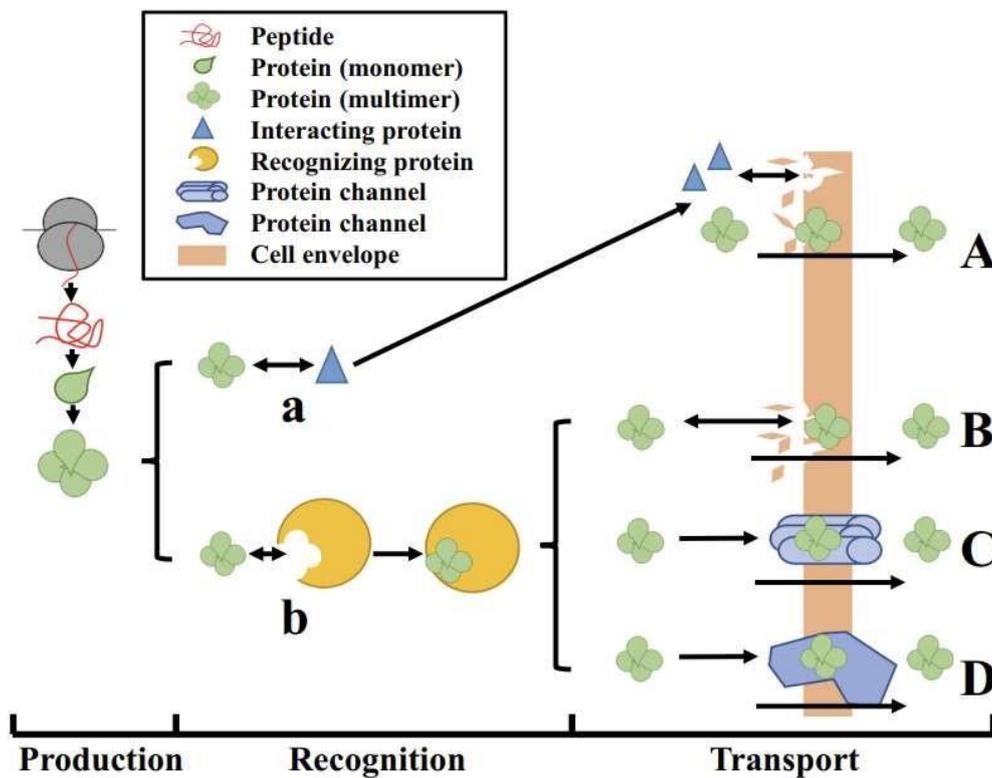
I) “Afrouxamento” da membrana: esta hipótese assume que há alguma substância que induz um “afrouxamento” da membrana ocasionando a saída de proteínas citoplasmáticas (Fig. 6A). Um exemplo deste caso é a PSM α 2, proteína citoplasmática em *Staphylococcus aureus* (EBNER et al. 2017). As PSM's (Phenol-soluble modulins) são peptídeos anfipáticos alfa-helicoidais que têm múltiplos papéis na patogênese estafilocócica e contribuem em grande parte para o sucesso patogênico de estafilococos virulentos, como o *staphylococcus aureus*. PSMs podem causar lise de muitos tipos de células humanas, incluindo leucócitos e eritrócitos, estimular processos inflamatórios.

II) Atividade autocatalítica: outra hipótese é que algumas proteínas possuem atividade autocatalítica que são capazes de dissolver a membrana e exportar-se para o lado externo (Fig. 6B). Por exemplo a cutinase e a fosfolipase que têm a capacidade de hidrolisar fosfolipídeos para aumentar a permeabilidade da membrana e são encontradas extracelularmente em grandes quantidades (SU et al. 2013a, 2013b, 2015, 2017; LYU et al. 2016).

III) Exportadas por componentes secretores desconhecidos: da mesma forma que há canais transmembrana na secreção por Sec ou Tat, podem haver canais transmembrana ainda não descobertos que fazem parte da via secretora não clássica. (Fig. 6C).

IV) Através de um transportador: Há também a possibilidade dessas proteínas serem exportadas por algum tipo de transportador ainda não descoberto. (Fig. 6D).

FIGURA 6: A) Esquema de afrouxamento de membrana para secreção da proteína. B) Dissolução da membrana por atividade autocatalítica da proteína. C) Suposto canal transmembrana ainda não descoberto. D) Exportação da proteína por algum tipo de transportador não descoberto. Fonte: Kang et al. 2019



4.4 A relação de proteínas moonlighting com a produção de biofilme

Na natureza, os microrganismos não ficam dispersos de modo que suas células fiquem soltas (planctônicas), na maioria das vezes, vivem em agregados polimicrobianos como filmes, lodo, tapetes e *biofilme* (RIGANO 2007).

O biofilme é composto por uma matriz de biopolímeros conhecidos como substâncias poliméricas extracelulares (EPS) (ZIMARO 2013), que são colônias altamente organizadas e estruturadas que permitem um estilo de vida completamente diferente do estado planctônico, obtendo proteção contra

antibióticos, ambientes hostis e resposta de defesa do hospedeiro (COSTERTON et al. 1995). O EPS varia muito de acordo com os microrganismos presentes e permite que ocorra interações intensas de comunicação entre as células, que haja reciclagem dos componentes das células lisadas, facilitando a transferência horizontal de genes, por ter um reservatório de DNA disponível, além de fornecer um estoque de nutrientes para manutenção celular e fonte de energia (RIGANO, 2007).

Como mencionado anteriormente, foi observado que algumas proteínas *moonlighting* estavam relacionadas com a produção de biofilme, contribuindo assim para sua virulência e para o processo infeccioso. As bactérias do gênero *Xanthomonas* produzem um biofilme constituído de ácidos nucleicos, lipopolissacarídeos (LPS) e um exopolissacarídeo (EPS), conhecido como xantana, um complexo muito utilizado pela indústria farmacêutica e alimentícia (NERY, et al. 2008) e que está relacionado diretamente com a patogenicidade pois oferece proteção externa e interna (quando está no interior do hospedeiro) para a bactéria além de também estar relacionada com a motilidade (MALAMUD et al. 2010).

Um estudo feito por Rigano e colaboradores (2007) mostrou que o biofilme desempenha um grande papel para a sobrevivência de Xac e para o desenvolvimento do cancro cítrico, após observar o crescimento do biofilme de Xac através de uma microscopia confocal de varredura (CLSM) por quatro dias onde foi observado que a partir do terceiro dia as bactérias estavam bem estabelecidas e organizadas em colônias complexas interconectadas semelhantes a um favo de mel (Fig. 7) e ao realizar o mesmo experimento em folhas de limão monitoradas durante 25 dias foi constatado que as bactérias também formavam uma estrutura de agregados semelhantes dentro do cancro desenvolvido (Fig. 8) (RIGANO et al. 2007). Outro estudo realizado por Stoodley e colaboradores mostrou que quando o biofilme atinge o estágio maduro, ocorre a ativação de um sistema regulador de genes específicos associados à virulência, resistência a compostos antimicrobianos e respostas de defesa do hospedeiro (STOODLEY et al. 2002).

FIGURA 7: Biofilme produzido por *Xac* marcados com GFP cultivadas diretamente nas lâminas e observadas em diferentes estágios de formação do biofilme sob microscopia confocal de varredura durante quatro dias. Dias 1 e 2: fixação e multiplicação das células na lâmina; Dias 3 e 4: Observa-se a típica estrutura do biofilme da microcolônia de *Xac*, em formato de favos de mel e seu crescimento. Barra de escala de 20 μm . Fonte: Rigano et al. 2007.

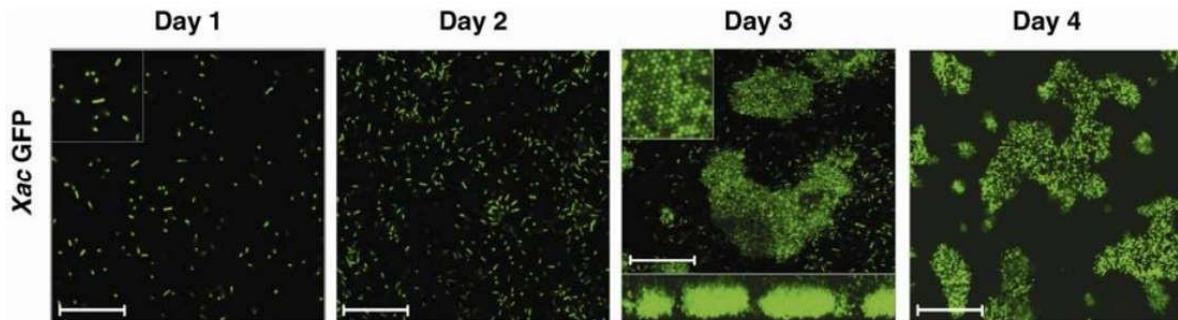
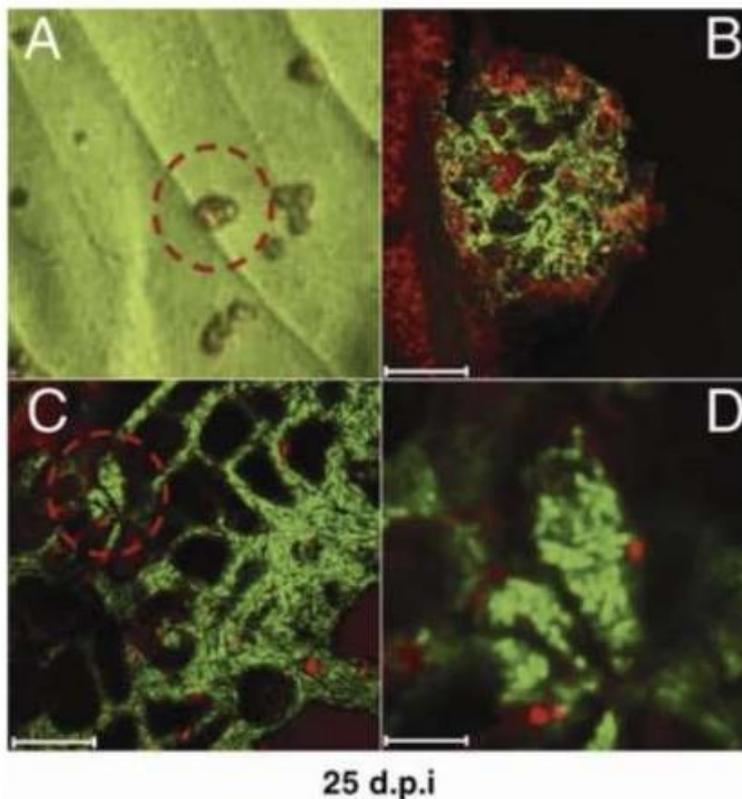


FIGURA 8: Desenvolvimento do cancro em folhas de limão. Cada figura mostra o cancro analisado e a distribuição de bactérias marcadas com GFP dentro da pústula em B, $\times 100$, C, $\times 1.000$ e D, $\times 4.000$. As barras de escala são B, 200 μm , C, 20 μm e D, 5 μm . As áreas circuladas em vermelho em A e C são mostradas ampliadas nos painéis B e D respectivamente. Em A, pústula decancro cítrico observada por microscopia confocal de varredura a laser. Fonte: Rigano et al., 2007.

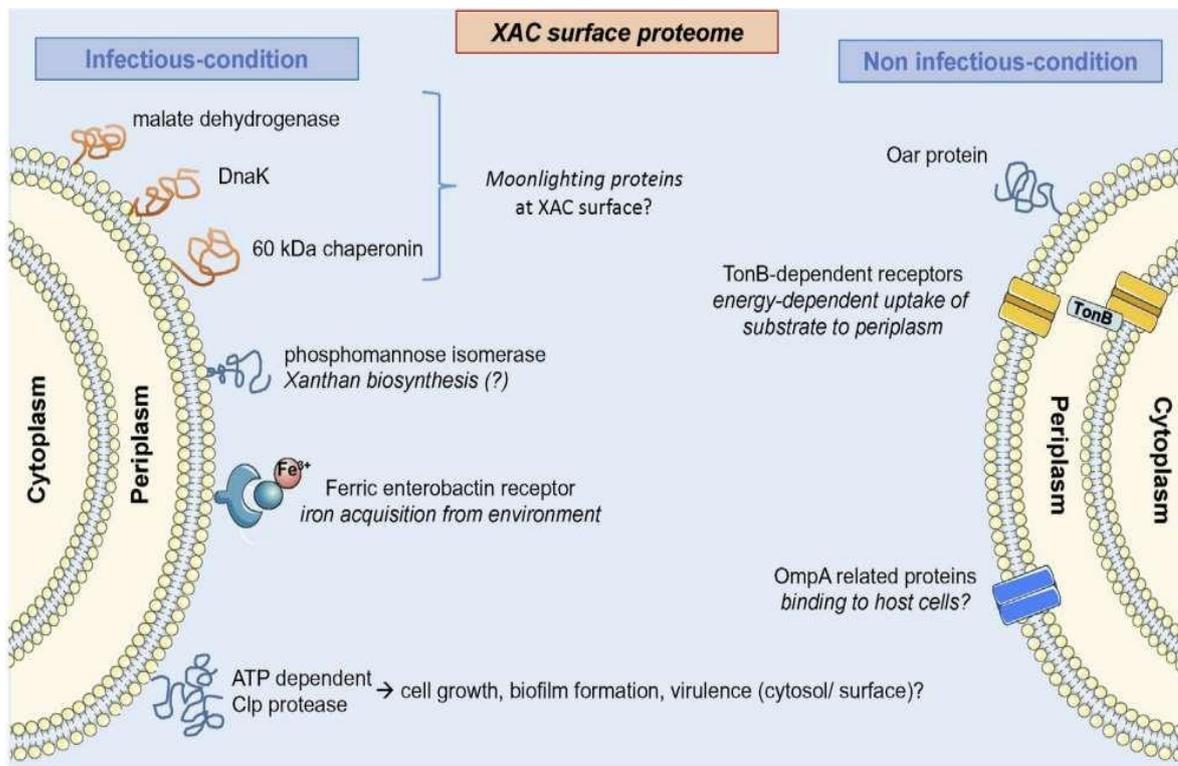


4.5 Relação das proteínas *moonlighting* com a patogenicidade da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Após anos de estudos tentando descobrir formas de vencer o cancro cítrico, abordagens proteômicas foram utilizadas para estudar como a bactéria causadora da doença se relaciona com o hospedeiro na hora da infecção. Uma análise proteômica total em condições *in vivo* mostrou que proteínas excretadas pelos sistemas de secreção Tipos III e IV e proteínas relacionadas à biossíntese da goma xantana estavam diretamente ligadas à virulência do patógeno (FACINCANI et al. 2014). Outro estudo demonstrou que após cultivar *Xac in vitro*, em um meio que mimetizava o ambiente vegetal e induzia a patogenicidade foram encontradas um alto número de proteínas superficiais, dentre as quais estavam a malato desidrogenase e a DnaK, além de outros receptores e proteínas transportadoras associadas à formação de biofilme (ZIMARO, 2013).

Sabendo disso, Carnielli e colaboradores (2017) decidiram fazer uma análise proteômica detalhada por 2D-DIGE (*Two-Dimensional Difference Gel Electrophoresis*) para determinar as proteínas encontradas superficialmente em condições *in vitro* e *in vivo* (não infectante e infectante, respectivamente) e compará-las para ver se havia alguma diferença entre essas condições. Foram descritas 36 proteínas não redundantes encontradas diferencialmente expressas entre as duas condições estudadas (em condição infectante e não infectante). A análise dessas proteínas demonstrou que 50% delas estavam preditas como proteínas citoplasmáticas, 36% como sendo proteínas de membrana externa e 3% proteínas de membrana interna.

FIGURA 9: Proteínas de superfície de XAC encontradas diferencialmente entre as condições infecciosa e não infecciosa. Fonte: Carnielli et al. (2016).



Ao analisar as funções destas proteínas, foi possível identificar algumas peculiaridades. Nas células em condição infectante, foram identificadas na superfície as proteínas DnaK (XAC e chaperonina 60 kDa ou *GroEL* (XAC0542), que são proteínas que conhecidamente estão envolvidas com os processos de enovelamento proteico no citosol bacteriano. A presença de tais proteínas citosólicas na superfície bacteriana de células infecciosas, pode sugerir que elas sejam proteínas *moonlighting*, pois como já citado anteriormente, boa parte das proteínas *moonlighting* podem tem papel fundamental na virulência bacteriana, e esse envolvimento com a patogenicidade já foi descrito para a enzima DnaK em bactérias da flora humana e alguns patógenos humanos (CANDELA et al. XOLAPA et al e KNAUST et al. 2007). Em *E. coli* essas proteínas chaperonas possuem um papel fundamental de resposta a choques térmicos(KUSUKAWA, 1989).

Outra enzima identificada na superfície das células de XAC em condições infecciosas é a Malato desidrogenase (MDH) (XAC1006), uma enzima

do ciclo de Krebs responsável pela conversão do L-malato a oxaloacetato. Anteriormente já havia sido citado por Zimaro (2013), que a MDH tinha sido diferencialmente expressa e encontrada no biofilme de Xac mas até os estudos realizados por Carnielli (2017) , não haviam indícios da presença de MDH na superfície bacteriana. Estudos posteriores foram realizados pelo mesmo grupo de pesquisa e foi confirmado a expressão em maior quantidade dessa enzima na superfície celular sob condição de infecciosidade (MARTELLI, 2019), sugerindo que talvez a MDH seja uma proteína *moonlighting*.

Mais uma enzima reconhecida na superfície de células de XAC em situação de infecção é a enzima fosfomanose isomerase (PMI) (XAC3580). Essa enzima é responsável pela interconversão de D-manose-6-fosfato em D-frutose-6-fosfato, mas em alguns casos ela converte a D-manose-1-fosfato em GDP-D-manose, sendo esse último essencial para a formação de EPS, como a goma xantana de XAC (JENSEN; REEVES, 1998; MILES; GUEST, 1984; PAPOUSOPOULOU; KYRIAKIDIS, 1997; SMITH et al., 1992). Trabalhos recentes mostraram que, na ausência dessa proteína, a formação de biofilme em XAC é reduzida significativamente (ALEXANDRINO, 2019).

Um outro trabalho, realizado por Artier e colaboradores (2018), realizou uma análise proteômica comparativa da fração periplasmática de XAC *in vitro* quando em meio indutor de patogenicidade (XAM-M) e não indutor de patogenicidade (NB). Geralmente no periplasma encontram-se muitas proteínas e substâncias relacionadas com a patogenicidade e nesse estudo foram identificados algumas *moonlighting* já citadas em outros trabalhos, como a GAPDH (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase), a PGM (Phosphoglucomutase) e a 60-kDa chaperonin (ARTIER 2018).

Trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa do LBBMA – UFSCar (resultados ainda não publicados) sobre a proteína DnaK mostraram através de microscopia confocal de fluorescência (Fig. 1) que a mesma encontra-se na superfície das células de Xac e que quando elas são bloqueadas com anticorpos anti-DnaK a produção de biofilme é reduzida, demonstrando que possivelmente ela está envolvida no mecanismo de produção de biofilme.

Considerações Finais

Como abordado inicialmente, há diversas doenças que afetam a produção de citros no Brasil e no mundo, levando a um prejuízo imensurável. Considerando queo Brasil é o maior exportador de suco de laranja do mundo, é de grande interesse comercial procurar alternativas que diminuam o prejuízo ou até mesmo achar uma cura. Muitos pesquisadores ao longo das últimas duas décadas contribuíram para o avanço nessa área, refinando e melhorando cada vez mais as técnicas de proteômica, obtendo resultados satisfatórios que ajudaram a elucidar novas teorias e entender melhor o mecanismo de infecção do hospedeiro. Trabalhos de proteômica diferencial auxiliam e direcionam os estudos funcionais de alvos envolvidos na patogenicidade de XAC, bem como no estudo do envolvimento desses genes com as demais funções celulares (ou no caso de proteínas *moonlighting*, os dois) e são capazes de gerar possíveis alvos na mesma medida em que eles vão sendo analisados. Não podemos descartar o avanço das técnicas de proteômica diferencial livres de gel como a técnica de *shotgun*, que permite a análise do proteoma completo sem a perda de amostras. Entretanto as técnicas mais convencionais ainda se mostram as principais aliadas na busca por alvos precisos para o controle do cancro cítrico.

Com a descoberta das proteínas *moonlighting* surgiram diversas questões, como por exemplo, como elas são secretadas para fora da célula, se suas funções externas são semelhantes às internas, se estão agregadas a outras proteínas ou livres e os estudos que partiram daí obtiveram resultados bastante interessantes onde mostram na maioria das vezes elas relacionadas a situações de virulência e produção de biofilme. Quando Carnielli realizou a análise superficial de Xac em situação de infecção do hospedeiro comparando com situação de não infecção, conseguiu observar que em Xac havia expressão em maior quantidade de certas proteínas já descritas com características *moonlighting* e a partir disso surgiu uma nova gama de proteínas para serem estudadas e teorias propostas. Experimentos realizados posteriormente com algumas delas, mostraram que há realmente indícios dessas proteínas estarem envolvidas na produção de biofilme, uma vez que quando elas estão bloqueadas superficialmente a produção de biofilme diminuiu.

Referências Bibliográficas

- ANTELMANN H, VAN DIJL JM, BRON S, HECKER M. **Proteomic survey through secretome of *Bacillus subtilis***. *Methods Biochem Anal* 49(1):179–208, 2005.
- ARTIER J, ZANDONADI F, CARVALHO F M, PAULETTI B A, LEME A F P, CARNIELLI C M, SELISTRE-DE-ARAUJO H S, BERTOLINI M C, FERRO J A, BELASQUE JÚNIOR J, DE OLIVEIRA J C F, NOVO- MANSUR M T M. **Comparative proteomic analysis of *Xanthomonas citri* ssp. citri** periplasmic proteins reveals changes in cellular envelope metabolism during *in vitro* pathogenicity induction. *Mol Plant Pathol*. 2018 Jan;19(1):143-157. doi: 10.1111/mpp.12507.
- BAO S et al. ***Mycoplasma synoviae* enolase is a plasminogen/fibronectin binding protein**. *BMC Vet. Res.* 10, 223, 2014.
- BECK HC, MADSEN SM, GLENTING J, PETERSEN J, ISRAELSEN H, NORRELYKKE MR, ANTONSSON M, HANSEN AM. **Proteomic analysis of cell surface-associated proteins from probiotic *Lactobacillus plantarum***. *FEMS Microbiol Lett* 297(1):61–66, 2009.
- CANDELA M, CENTANNI M, FIORI J, BIAGI E, TURRONI S, ORRICO C, BERGMANN S, HAMMERSCHMIDTS, BRIGIDI P. **DnaK from *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis is a surface-exposed human plasminogen receptor upregulated in response to bile salts**. *Microbiology* 156 (Pt 6): 1609–1618, 2010.
- CANDELA, M. et al. **Binding of human plasminogen to *Bifidobacterium***. *Journal of bacteriology*, v. 189, n. 16, p. 5929-5936, 2007.
- CARNIELLI, C.M. et al. ***Xanthomonas citri* subsp. Citri surface proteome by 2D-DIGE: ferric enterobactin receptor and other outer membrane proteins potentially involved in citric host interaction**. *Journal of Proteomics*, v 151, p. 251-263, 2017.
- COSTERTON JW, LEWANDOWSKI Z, CALDWELL DE, KORBER DR, LAPPIN-SCOTT HM. **Microbial biofilms**. *Annu Rev Microbiol*. 1995;49:711-45. doi: 10.1146/annurev.mi.49.100195.003431. PMID: 8561477.
- DREISBACH A, HEMPEL K, BUIST G, HECKER M, BECHER D, VAN DIJL JM. **Profiling the surfacome of *Staphylococcus aureus***. *Proteomics* 10(17):3082–3096, 2010.
- EBNER P, LUQMAN A, REICHERT S, HAUF K, POPELLA P, FORCHHAMMER K, OTTO M, GOTZ F. **Non- classical protein excretion is boosted by PSMalpha-induced cell leakage**. *Cell Rep* 20(6):1278–1286, 2017.
- FACINCANI A P, MOREIRA L M, SOARES M R, FERREIRA C B, FERREIRA R M, FERRO M I T, et al., **Comparative proteomic analysis reveals that T3SS, Tfp, and xanthan gum are key factors in initial stages of *Citrus sinensis* infection by *Xanthomonas citri* subsp. citri**, *Funct. Integr. Genomics* 14 (2014) 205–217
- FULDE M, ROHDE M, POLOK A, PREISSNER KT, CHHATWAL GS, BERGMANN S. **Cooperative plasminogen recruitment to the surface of *Streptococcus canis* via M protein and enolase enhances bacterial survival**. *mBio* 4, e00629-12, 2013.
- GARDUÑO RA, CHONG A, NASRALLAH GK, ALLAN DS. **The *Legionella pneumophila* Chaperonin - An Unusual Multifunctional Protein in Unusual Locations**. *Front Microbiol*. 2011;2:122. Published 2011 Jun 10. doi:10.3389/fmicb.2011.00122
- GOTO L SEIJI, ALEXANDRINO A VESSONI, et al. **Structural and functional characterization of the phosphoglucosyltransferase from *Xanthomonas citri* subsp. Citri**. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2016 <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.08.014>.
- HENDERSON, B., FARES, M.A. AND MARTIN, A.C.R. (2016). **A Brief History of Protein Moonlighting**. In *Protein Moonlighting in Biology and Medicine* (eds B. Henderson,
- INGOLIA, T.D.; CRAIG, E.A. **Four small *Drosophila* heat shock proteins are related to each other and to mammalian a-crystallin**. *Proc. Nati Acad. Sci. USA* Vol. 79, pp. 2360-2364, April 1982.
- JEFFERY CJ, BAHNSON BJ, CHIEN W, RINGE D, PETSKO GA. **Crystal structure of rabbit phosphoglucose isomerase, a glycolytic enzyme that moonlights as neuroleukin, autocrine motility factor, and differentiation mediator**. *Biochemistry* 39, 955– 964, 2000.
- JEFFERY CJ. **Moonlighting proteins**. *Trends Biochem Sci*. 1999 Jan;24(1):8-11. doi: 10.1016/s0968-0004(98)01335-8. PMID: 10087914.
- JEFFERY CJ. **Protein moonlighting: what is it, and why is it important?** *Philos Trans R Soc*

Lond B Biol Sci. 2018 Jan 19;373(1738):20160523. doi: 10.1098/rstb.2016.0523. PMID: 29203708; PMCID: PMC5717523. COSTERTON, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Lappin-Scott, H. M.

- JENSEN, S. O.; REEVES, P. R. **Domain organization in phosphomannose isomerases (types I and II)**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, v. 1382, n. 1, p. 5–7, 1998.
- KANG, Q; ZHANG, D. **Principle and potential applications of the non-classical protein secretory pathway in bacteria**. *Applied Microbiology and Biotechnology*. VOLUME 104, pag. 953–965. October 2019.
- KATAKURA Y, SANO R, HASHIMOTO T, NINOMIYA K, SHIOYA S. **Lactic acid bacteria display on the cell surface cytosolic proteins that recognize yeast mannan**. *Appl Microbiol Biotechnol* 86(1):319–326, 2010.
- KIM KP, JAGADEESAN B, BURKHOLDER KM, JARADAT ZW, WAMPLER JL, LATHROP AA, MORGAN MT, BHUNIA AK. **Adhesion characteristics of *Listeria* adhesion protein. (LAP)-expressing *Escherichia coli* to Caco-2 cells and of recombinant LAP to eukaryotic receptor Hsp60 as examined in a surface plasmon resonance sensor**. *FEMS Microbiol. Lett.* 256, 324 — 332, 2006.
- KNAUST, A. et al. **Cytosolic proteins contribute to surface plasminogen recruitment of *Neisseria meningitidis***. *Journal of bacteriology*, v. 189, n. 8, p. 3246-3255, 2007.
- KUSUKAWA, N et al. **Effects of mutations in heat shock genes *groES* and *groEL* on protein export in *Escherichia coli***. *The EMBO Journal*. V8. N11, p3517-3521, 1989.
- LYU Y, YE L, XU J, YANG X, CHEN W, YU H. **Recent research progress with phospholipase C from *Bacillus cereus***. *Biotechnol Lett* 38(1):23–31, 2016.
- MALAMUD F., TORRES PS, ROESCHLIN R., RIGANO LA, ENRIQUE R., BONOMI HR, VOJNOV AA. **The *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* flagellum is required for mature biofilm and canker development**. *Microbiology*, 157 (3), 819–829 22, 2010.
- MILES J. S., GUEST J. R. **Nucleotide sequence and transcriptional start point of the phosphomannose isomerase gene (*manA*) of *Escherichia coli***. *Gene*, v. 32, n. 1–2, p. 41–48, 1984.
- NERY T. B. R., BRANDÃO L. V., ESPERIDIÃO M. C. A., DRUZIAN J. I. **Biossíntese de goma xantana a partir da fermentação de soro de leite: rendimento e viscosidade**. *Universidade Federal da Bahia*. *Química Nova*. Vol. 31, n.8, p. 1937-1941, São Paulo, 2008.
- NEVES F, TROMBIN M. **Anuário da citricultura 2017**. 1ª ed. São Paulo: CitrusBR, 2017. 28 24.
- NEVES, MARCOS FAVA (COORD.). **O retrato da citricultura brasileira**. São Paulo: MARKESTRAT, 2010. 25.
- OLIVEIRA L, MADUREIRA P, ANDRADE EB, BOUABOUD A, MORELLO E, FERREIRA P, POYART C, TRIEU- CUOT P, DRAMSI S. **Group B streptococcus GAPDH is released upon cell lysis, associates with bacterial surface, and induces apoptosis in murine macrophages**. *PLoS One* 7(1): e29963, 2012.
- OLIVEIRA, ROBERTO P.; UENO, BERNARDO; SCIVITTARO, WALKYRIA B.; KOLLER, OTTO C, ROCHA E, PAULO S. G. **Cancro cítrico: epidemiologia e controle**. p. 42, 2008.
- PAN X, Yang Y, Liu X, Li D, Li J, Guo X, Zhou Z. **Secretory expression of a heterologous protein, Aio-AIO6BS, in *Bacillus subtilis* via a non-classical secretion pathway**. *Biochem Biophys Res Commun* 478(2):881–886., 2016.
- PAPOUTSOPOULOU, S. V; KYRIAKIDIS, D. A. **Phosphomannose isomerase of *Xanthomonas campestris*: a zinc activated enzyme**. *Molecular and cellular biochemistry*, v. 177, n. 1–2, p. 183–191, 1997.
- PATEL DK, SHAH KR, PAPPACHAN A, GUPTA S, SINGH DD. **Cloning, expression and characterization of a mucin-binding GAPDH from *Lactobacillus acidophilus***. *Int. J. Biol. Macromol.* 91, 338 — 346, 2016.
- READ M, HICKS KE, SIMS PFG, HYDE JE. **Molecular characterization of the enolase gene from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Evidence for ancestry within a photosynthetic lineage**. *Eur. J. Biochem.* 220, 513 — 520, 1994.
- RIGANO, L. A et al. **Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, v. 20, n. 10, p. 1222–30, out. 2007
- SINGH, N.; BHALLA, N. **Moonlighting Proteins**. *The Annual Review of Genetics*. 54:12.1–12.21, August 2020.

- SINGH, V.K.; et al. **An insight into the significance of the DnaK heat shock system in *Staphylococcus aureus***. International Journal of Medical Microbiology, v. 302, p. 242-252, 2012.
- SMITH, D. J. et al. PMI40, **An intron-containing gene required for early steps in yeast mannosylation**. Molecular and cellular biology, v. 12, n. 7, p. 2924–2930, 1992.
- STOODLEY, P. et al. **Biofilms as complex differentiated communities**. Annual review of microbiology, v. 56, p. 187–209, 2002.
- SU L, JIANG Q, YU L, WU J. **Enhanced extracellular production of recombinant proteins in *Escherichia coli* by co-expression with *Bacillus cereus* phospholipase C**. Microb Cell Factories 16(1):24, 2017.
- SU L, WOODARD RW, CHEN J, WU J. **Extracellular location of *Thermobifida fusca* cutinase expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) without mediation of a signal peptide**. Appl Environ Microbiol 79(14):4192–4198, 2013a.
- SU L, XU C, WOODARD RW, CHEN J, WU J. **A novel strategy for enhancing extracellular secretion of recombinant proteins in *Escherichia coli***. Appl Microbiol Biotechnol 97(15):6705–6713, 2013b.
- SU L, YU L, XU C, WU J. **Extracellular expression of *Thermobifida fusca* cutinase with *pelB* signal peptide depends on more than type II secretion pathway in *Escherichia coli***. J Biotechnol 204:47–52, 2015.
- WANG M, WU J, WU D. **Cloning and expression of the sucrose phosphorylase gene in *Bacillus subtilis* and synthesis of kojibiose using the recombinant enzyme**. Microb Cell Factories 17(1):23, 2018.
- XOLALPA, W. et al. **Identification of novel bacterial plasminogen- binding proteins in the human pathogen *Mycobacterium tuberculosis***. Proteomics, v. 7, n. 18, p. 3332- 3341, 2007.
- YANG CK, EWIS HE, ZHANG X, LU CD, HU HJ, PAN Y, ABDELAL AT, TAI PC. **Nonclassical protein secretion by *Bacillus subtilis* in the stationary phase is not due to cell lysis**. J Bacteriol, 2011.
- YANG CK, ZHANG XZ, LU CD, TAI PC. **An internal hydrophobic helical domain of *Bacillus subtilis* enolase is essential but not sufficient as a non-cleavable signal for its secretion**. Biochem Biophys Res Commun 446(4):901–905, 2014.
- ZHAO D, YUAN S, XIONG B, SUN H, YE L, LI J, ZHANG X, BI C. **Development of a fast and easy method for *Escherichia coli* genome editing with CRISPR/Cas9**. Microb Cell Factories 15(1):205, 2016.
- ZHAO L, CHEN J, SUN J, ZHANG D. **Multimer recognition and secretion by the non-classical secretion pathway in *Bacillus subtilis***. Sci Rep 7:44023, 2017.
- ZIMARO T, THOMAS L, MARONDEDZE C. et al. **Insights into *xanthomonas axonopodis* pv. citri biofilm through proteomics**, BMC Microbiol. 13 (2013) 186.